

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

**BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS DE *Anacardium othonianum*  
RIZZINI E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA  
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO**

Autora: Lorena Gonçalves Pires Landi  
Orientador: Aurélio Rubio Neto

RIO VERDE – GO  
Fevereiro de 2016

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

**BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS DE *Anacardium othonianum*  
RIZZINI E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA  
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO**

Autora: Lorena Gonçalves Pires Landi  
Orientador: Aurélio Rubio Neto

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Câmpus Rio Verde - Área de concentração Ciências Agrárias.

Rio Verde – GO  
Fevereiro de 2016

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

--

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

**BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS DE *Anacardium othonianum*  
RIZZINI E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO NA  
SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATO**

Autora: Lorena Gonçalves Pires Landi  
Orientador: Aurélio Rubio Neto

TITULAÇÃO: Mestre em Ciências Agrárias – Área de concentração Ciências Agrárias  
– Ciências Agrárias

**APROVADA:**

---

Dr. Jadson Belém de Moura  
Avaliador externo  
UNIEVANGÉLICA

---

Prof. Dr. Edson Luiz Souchie  
Avaliador interno  
IF Goiano – Rio Verde

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana de Fátima Sales  
Avaliadora interna  
IF Goiano – Rio Verde

---

Prof. Dr. Aurélio Rubio Neto  
Presidente da banca  
IF Goiano – Rede Arco Norte

Dedico este trabalho,  
Aos meus preciosos Mariana e João.

## AGRADECIMENTOS

Ao orientador prof. Fabiano Guimarães Silva, pela oportunidade de estágio no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais e pela orientação desde a iniciação científica ao mestrado, abrindo-me portas a oportunidades importantes de conhecimento.

Ao orientador Aurélio Rubio sem o qual não seria possível a conclusão deste trabalho.

Ao prof. Edson pelas discussões esclarecedoras.

À profa. e amiga Juliana Sales pelo apoio com as questões burocráticas e por todos os momentos de apoio emocional.

À servidora e amiga Vanilda pela cordialidade e pelo bom serviço prestado junto à secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias.

Aos colegas de laboratório Alessandra, Ana Gazola, Andreza, Ariane, Cíntia, Clenilso, Eduard, Isabel, João Pedro, Marlete, Paula, Paulo e Rita pela boa convivência no Laboratório de Microbiologia Agrícola e no Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais.

À então estudante de iniciação científica Ariane pela contribuição com a parte experimental.

Às pesquisadoras Juliana Cabral e Paula Sperotto pelo apoio com o tratamento dos dados.

Ao prof. Marcos Antônio (UFMT) pelos ensinamentos fundamentais para a execução deste trabalho.

Ao Sr. João (Fazenda Gameleira) pelo auxílio na coleta do sistema radicular.

À amiga Ludimila Lucianelli por cuidar da Mari durante vários momentos deste trabalho.

Aos meus sogros Salmon e Magda, por todo apoio e por sempre desejarem meu sucesso.

Ao meu maravilhoso esposo, que sempre esteve ao meu lado. E aos meus filhos Mariana e João por serem a minha maior riqueza e conquista e o meu maior incentivo para crescer.

À CAPES pelo apoio financeiro.

A todos o meu muito obrigado.

## BIOGRAFIA DA AUTORA

Lorena Gonçalves Pires Landi - filha de Márcia Pires Gonçalves, nasceu no dia 28 de março de 1983, na cidade de Goiânia, Goiás. Em 2004, casou-se com Salmon Landi Júnior. Em 2006, ingressou-se no bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás – Goiânia (UFG – Goiânia). Mesmo ano em que se iniciou sua carreira científica, no Laboratório de Biologia Molecular da UFG – Goiânia. Com o nascimento da princesinha Mariana interrompeu-se tais atividades de pesquisa. Em 2008, estagiou-se no Laboratório de Biotecnologia de Fungos da UFG – Goiânia. Em 2009, transferiu-se para o curso de licenciatura em Ciências Biológicas do Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde (IF Goiano – Câmpus Rio Verde). No ano seguinte, integrou-se ao grupo de pesquisadores do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do IF Goiano – Câmpus Rio Verde. Onde em 2013, ingressou-se no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, sob a orientação do Prof. Dr. Fabiano Guimarães Silva. Em 2014, mudou-se para Braga – Portugal e iniciou-se estudos com extratos de espécies de *Anacardium* do Cerrado no Laboratório de Biologia Vegetal da Universidade do Minho. Em 2015, interrompeu-se tais estudos devido ao nascimento do príncipezinho João. Neste mesmo ano a responsabilidade de orientação desta dissertação foi transferida ao prof. Dr. Aurélio Rubio Neto.

*“Eu sou aquela mulher  
a quem o tempo muito ensinou.  
Ensinou a amar a vida  
e não desistir da luta,  
recomeçar na derrota,  
renunciar a palavras  
e pensamentos negativos.  
Acreditar nos valores humanos  
e ser otimista”*

Cora Coralina

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
RESUMO GERAL .....	x
<b>1. Introdução Geral .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Revisão bibliográfica .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1. Anacardium othonianum Rizzini .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2. Importância socioeconômica .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Micro-organismos com potencial biotecnológico .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Rizosféricos .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Solubilizadores de Fosfato .....</b>	<b>16</b>
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>20</b>
<b>Isolamento e identificação de rizobactérias solubilizadoras de fosfato em solo de caju-de-árvore-do-cerrado (<i>Anacardium othonianum Rizzini</i>) .....</b>	<b>20</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>21</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1. Isolamento das rizobactérias solubilizadoras de fosfato .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2. Identificação molecular das rizobactérias solubilizadoras de fosfato .....</b>	<b>24</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Rizobactérias solubilizadoras de fosfato isoladas em solo de <i>Anacardium othonianum Rizzini</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>Identificação molecular das rizobactérias .....</b>	<b>26</b>
<b>4. CONCLUSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>29</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Identificação molecular das rizobactérias solubilizadoras de fosfato de solo de <i>A. othonianum</i> Rizzini, baseado no sequenciamento da região 16S.	27
------------------	--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

**Figura 1.** Aspecto visual de uma planta adulta de *Anacardium othonianum* Rizzini. Montes Claros – Goiás, 2012..... 14

**Figura 2.** Variabilidade da cor e forma do pseudofruto de *A. othonianum* Rizzini – os pares A, B, C e D são oriundos de plantas diferentes com mesmo grau de maturação. Foto: Assis, K. C, (2008)..... 16

### CAPÍTULO 1.

**Figura 1.** Halos de solubilização de fosfato de cálcio formados por isolados bacterianos durante fase de isolamento (A) e purificação (B). Barra= 10 mm..... 26

**Figura 2.** Agrupamento filogenético entre os genes 16S rRNA dos isolados de rizobactérias solubilizadoras de fosfato de *Anacardium othonianum* Rizzini..... 29

## RESUMO GERAL

LANDI, LORENA GONÇALVES PIRES. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde – GO, fevereiro de 2016. **Diversidade de bactérias rizosféricas de *Anacardium othonianum* Rizzini e análise de seu potencial biotecnológico.** Orientador: Aurélio Rubio Neto. Coorientador: Juliana de Fátima Sales.

