

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE - PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**DIVERSIDADE FUNCIONAL DA MICROBIOTA
ENDOFÍTICA E RIZOSFÉRICA DE *Hymenaea courbaril* L.
NO CERRADO E PANTANAL**

Autora: Ana Flávia de Souza Rocha
Orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Cristina Vitorino

Rio Verde – GO
Fevereiro – 2020

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E
TECNOLOGIA GOIANO - CAMPUS RIO VERDE - PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO**

**DIVERSIDADE FUNCIONAL DA MICROBIOTA
ENDOFÍTICA E RIZOSFÉRICA DE *Hymenaea courbaril* L.
NO CERRADO E PANTANAL**

Autora: Ana Flávia de Souza Rocha
Orientadora: Prof^a. Dra. Luciana Cristina Vitorino

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de Concentração: Ecologia e Conservação.

Rio Verde – GO
Fevereiro – 2020

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

Rocha, Ana Flávia de Souza
RR672d DIVERSIDADE FUNCIONAL DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA E
RIZOSPÉRICA DE *Hymenaea courbaril* L. NO CERRADO E
PANTANAL / Ana Flávia de Souza Rocha; orientadora
Dra. Luciana Cristina Vitorino; co-orientador Dr.
Raoni Ribeiro Guedes Fonseca Costa. -- Rio Verde,
2020.
84 p.

Dissertação (em Biodiversidade e Conservação) --
Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, 2020.

1. Biodiversidade. 2. Micro-organismos. 3.
Bioprospecção. I. Vitorino, Dra. Luciana Cristina,
orient. II. Costa, Dr. Raoni Ribeiro Guedes Fonseca,
co-orient. III. Título.



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR PRODUÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DO IF GOIANO

Com base no disposto na Lei Federal nº 9.610/98, AUTORIZO o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, a disponibilizar gratuitamente o documento no Repositório Institucional do IF Goiano (RIIF Goiano), sem ressarcimento de direitos autorais, conforme permissão assinada abaixo, em formato digital para fins de leitura, download e impressão, a título de divulgação da produção técnico-científica no IF Goiano.

Identificação da Produção Técnico-Científica

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Tese | <input type="checkbox"/> Artigo Científico |
| <input checked="" type="checkbox"/> Dissertação | <input type="checkbox"/> Capítulo de Livro |
| <input type="checkbox"/> Monografia - Especialização | <input type="checkbox"/> Livro |
| <input type="checkbox"/> TCC - Graduação | <input type="checkbox"/> Trabalho Apresentado em Evento |
| <input type="checkbox"/> Produto Técnico e Educacional - Tipo: _____ | |

Nome Completo do Autor: Ana Flávia de Souza Rocha

Matrícula: 2018102310840011

Título do Trabalho: DIVERSIDADE FUNCIONAL DA MICROBIOTA ENDOFÍTICA E RIZOSFÉRICA DE *Hymenaea courbaril* L. NO CERRADO E PANTANAL

Restrições de Acesso ao Documento

Documento confidencial: Não Sim, justifique: _____

Informe a data que poderá ser disponibilizado no RIIF Goiano: ___/___/___

O documento está sujeito a registro de patente? Sim Não

O documento pode vir a ser publicado como livro? Sim Não

DECLARAÇÃO DE DISTRIBUIÇÃO NÃO-EXCLUSIVA

O/A referido/a autor/a declara que:

- o documento é seu trabalho original, detém os direitos autorais da produção técnico-científica e não infringe os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade;
- obteve autorização de quaisquer materiais incluídos no documento do qual não detém os direitos de autor/a, para conceder ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano os direitos requeridos e que este material cujos direitos autorais são de terceiros, estão claramente identificados e reconhecidos no texto ou conteúdo do documento entregue;
- cumpriu quaisquer obrigações exigidas por contrato ou acordo, caso o documento entregue seja baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não o Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano.