O caju-de-árvore-do-cerrado é uma frutífera importante para o seu bioma. Seus frutos e pseudofrutos são muito utilizados na alimentação, além de seu uso ser bastante difundido na medicina popular. Em torno do solo rizosférico encontram-se micro-organismos que interagem com a planta, seja por parasitismo ou mesmo por associações simbióticas. Algumas bactérias possuem a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico e ou até mesmo sintetizar fitormônio. Tais micro-organismos simbióticos têm demonstrado serem importantes fontes de prospecção de metabólitos especiais com diferentes propriedades bioativas, como no controle biológico de patógenos. Neste trabalho isolou-se bactérias rizosféricas com capacidade de solubilizar fosfato e identificou-se através da técnica de sequenciamento de DNA. Constatou-se a presença de 182 rizobactérias solubilizadoras de fosfato pertencentes aos filos Proteobacteria (80%) e Firmicutes (20%). Portanto, concluiu-se que a rizosfera do *Anacardium othonianum* Rizzini possui baixa diversidade de rizobactérias solubilizadoras de fosfato cultiváveis, com predominância de bactérias pertencentes ao gênero *Citrobacter* (72,53%).

**Palavras-chave:** *Anacardium othonianum* Rizzini, caju, rizobactérias, fosfato

## 1. Introdução Geral

O Brasil é um dos países do mundo com a maior diversidade vegetal, possuindo mais de 40.000 espécies de plantas, representando 20% da flora mundial. No entanto esta riqueza vegetal não é utilizada de forma otimizada (Oliveira et al., 2012). O Cerrado é detentor de uma parcela relevante desta biomassa e biodiversidade vegetais sendo considerado o segundo maior bioma do Brasil (Mesquita et al., 2009). Todavia é residual o impacto de plantas do Cerrado na economia brasileira, quanto ao seu potencial biotecnológico aplicado nas indústrias farmacêutica, cosmética, química e agropecuária. As frutíferas do Cerrado ainda podem ser utilizadas na recuperação de áreas desmatadas ou degradadas, no plantio intercalado com reflorestas e no enriquecimento da flora.

Em virtude dos poucos trabalhos sobre o *Anacardium othonianum* Rizzini e do seu potencial biotecnológico já observado, aumentar o conhecimento sobre esta espécie é relevante, não apenas do ponto de vista científico, mas também socioeconômico uma vez que este possui grande importância para a região do Cerrado (Bessa et al., 2013; Bonatto & Silva, 2014).

Sendo o fósforo um macro nutriente essencial para o desenvolvimento saudável da planta, o estudo com micro-organismos solubilizadores de fosfatos torna-se fundamental visto que estes desempenham importante papel no suprimento deste nutriente às plantas (Souchie et al., 2007). Atualmente, o potencial biotecnológico de micro-organismos rizosféricos tem despertado o interesse da comunidade científica (Philippot et al., 2013).

A biologia molecular tem sido largamente utilizada nos estudos com micro-organismos e vegetais, tornando-se uma ferramenta importante para o conhecimento da diversidade da microbiota que interage com as plantas (Peng et al., 2015; Nirmaladevi et al., 2016).

Considerando o exposto, objetivou-se com este trabalho isolar e identificar bactérias rizosféricas solubilizadoras de fosfato de Caju-de-árvore-do-cerrado.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1. *Anacardium othonianum* Rizzini

A flora do Cerrado possui diversas espécies frutíferas com grande potencial de utilização agrícola, que são tradicionalmente utilizadas pela população local. Dentre as espécies nativas do Cerrado brasileiro o *Anacardium othonianum* Rizzini (Fig.1) se destaca devido à importância econômica, social e ambiental para região em que se encontra (Assis et al., 2012). Conhecido popularmente como caju-de-árvore-do-cerrado, cajuzinho ou cajuí, o *Anacardium othonianum* Rizzini pertence à família Anacardiaceae, diferindo-se dos outros cajueiros devido ao seu porte arbóreo que pode atingir de 3 – 4 m (Bonatto & Silva, 2014).



**Figura 1** - Aspecto visual de uma planta adulta de *Anacardium othonianum* Rizzini. Montes Claros – Goiás, 2012.

O gênero *Anacardium* é comum no Cerrado e de acordo com a classificação de RIZZINI, o *Anacardium othonianum* Rizzini possui a seguinte posição sistemática:

Divisão → Magnoliophyta,  
Classe → Magnoliopsida,  
Ordem → Sapindales,  
Família → Anacardiaceae,  
Gênero → Anacardium

Os pseudofrutos do *Anacardium othonianum* Rizzini (Fig. 2) possuem forma de pera, variam do amarelo ao vermelho sendo a polpa branco-amarelada e apresentam elevado valor nutritivo relacionado, principalmente, ao alto teor de vitamina C. Também são fontes de fibras e ricos em compostos fenólicos, em especial taninos, que conferem adstringência ao pedúnculo. A castanha, fruto verdadeiro, é um aquênio cujo pedúnculo se desenvolve em pseudofruto com 2 – 4 cm de comprimento, 2 – 3 cm de diâmetro e massa média de 7,15 g (Correa et al., 2008).



**Figura 2** - Variabilidade da cor e forma do pseudofruto de *A. othonianum* Rizzini – os pares A, B, C e D são oriundos de plantas diferentes com mesmo grau de maturação. Foto: Assis, K. C, (2008).

## 2.2. Importância socioeconômica

As frutíferas do cerrado têm alto valor nutritivo, sendo utilizadas para o consumo *in natura* ou para a produção de doces, geleias, sucos e licores, além de suas folhas e cascas utilizadas na medicina popular, o que beneficia pequenos agricultores e

comunidades rurais. A castanha do caju-de-árvore-do-cerrado geralmente consumida com sal é altamente oleaginosa, da qual também se extrai um óleo-resina aplicado para combater moléstias cutâneas. A casca do caule é empregada para sanar problemas intestinais e as flores são utilizadas como expectorantes (Silva et al., 2001; Forato et al., 2015).

Seguindo um crescente interesse mundial na utilização de produtos de caju e por produtos como matérias-primas para síntese verde de nanoestruturas, pesquisadores da Embrapa e da Universidade de Brasília utilizaram a casca da castanha de *Anacardium othonianum* Rizzini para produção de nanopartículas de prata com propriedades antifúngicas (Bonatto & Silva, 2014).

Também há trabalhos para otimizar a produção de mudas buscando aumentar o conhecimento sobre os aspectos de crescimento e nutricionais do *Anacardium othonianum* Rizzini. Por exemplo, Bessa et al. (2013) caracterizaram o crescimento e acumulação de nutrientes em mudas cultivadas em solução nutritiva. Já Dornelles et al. (2014) avaliaram os efeitos de diferentes substratos na emergência, crescimento, nutrição e qualidade de mudas de *Anacardium othonianum* Rizzini. Correa et al. (2008) determinaram características físicas de frutos e sementes nativos do Cerrado, incluindo *Anacardium othonianum* Rizzini, objetivando o melhoramento genético.

Importante para a economia de muitos países tropicais, a castanha do caju é considerada uma ótima fonte de promoção a saúde por possuir consideráveis teores de ácidos gordurosos e vitamina E (Muniz et al., 2013). Vários aspectos farmacológicos também têm sido apontados a extratos de espécies do gênero *Anacardium*, tais como atividade antioxidante (Moo-Huchin et al., 2015), atividade antidiabética (Diallo et al., 2012) e anti-inflamatória (Vanderlinde et al., 2009). Tais estudos abordam diferentes áreas do conhecimento e os seus objetivos vão desde a melhoria da qualidade da castanha às atividades biológicas de diferentes partes da planta. Além destes, o desenvolvimento de uma goma comestível a partir do pseudofruto do caju foi utilizada para revestir para frutos secos e estender assim a vida de prateleira dos mesmos (Forato et al., 2015).

Entretanto, estes relatos são maioritariamente referentes ao *Anacardium occidentale* L. Assim, há a necessidade de explorar a biodiversidade de espécies de caju, nomeadamente espécies nativas do Cerrado, tendo em vista a importância desta frutífera para a região e os escassos trabalhos realizados até então.

### 3. Micro-organismos com potencial biotecnológico

#### 3.1. Rizosféricos

Considerada uma das interfaces mais dinâmicas do planeta, a rizosfera é a zona estreita de solo que envolve e interage com as raízes das plantas, o lar de uma imensa quantidade de micro-organismos e invertebrados. Os organismos que estão presentes na microbiota rizosférica podem ter efeitos profundos no crescimento, saúde e nutrição da planta. Muitos dos conhecimentos atuais em interações e processos na rizosfera surgiram a partir de estudos sobre as plantas de culturas agrícolas ou hortícolas e espécies modelo, como *Arabidopsis thaliana* e *Medicago truncatula*. No entanto, progressos consideráveis também estão sendo obtidos na compreensão da ecologia microbiana da rizosfera de espécies de plantas nativas (Philippot et al., 2013).

As comunidades microbianas do solo desempenham um papel fundamental, muitas vezes único em função do ecossistema e estão entre as mais complexas e diversificadas na biosfera. O estudo da planta associada à micro-organismos é de grande importância para as aplicações biotecnológicas, como o controle biológico de patógenos de plantas, a promoção de crescimento das plantas ou ainda o isolamento de compostos ativos (Lopez-Fuentes et al., 2012).

A microbiota da rizosfera é composta por bactérias, fungos (incluindo os micorrízicos arbusculares (MSF) e vírus que são atraídos e alimentados por rizodeposições. Sendo sua composição e abundância fatores fortemente influenciados pela planta (Teixeira et al., 2010; Bakker et al., 2013).

As bactérias estão em maior número na microbiota da rizosfera, com ênfase para as Proteobactérias – geralmente de crescimento rápido e r-estrategistas podem utilizar uma ampla gama de substratos de carbono derivados da raiz (Uroz et al., 2010). Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (PGPR - Plant growth-promoting rhizobacteria) é um grupo capaz de colonizar ativamente as raízes das plantas e melhorar o seu crescimento e produção. A expressão "PGPR" foi em primeiro lugar utilizada especialmente para as *Pseudomonas fluorescences* envolvidas no controle biológico de patógenos e a melhoria do crescimento das plantas. Mais tarde, essa expressão foi estendida para rizobactérias capazes de promover diretamente o crescimento da planta. Hoje em dia, a sigla PGPR é usada para se referir a todas as bactérias que vivem na rizosfera e que melhoram o crescimento das plantas por um ou vários mecanismos (Agbodjato et al., 2015). A rizosfera também é habitada por uma gama de fungos, dos

quais os Ascomycotas e Glomeromycotas também respondem rapidamente às rizodeposições (Vandenkoornhuyse et al., 2007).

A atuação dos micro-organismos presentes na rizosfera vão desde a fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato até a produção de fitormônios e sideróforos.

### **3.2. Solubilizadores de Fosfato**

O fósforo (P) é um dos principais macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. No solo é encontrado principalmente em sua forma orgânica, que insolúvel não está disponível para as plantas (Behera et al., 2014). Do P adicionado por meio da adubação apenas uma fração é assimilada pelas plantas, ficando o restante indisponível devido a formação de complexos com cátions de alumínio (Al) e ferro (Fe) em solos ácidos e cálcio (Ca) em solos alcalinos.

Bactérias e fungos desempenham papel central no ciclo do fósforo ao converter formas insolúveis (**orgânica**) em formas solúveis (**inorgânica**) – fator importante para o crescimento e produção das plantas, além de reduzir a aplicação dos fertilizantes fosfatados (Souchie et al., 2007). As bactérias solubilizadoras de fosfato mais eficientes pertencem ao gênero *Bacillus*, *Rhizobium* e *pseudomonas* e dentre os fungos estão *Aspergillus* e *Penicillium* (Saharan, 2011).

**Se descrever as formas insolúveis e solúveis**

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBODJATO, N. A.; NOUMAVO, P. A.; BABA-MOUSSA, F.; SALAMI, H. A.; SINA, H.; SÈZAN, A.; BANKOLÉ, H.; ADJANOHOON, A.; BABA-MOUSSA, L. Characterization of Potential Plant Growth Promoting Rhizobacteria Isolated from Maize (*Zea mays* L.) in Central and Northern Benin (West Africa). **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2015, n. 1, p. 1-9, 2015.