Rio Verde, 21/04/2020
Local Data

Ana Flávia de Souza Rocha
Assinatura do Autor e/ou Detentor dos Direitos Autorais

Ciente e de acordo:

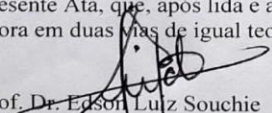
Assinatura do(a) orientador(a)

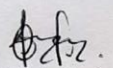


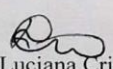
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO
CAMPUS RIO VERDE - GO
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO

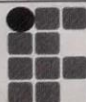
ATA Nº 40 (QUARENTA)
BANCA EXAMINADORA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos vinte e um dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte, às 08:00 (oito horas), reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Cristina Vitorino (orientadora), Prof. Dr. Edson Luiz Souchie (avaliador externo) e Prof.^a Dr.^a Cintia Faria da Silva (avaliadora externa), sob a presidência do primeiro, em sessão pública realizada no Auditório do prédio da DPGPI, no IF Goiano – Campus Rio Verde, para procederem a avaliação da defesa de Dissertação, em nível de mestrado, da autoria de **Ana Flávia de Souza Rocha**, discente do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A sessão foi aberta pela presidente da Banca Examinadora, Prof.^a Dr.^a Luciana Cristina Vitorino, que fez a apresentação formal dos membros da Banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da Dissertação para, em 30 min., proceder à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se a avaliação da defesa. Tendo-se em vista as normas que regulamentam o Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, e procedida às correções recomendadas, a Dissertação foi **APROVADA**, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de **MESTRE EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**, na área de concentração Conservação dos Recursos Naturais, pelo Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega na secretaria do PPGBio da versão definitiva da Dissertação, com as devidas correções. Assim sendo, a defesa perderá a validade, se não cumprida essa condição, em até 60 (sessenta) dias da sua ocorrência. A Banca Examinadora recomendou a publicação dos artigos científicos oriundos dessa Dissertação em periódicos de circulação nacional e/ou internacional, após procedida as modificações sugeridas. Cumpridas as formalidades da pauta, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de Dissertação de Mestrado, e para constar, eu, Renata Maria de Miranda Rios Resende, secretária do PPGBio, lavrei a presente Ata, que, após lida e achada conforme, será assinada pelos membros da Banca Examinadora em duas vias de igual teor.


Prof. Dr. Edson Luiz Souchie
Avaliador externo
IF Goiano / Rio Verde


Prof.^a Dr.^a Cintia Faria da Silva
Avaliadora externa
IESRIVER / Rio Verde


Prof.^a Dr.^a Luciana Cristina Vitorino
Presidente da Banca
IF Goiano / Rio Verde



INSTITUTO FEDERAL DE
EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO
Campus Rio Verde - GO

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano
Campus Rio Verde
CEP 75901-970 – Caixa Postal 66
Fone: (64) 3620-5643. Fax: (64) 3620-5640
Rio Verde GO

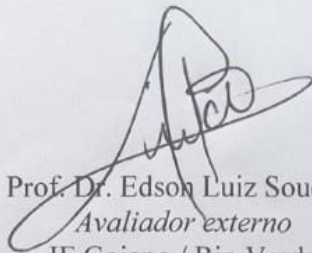
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

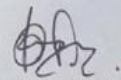
DIVERSIDADE FUNCIONAL DA MICROBIOTA
ENDOFÍTICA E RIZOSFERICA DE *Hymenaea coubaril*, NO
CERRADO E PANTANAL


Autora: Ana Flávia de Souza Rocha
Orientadora: Luciana Cristina Vitorino

TITULAÇÃO: Mestre em Biodiversidade e Conservação – Área de
concentração Conservação dos Recursos Naturais.

APROVADA em 21 de fevereiro de 2020.


Prof. Dr. Edson Luiz Souchie
Avaliador externo
IF Goiano / Rio Verde


Prof.ª Dr.ª Cintia Faria da Silva
Avaliadora externa
IESRIVER / Rio Verde


Prof.ª Dr.ª Luciana Cristina Vitorino
Presidente da Banca
IF Goiano / Rio Verde

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sustentar os meus passos para superar as dificuldades e os medos do caminhar. À minha família, em especial, minha mãe Icanuza de Souza e meu pai José Rocha de Jesus, que, do jeito deles, sempre torceram por mim.

A meu esposo Raoni Ribeiro Guedes Fonseca Costa, por me apoiar, incentivar, por ser aquele que não me deixou desistir, mesmo quando eu achava que não conseguiria. Pelos ensinamentos e paciência durante todo o tempo de mestrado, que de forma ilustre me apoiou e foi parte primordial para realização deste trabalho. Por cuidar tão bem de nossa filha quando eu não estava. Obrigada, meu amor!