ASSIS, K. C. D.; PEREIRA, F. D.; CABRAL, J. S. R.; SILVA, F. G.; SILVA, J. W.; SANTOS, S. C. D. In vitro cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: effects of salt concentration and culture medium volume. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 34, n. 1, p. 77-83, 2012.

BAKKER, P. A.; BERENDSEN, R. L.; DOORNBOS, R. F.; WINTERMANS, P. C.; PIETERSE, C. M. The rhizosphere revisited: root microbiomics. **Frontiers in plant science**, v. 4, n. 165, p. 1-7, 2013.

BEHERA, B. C.; SINGDEVSACHAN, S. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 97-110, 2014.

BESSA, L. A.; SILVA, F. G.; MOREIRA, M. A.; TEODORO, J. P. R.; SOARES, F. A. L. Growth and nutrient accumulation of *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings grown in nutrient solution. **Chilean journal of agricultural research**, v. 73, n. 3, p. 301-308, 2013.

BONATTO, C. C.; SILVA, L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops and Products**, v. 58, n. 1, p. 46-54, 2014.

CORREA, G. C.; NAVES, R. V.; ROCHA, M. R.; CHAVES, L. J.; BORGES, J. D. Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), visando melhoramento genético. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 4, p. 42-47, 2008.

DIALLO, A.; TRAORE, M. S.; KEITA, S. M.; BALDE, M. A.; KEITA, A.; CAMARA, M.; VAN MIERT, S.; PIETERS, L.; BALDE, A. M. Management of diabetes in Guinean traditional medicine: an ethnobotanical investigation in the coastal lowlands. **Journal of ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 353-361, 2012.

DORNELLES, P.; SILVA, F. G.; MOTA, C. S.; SANTANA, J. D. G. Production and quality of *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings grown in different substrates. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 479-486, 2014.

FORATO, L. A.; BRITTO, D.; RIZZO, J. S.; GASTALDI, T. A.; ASSIS, O. B. Effect of cashew gum-carboxymethylcellulose edible coatings in extending the shelf-life of fresh and cut guavas. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 5, n. 1, p. 68-74, 2015.

LOPEZ-FUENTES, E.; RUIZ-VALDIVIEZO, V.; MARTINEZ-ROMERO, E.; GUTIÉRREZ-MICELI, F.; DENDOOVEN, L.; RINCÓN-ROSALES, R. Bacterial community in the roots and rhizosphere of *Hypericum silenoides* Juss. 1804. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 11, p. 2704-2711, 2012.

MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 439-445, 2009.

MOO-HUCHIN, V. M.; MOO-HUCHIN, M. I.; ESTRADA-LEÓN, R. J.; CUEVAS-GLORY, L.; ESTRADA-MOTA, I. A.; ORTIZ-VÁZQUEZ, E.; BETANCUR-ANCONA, D.; SAURI-DUCH, E. Antioxidant compounds, antioxidant activity and phenolic content in peel from three tropical fruits from Yucatan, Mexico. **Food chemistry**, v. 166, n. 1, p. 17-22, 2015.

MUNIZ, C. R.; FREIRE, F. C.; SOARES, A. A.; COOKE, P. H.; GUEDES, M. I. The ultrastructure of shelled and unshelled cashew nuts. **Micron**, v. 54, n. 1, p. 52-56, 2013.

NIRMALADEVI, D.; VENKATARAMANA, M.; SRIVASTAVA, R. K.; UPPALAPATI, S.; GUPTA, V. K.; YLI-MATTILA, T.; TSUI, K. C.; SRINIVAS, C.; NIRANJANA, S.; CHANDRA, N. S. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.

OLIVEIRA, V. B.; YAMADA, L. T.; FAGG, C. W.; BRANDÃO, M. G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170-179, 2012.

PENG, A.; LIU, J.; LING, W.; CHEN, Z.; GAO, Y. Diversity and distribution of 16S rRNA and phenol monooxygenase genes in the rhizosphere and endophytic bacteria isolated from PAH-contaminated sites. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2015.

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

SAHARAN, B. S. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. **Life Sciences and Medicine Research**, v. 1, n. 1, p. 1-30, 2011.

SILVA, D. B.; SILVA, J. A.; JUNQUEIRA, N. T. V.; ANDRADE, L. R. M. **Frutas do cerrado**. Brasília. Embrapa Informações Tecnológica. 2001, 179 p.

SOUCHIE, E. L.; SOUZA ABBOUD, A. C.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato in vitro por microorganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, p. 53-60, 2007.

TEIXEIRA, L. C. R. S.; PEIXOTO, R. S.; CURY, J. C.; SUL, W. J.; PELLIZARI, V. H.; TIEDJE, J.; ROSADO, A. S. Bacterial diversity in rhizosphere soil from Antarctic vascular plants of Admiralty Bay, maritime Antarctica. **The ISME journal**, v. 4, n. 8, p. 989-1001, 2010.

UROZ, S.; BUÉE, M.; MURAT, C.; FREY-KLETT, P.; MARTIN, F. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 2, p. 281-288, 2010.

VANDENKOORNHUYSE, P.; MAHÉ, S.; INESON, P.; STADDON, P.; OSTLE, N.; CLIQUET, J.-B.; FRANCEZ, A.-J.; FITTER, A. H.; YOUNG, J. P. W. Active root-inhabiting microbes identified by rapid incorporation of plant-derived carbon into RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 43, p. 16970-16975, 2007.

## **CAPÍTULO I**

**Isolamento e identificação de rizobactérias solubilizadoras de fosfato  
em solo de caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum*  
Rizzini)**

## RESUMO

A interação entre plantas e rizobactérias promotoras do crescimento vegetal é benéfica devido esses micro-organismos terem características que propiciam o maior crescimento das plantas, como síntese de fitormônios, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato. A caracterização e identificação dessas bactérias colaboram para um melhor entendimento, conhecimento e potencial utilização dos micro-organismos da rizosfera. O caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizzini) é uma importante espécie nativa do cerrado, seus frutos são consumidos *in natura* ou processados e pode ser utilizada para exploração, preservação e manejo de grandes áreas do cerrado. Objetivou-se com este trabalho isolar e identificar rizobactérias solubilizadoras de fosfato cultiváveis em solo de *Anacardium othonianum* Rizzini. Para o isolamento das rizobactérias, utilizou-se 10g de fragmentos de raízes com solo aderido, que foram agitados em água peptonada esterilizada e em seguida o sobrenadante obtido foi diluído. Alíquotas foram coletadas das diluições e semeadas em placas de petri com meio GELP contendo solução de  $\text{CaHPO}_4$  (10 %). Os isolados selecionados por meio da presença do halo de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  foram submetidos a identificação molecular. Foi obtido 182 rizobactérias solubilizadoras de fosfato, que após a identificação molecular, resultaram em cinco gêneros e espécies pertencentes aos filos Proteobacteria (80%) e Firmicutes (20%). Os gêneros foram *Lysinibacillus* (0,55%), *Yokenella* (0,55%), *Klebsiella* (7,69%), *Salmonella* (18,68 %) e *Citrobacter* (72,53%). Portanto, conclui-se que em solo de *Anacardium othonianum* Rizzini possui baixa diversidade de rizobactérias solubilizadoras de fosfato cultiváveis com predominância de bactérias pertencentes ao gênero *Citrobacter*.

**Palavras – chave:** promotores do crescimento vegetal, ecologia microbiana, fósforo, filogenia, *Citrobacter*.

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas fornecem um ambiente rico em nutrientes para os micro-organismos na rizosfera, tornando possível interações benéficas com esses organismos, principalmente bactérias. Esta interação é benéfica a planta quando os micro-organismos têm características que propiciam o melhor desenvolvimento e crescimento vegetal, como síntese de fitormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de sideróforos (Pereira et al., 2012).

O fósforo (P) é um dos principais macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas. No solo é encontrado principalmente o fósforo mineral ou orgânico, contudo, na forma insolúvel não está disponível para as plantas (Behera et al., 2014). Apenas uma fração do P adicionado por meio da adubação é assimilado pelas plantas, ficando o restante indisponível devido a formação de complexos com cátions de alumínio (Al) e ferro (Fe) em solos ácidos e cálcio (Ca) em solos alcalinos, com isso pode ocorrer redução do crescimento e produção de culturas de interesse (Azziz et al., 2012; Liu et al., 2011).

Bactérias e fungos desempenham papel central no ciclo do fósforo no solo ao converter formas insolúveis para forma solúvel, o que é um fator importante para o crescimento e produção das plantas, além de reduzir a aplicação dos fertilizantes fosfatados (Behera et al., 2014; Chen et al., 2006).

As rizobactérias correspondem a ampla variedade de bactérias do solo, que em associação com as plantas influenciam de forma positiva seu crescimento, nutrição e desenvolvimento. Essa promoção do crescimento pode ocorrer de forma direta pela síntese de fitormônios (citocininas, giberelinas e auxinas), produção de sideróforos, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato ou de forma indireta por meio de mecanismos de tolerância a pragas, patógenos, seca, estresse hídrico e indução de resistência sistêmica adquirida ou induzida (Pereira et al., 2008; Singh et al., 2015).

Grande parte do conhecimento da relação micro-organismo e planta que ocorrem na rizosfera é devido a estudos com plantas cultivadas na agricultura. Porém, há um

progresso considerável na compreensão da ecologia microbiana da rizosfera de plantas não cultivadas em regiões de interesse. Estudos sobre os ecossistemas naturais, através da caracterização e identificação, colaboram para melhor entendimento, conhecimento e potencial utilização dos micro-organismos da rizosfera (Karagoz et al., 2012; Philippot et al., 2013).

Frutos nativos do cerrado têm importância econômica e social, sendo seus frutos comercializados e consumidos *in natura* ou beneficiados por indústrias alimentícias (Caetano et al., 2012). Devido sua importância econômica regional o caju-de-árvore-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizzini) destaca-se entre as frutíferas nativas do cerrado. Pertence à família Anacardiaceae, diferindo-se dos outros cajueiros devido seu porte arbóreo que pode atingir de 3 a 4 m (Bonatto; Silva, 2014). Seus frutos têm coloração que varia de amarelo a vermelho, sendo bastante apreciados para alimentação regional e sua casca, folhas e flores possui propriedades medicinais, sendo utilizados na medicina popular (Bessa et al., 2013; Dornelles et al., 2014). Objetivou-se com este trabalho isolar e identificar rizobactérias solubilizadoras de fosfato cultiváveis em solo de *Anacardium othonianum* Rizzini.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Isolamento das rizobactérias solubilizadoras de fosfato

O sistema radicular de indivíduo jovem de *Anacardium othonianum* Rizzini foi coletado na Fazenda Gameleira, localizada no município de Montes Claros-GO (16° 08' 02,9" S - 51° 17' 57,7" W), a 595m de altitude.

Para o isolamento das rizobactérias, utilizou-se 10g dos fragmentos de raízes com solo aderido, escolhidos aleatoriamente. Posteriormente, foram agitados em água peptonada esterilizada (0,1%) contendo Tween 80, por 30 min a 70 rpm em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi diluído serialmente em solução salina e alíquotas de 50 µL foram semeadas, pela técnica *pour plate*, utilizando-se aproximadamente 20 mL de meio de cultura GELP básico (glicose 10 g; extrato de levedura 0,05g; peptona 5 g e ágar 15 g), contendo solução de CaHPO<sub>4</sub> (10 %), formado pela adição de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10%) e CaCl<sub>2</sub> (10%), conforme Sylvester-Bradley et al. (1982), sendo avaliados quanto a formação de um halo transparente em volta da colônia indicando a solubilização de fosfato de cálcio (Barroso; Oliveira, 2001; Souchie et al., 2007a).

As placas foram incubadas em temperatura ambiente. O crescimento dos isolados bacterianos e o aparecimento dos halos de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  foram avaliados após quatro dias de incubação.

## 2.2. Identificação molecular das rizobactérias solubilizadoras de fosfato

Para a identificação molecular dos isolados bacterianos, o gene codificador do RNA ribossomal 16S foi amplificado pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) e, posteriormente, sequenciado. A PCR foi realizada diretamente a partir da colônia bacteriana. Uma pequena quantidade de células bacterianas foi coletada do meio de cultura e depositadas em microtubos para PCR já contendo os reagentes. A reação de PCR foi constituída de 10  $\mu\text{L}$  de tampão para PCR 5X, 1  $\mu\text{L}$  de primer fD1 (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de primer rP1 (10  $\mu\text{M}$ ), 1  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM), 0,2  $\mu\text{L}$  de GoTaq DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$  Promega) e 36,8  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ autoclavada. Os primers fD1 (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') e rP1 (5' – ACGGTTACCTTGTTACGACTT – 3') foram descritos por Weisburg et al. (1991).

A amplificação foi realizada em termociclador (modelo T100, BioRad) com o seguinte programa: desnaturação inicial a  $94^\circ\text{C}.4 \text{ min}^{-1}$ , 40 ciclos de  $94^\circ\text{C}.30 \text{ s}^{-1}$  –  $60^\circ\text{C}.30 \text{ s}^{-1}$  –  $72^\circ\text{C}.90 \text{ s}^{-1}$  e extensão final a  $72^\circ\text{C}.4 \text{ min}^{-1}$ . A verificação da amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8%, acrescido de brometo de etídio (100  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), e registrada em fotodocumentador acoplado ao transiluminador UV. Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol, segundo protocolo de Schmitz e Riesner (2006).

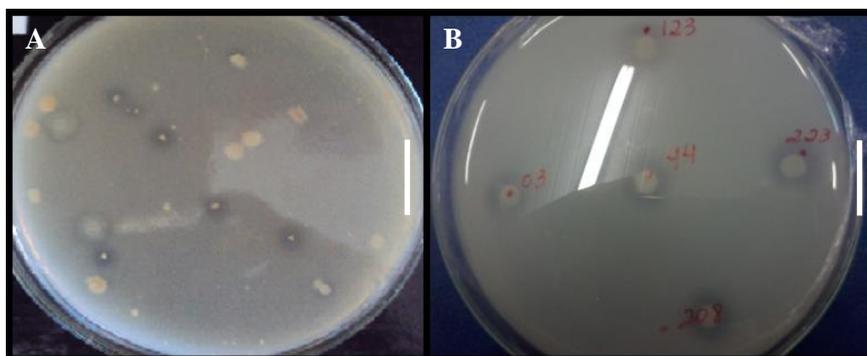
Os produtos purificados foram submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia (Sanger et al., 1977). A reação constituiu de 5  $\mu\text{L}$  de produto de PCR, 1  $\mu\text{L}$  de reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems), 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão de diluição, 0,3  $\mu\text{L}$  de primer fD1 ou rP1 (10 M) e 2,2  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ autoclavada. A reação foi realizada em termociclador (modelo T100, BioRad) com o seguinte programa: desnaturação inicial a  $95^\circ\text{C} \text{ min}^{-1}$  seguida de 25 ciclos de  $95^\circ\text{C}.5 \text{ s}^{-1}$  –  $60^\circ\text{C}.4 \text{ min}^{-1}$ . Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados pela adição de 40  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75%, seguida de centrifugação a  $12.000 \text{ g}.10 \text{ min}^{-1}$ . Foram adicionados mais 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol 75% e novamente centrifugado a  $12.000 \text{ g}.5 \text{ min}^{-1}$ . Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi seco e ressuscitado em 10  $\mu\text{L}$  de formamida e desnaturado a  $95^\circ\text{C}.2 \text{ min}^{-1}$ . O sequenciamento foi realizado em sequenciador capilar 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

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 E DISCUSSÃO

#### 3.1. Rizobactérias solubilizadoras de fosfato isoladas em solo de *Anacardium othonianum* Rizzini

A rizosfera do *Anacardium othonianum* Rizzi. é colonizada por rizobactérias capazes de solubilizar  $\text{CaHPO}_4$  *in vitro*, sendo que do total de colônias que cresceram 26% (182 rizobactérias) foram isoladas por terem a capacidade de solubilização de fosfato com aparecimento de halos de solubilização de  $\text{CaHPO}_4$  entorno das colônias bacterianas (Figura 1A e B).



**Figura 2-** Halos de solubilização de fosfato de cálcio formados por isolados bacterianos durante fase de isolamento (A) e purificação (B). Barra= 10 mm.

Os micro-organismos solubilizadores de fosfato, em sua maioria bactérias, atuam sobre o fosfato por meio de fosfatases, produzindo ácidos orgânicos e inorgânicos, disponibilizando o fósforo para as plantas, contribuindo para o aproveitamento de fontes menos solúveis (Souchie et al., 2007b). Rizobactérias capazes de solubilizar fosfato são importantes para o ciclo do P no solo e podem ser utilizadas como inoculantes para aumentar a disponibilidade desse nutriente para as plantas que geralmente está em formas pouco disponíveis (Azziz et al., 2012).

Isolados de linhagens nativas tornam-se interessantes, pois como são adaptados a diferentes plantas e tipos de solo dentro da mesma região podem ser mais competitivos do que linhagens de regiões diferentes. Com isso sua adaptação e colonização do solo mais rápida torna-se vantagem a ser explorada quando forem inoculados em plantas cultivadas na mesma região em que foram isolados (Karagoz et al., 2012).

### Identificação molecular das rizobactérias

As sequências obtidas das rizobactérias foram comparadas com sequências depositadas no banco Internacional de genes (NCBI), sendo observadas taxas de similaridade variando de 90 a 99%, para identificação dos gêneros e espécies. Somente sequências com valor acima de 95% de similaridade com o GenBank foram consideradas o mesmo organismo (Tabela 1).

As 182 rizobactérias isoladas resultaram em cinco gêneros e espécies pertencentes aos filos Proteobacteria (80%) e Firmicutes da classe Bacilli (20%). Os gêneros foram *Lysinibacillus* (0,55%), *Yokenella* (0,55%), *Klebsiella* (7,69%), *Salmonella* (18,68 %) e *Citrobacter* (72,53%) (Tabela 1)

**Tabela 1-** Identificação molecular das rizobactérias solubilizadoras de fosfato de solo de *A. othonianum* Rizzini, baseado no sequenciamento da região 16S.

Isolados	Quantidade	Classe/Ordem	GenBank	Nº Acesso no GenBank	ID (%) <sup>2</sup>	Frequência Relativa %
BRC <sup>1</sup> - 003	132	Gammaproteobacteria/ Enterobacteriales	<i>Citrobacter koseri</i>	CP000822.1	99	72,53
BRC - 013	34	Gammaproteobacteria/ Enterobacteriales	<i>Salmonella enterica</i>	CP007262.1	98	18,68
BRC - 043	14	Gammaproteobacteria/ Enterobacteriales	<i>Klebsiella oxytoca</i>	KF254665.1	99	7,69
BRC - 016	1	Gammaproteobacteria/ Enterobacteriales	<i>Yokenella regensburgei</i>	KJ397957.1	99	0,55
BRC - 023	1	Bacilli/Bacillales	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	KC540951.1	99	0,55

<sup>1</sup>BRC= identificação dos isolados em laboratório; <sup>2</sup>ID (%)= % identidade.

Corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho, Pereira et al. (2008) avaliando a ocorrência de rizobactérias em solos com diferentes tipos de manejo tiveram maior predominância do filo Proteobacteria em solo com cultivo de *Eucalyptus* sp., enquanto o filo Firmicutes estava ausente no solo sob mata. Trabalhando com palmeira-jataí (*Butia purpurascens*), Silva et al. (2015) obtiveram isolados de rizobactérias pertencentes ao filo Proteobacteria (54,4%) e Firmicutes (45,6%). Em solo rizosférico de trigo, Verma et al. (2015) observaram maior número de bactérias do filo Proteobacteria (65%), além da presença dos filos Firmicutes (26%), Actinobacteria (8%) e Bacteroidetes

(1%). Enquanto Koragoz et al. (2012) observaram a presença dos filos Proteobacteria, Firmicutes e Actinobacteria em solo ácido e alcalino coletado em diferentes regiões de plantas nativas de videira.

Em relação aos gêneros, Patel et al. (2010) trabalhando com solo obtido de diferentes espécies de plantas obtiveram rizobactérias pertencentes aos gêneros *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Bacillus*. Enquanto Ghosh et al. (2012) isolaram bactérias solubilizadoras de fosfato de solo de plantas de *Halophila ovalis* e *H. pinifolia*, pertencentes aos gêneros *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Bacillus* e *Shigella*. Sendo que os dois primeiros gêneros descritos em ambos os trabalhos também foram observados em solo de *A. othonianum* Rizz.

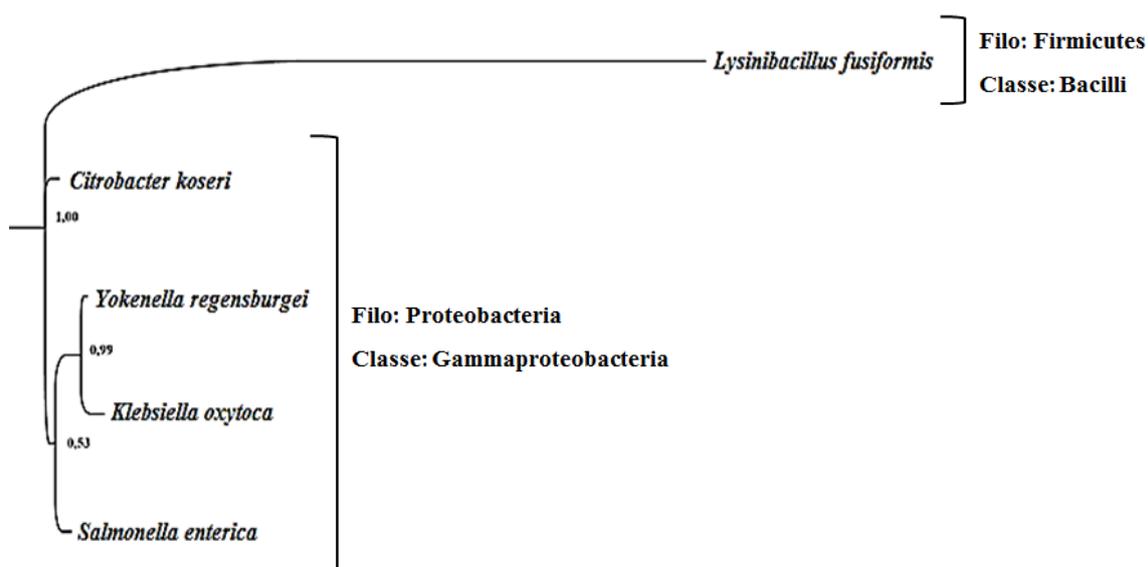
Diferente dos resultados obtidos neste trabalho, Chen et al. (2006) trabalhando com solo de área de vegetação nativa, identificaram 10 isolados de rizobactérias pertencente ao gênero *Bacillus*, nove do gênero *Rhodococcus*, sete do gênero *Arthrobacter*, seis do gênero *Serratia* e um de cada gênero *Chryseobacterium*, *Delftia*, *Gordonia* e *Phyllobacterium*. A predominância do gênero *Bacillus* foi observada em solo de macieiras de diferentes regiões (Metha et al., 2015). Maior presença de rizobactérias dos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia* e *Azospirillum* foram constatadas em solo de milho (Pedrinho et al., 2010). E os gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Agrobacterium* foram predominantes em solo rizosférico de palmeira-jataí (*Butia purpurascens*) (Silva et al., 2015).

O gênero *Citrobacter* foi citado por Rodriguez e Fraga (1999), como bactérias do solo que expressam um nível significativo de fosfatase ácida. Este é um gênero entérico que tem exemplos de bactérias diazotróficas com atividade de promoção de crescimento em vegetal, incluindo *Citrobacter freundii*, um exemplo de micro-organismo associado a plantas que proporciona seu maior crescimento através do aumento da disponibilidade de nutrientes no solo (Kennedy et al, 2004). Enquanto *Klebsiella* sp., estirpe SBP-8, sintetiza ACC (1-aminocyclopropane – 1-carboxilato) promovendo a tolerância a estresse salino e de temperatura por plantas de Trigo e seu maior crescimento (Singh et al., 2015).

Bactérias do gênero *Citrobacter* e *Klebsiella* também solubilizam fosfato através de mecanismos de produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e excreção de prótons para o meio durante a assimilação do  $\text{NH}_4^+$ , onde juntos esses mecanismos tornam formas insolúveis de fósforo em fosfato monobásico e dibásico disponíveis para as plantas (Acevedo et al., 2014). Terminar o paragrafo

O índice de diversidade de Shannon-Wiener ( $H'$ ) encontrado para as populações bacterianas de *A. othonianum* Rizz. foi de 0,69 demonstrando baixa diversidade e confirmando que a população de rizobactérias no solo desta espécie é muito uniforme e composta por linhagens pertencentes ao mesmo gênero ou espécie. O que pode ser confirmado pela predominância do filo Proteobacteria (80%) e do gênero *Citrobacter* (72,53%) no solo rizosférico desta espécie. Sendo este um trabalho pioneiro ... Esse é um índice geral de diversidade sensível à riqueza e à abundância relativa de espécies (Roesch et al., 2007). Em estudo realizado com palmeira-jataí (*Butia purpurascens*) foi obtido  $H'$  de 2,73 ao isolar e identificar rizobactérias desta espécie (Silva et al., 2015). Enquanto Metha et al. (2015) trabalhando com solo de árvores de maçã de diferentes locais obteve maior índice  $H'$  de 1,77 para uma das regiões.

Foi possível observar agrupamento por similaridade entre as espécies de rizobactérias solubilizadoras de fosfato cultiváveis isoladas de solo de *A. othonianum* Rizzini (Figura 2).



**Figura 3** - Agrupamento filogenético entre os genes 16S rRNA dos isolados de rizobactérias solubilizadoras de fosfato de *Anacardium othonianum* Rizzini.

O primeiro grupo foi composto por apenas *Lysinibacillus fusiformis* representando o filo Firmicutes e a classe Bacilli. O segundo grupo classificado como filo Proteobacteria, é composto por apenas *Citrobacter koseri*. Enquanto no outro grupo do filo Proteobacteria ocorreu dois sub-grupos, sendo um composto pelas espécies *Yokenella*

*regensburgei* e *Klebsiella oxytoca* e outro por *Salmonella enterica*. Sendo todos representantes da classe Gammaproteobacteria (Figura 1).

A identificação e caracterização de rizobactérias presentes no solo de plantas pode ajudar o desenvolvimento de inoculantes para aplicação no campo e com isso diminuir e otimizar o uso dos fertilizantes fosfatados aumentando a absorção de P pelas plantas. A solubilização de P é um fenômeno complexo, dependente de vários fatores como nutricionais, fisiológicos e de condições de crescimento tanto da planta quanto dos microorganismos (Chen et al., 2006).

O solo de *Anacardium othonianum* Rizzini demonstrou baixa diversidade de rizobactérias solubilizadoras de fosfato cultiváveis com predominância de bactérias pertencentes ao gênero *Citrobacter*. Tal resultado pode ser explicado devido a zona da rizosfera ser influenciada pelas raízes das plantas, com isso a diversidade de bactérias no solo pode ser afetada pela espécie, idade e genótipo da planta, manejo e propriedades do solo (Karagoz et al., 2012).

#### 4. CONCLUSÃO

Ocorre baixa diversidade de rizobactérias solubilizadoras de fosfato cultiváveis em solo de *Anacardium othonianum* Rizzini com predominância de bactérias pertencentes ao gênero *Citrobacter*.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, E.; GALINDO-CASTAÑEDA, T.; PRADA, F.; NAVIA, M.; ROMERO, H. M. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. **Applied Soil Ecology**, v. 80, p. 26-33, 2014.

AZZIZ, G.; BAJSA, N.; HAGHJOU, T.; TAULÉ, C.; VALVERDE, A.; IGUAL, J. M.; ARIAS, A. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 320-326, 2012.

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

BEHERAA, B. C.; SINGDEVSACHANB, S. K.; MISHRAC, R. R.; DUTTAD, S. K.; THATOIB, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangro. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 97–11098, 2014.

BESSA, L. A.; SILVA, F. G.; MOREIRA, M. A.; TEODORO, J. P. R.; SOARES, F. A. L. Growth and nutrient accumulation of *Anacardium othonianum* Rizz. seedlings grown in nutrient solution. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 73, p. 301-308, 2013.

BONATTO, C. C.; SILVA, L. P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 46-54, 2014.

CAETANO, G. S.; SOUSA, K. A.; RESENDE, O.; SALES, J. F.; COSTA, L. M. Higroscopicidade de sementes de caju-de-árvore-do-cerrado. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 4, p. 437-445, 2012.

CHEN, Y. P.; REKHA, P. D.; ARUN, A. B.; SHEN, F. T. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 33-41, 2006.

DORNELLES, P.; SILVA, F. G.; MOTA, C. S.; SANTANA, J. G. Production and quality of *Anacardium othonianum* Rizz. Seedlings grown in different substrates. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 2, p. 479-486, 2014.

GHOSH, U.; SUBHASHINI, P.; DILIPAN, E.; RAJA, S.; THANGARADJOU, T.; KANNAN, L. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from seagrass rhizosphere soil. **Journal of Ocean University of China**, v. 11, n. 1, p. 86-92, 2012.

KENNEDY, I. R.; CHOUDHURY, A. T. M. A.; KECSKE'S, M. L. Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth

promotion be better exploited? **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1229–1244, 2004.

KORAGOZ, K.; ATES, F.; KARAGOZ, H.; KOTAN, R.; ÇAKMAKÇI, R. Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from the rhizosphere of grapevine grown in alkaline and acidic soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 144-150, 2012.

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.

LIU, H.; WU, X. Q.; REN, J. H.; YE, J. R. Isolation and identification of Phosphobacteria in poplar rhizosphere from different regions of China. **Pedosphere**, v. 21, n. 1, p. 90-97, 2011.

MERTHA, P.; WALIA, A.; SHIRKOT, C. K. Functional diversity of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacteria isolated from apple trees in the Trans Himalayan region of Himachal Pradesh, India. **Biological Agriculture & Horticulture**, v. 31, n. 4, p. 265-288, 2015.

PATEL, K. J.; SINGH, A. K.; NARESHKUMAR, G.; ARCHANA, G. Organic-acid-producing, phytate-mineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). **Applied Soil Ecology**, v. 44, p. 252-261, 2010.

PEDRINHO, E. A. N.; GALDIANO JÚNIOR, R. F.; CAMPANHARO, J. C.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Identificação e avaliação de rizobactérias isoladas de raízes de milho. **Bragantia**, v. 69, n. 4, p. 905-911, 2010.

PEREIRA, G. V. M.; MAGALHÃES, K. T.; LORENZETII, E. R. A.; SOUZA, T. P.; SCHWAN, R. F. Multiphasic Approach for the Identification of Endophytic Bacterial in Strawberry Fruit and their Potential for Plant Growth Promotion. **Microbial Ecology**, v. 63, p. 405–417, 2012.

PEREIRA, R. M.; SILVEIRA, E. L.; CARARETO-ALVES, L. M.; LEMOS, E. G. M. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1921-1927, 2008.

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

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 1367-1380, 2007.

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319-339, 1999.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. **Analytical Biochemistry**, v. 354, p. 311-313, 2006.

SILVA, C. F.; SENABIO, J. A.; PINHEIRO, L. C.; SOARES, M. A.; SOUCHIE, E. L. Isolation and genetic characterization of endophytic and rhizospheric microorganisms from *Butia purpurascens* Glassman. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 32, p. 1907-1916, 2015.

SINGH, R. P.; JHA, P.; JHA, P. N. The plant-growth promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 184, p. 57-67, 2015.

SOUCHIE, E. L.; ABBOUD, A. C. S. Phosphate solubilization by microorganisms from the rhizosphere of Pigeonpea genotypes grown in diferente soil classes. **Semina**, v. 28, n. 1, p. 11-18, 2007a.

SOUCHIE, E. L.; ABBOUD, A. C. S.; CAPRONI, A. L. Solubilização de fosfato *in vitro* por microrganismos rizosféricos de guandu. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 2, p. 53-60, 2007b.

SYLVESTER-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.

VERMA, P.; YADAV, A. N.; KHANNAM, K. S.; PANJIAR, N.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K.; SUMAN, A. Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 1885-1899, 2015.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v.173, n. 2, p. 697-703, 1991.

#### Considerações finais