À minha filha Valentina Rocha Fonseca, que, ainda tão pequena, foi grande na sabedoria de que a mamãe precisava se ausentar de casa para estudar, que a mamãe precisava de silêncio quando estava no computador e não podia dar atenção, por todo bom humor e diversão nas horas de nervosismo.

À minha orientadora, prof^a Dr^a. Luciana Cristina Vitorino, por concretizar minha entrada no mestrado quando aceitou me orientar, por me ensinar a trilhar o caminho até a defesa da dissertação, que, mesmo com muitos afazeres, sempre doou seu tempo para me ajudar. Por quem tenho enorme carinho, respeito e admiração. Muito obrigada!

A Sônia Carolina e Juarez Fonseca, pelo acolhimento em sua casa, com tanto amor e carinho. Muito obrigada!

À minha companheira das análises, Lidiane Maria dos Santos Moreira, pela incansável dedicação na execução desse projeto, pela parceria, companheirismo e amizade. Obrigada por tudo!

A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Agrícola, que tornou os dias mais leves e divertidos, em especial, Kelly Maria Zanuzzi Palharini, Fellipe Oliveira

da Silva, Bárbara Gonçalves Cruvinel e Cintia Faria da Silva, por me auxiliarem em diversos momentos, sanando minhas dúvidas, que eram muitas no início.

Ao pessoal do Laboratório de Ecofisiologia e Produtividade Vegetal, professor Dr. Alan Carlos Costa, Dr. Adinan Alves Silva e Dr^a. Priscila Ferreira Batista, que sempre estiveram dispostos a me ajudar com toda simpatia e eficiência.

Ao Laboratório de Nutrição Mineral e Propagação de Plantas, em especial, à professora Dr^a. Layara Alexandre Bessa, Daniele de Cássia Vieira de Souza e Lucas Loram-Lourenço, pelo auxílio e contribuição na condução da pesquisa. Muito obrigada!

Ao Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos os professores que contribuíram com a minha formação, desde a infância até essa fase. Gratidão imensa ao trabalho de vocês, que abriram os caminhos da minha formação. Em especial, a todos os professores da Universidade Estadual de Goiás – Campus Quirinópolis e ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, pela dedicação e ensinamentos repassados durante toda minha jornada de acadêmica.

Obrigada aos professores que aceitaram o convite de contribuir com esse trabalho, participando da banca de defesa. Prof. Dr. Edson Luiz Souchie e Prof^a. Dr^a. Cintia Faria da Silva, o trabalho de vocês é sem dúvida inspirador e certamente serão as contribuições mais valiosas.

Ao IF Goiano, seus departamentos, secretárias, programas que durante o período foram importantes para concretização desse projeto. À Fapeg, pela concessão de uma bolsa de estudos.

Enfim, agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para o êxito de minha trajetória.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Ana Flávia de Souza Rocha, natural de Uberlândia - MG, filha de Icanuza de Souza e José Rocha de Jesus. Sua formação profissional foi iniciada em 2014, no curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Goiás - Campus Quirinópolis, concluindo a graduação em 2017. Em 2018/1 iniciou seu curso *Stricto sensu*, Mestrado em Biodiversidade e Conservação no IF Goiano – Campus Rio Verde, concluindo-o em fevereiro de 2020/1.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVOS	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4. CAPÍTULO I: Atributos nutricionais do solo afetam a diversidade funcional da microbiota endofítica e rizosférica de <i>Hymenaea courbaril</i> L.....	8
RESUMO	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
4.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
4.2.1. Obtenção do material vegetal e características do solo.....	12
4.2.2. Isolamento dos micro-organismos endofíticos radiculares.....	13
4.2.3. Isolamento dos micro-organismos rizosféricos.....	14
4.2.4. Purificação e manutenção dos endofíticos e rizosféricos.....	14
4.2.5. Coloração de Gram e classificação das bactérias.....	14
4.2.6. Avaliação da diversidade funcional.....	15
4.2.7. Avaliação dos traços funcionais.....	15

4.2.7.1. Avaliação da capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, fosfato de ferro e fosfato de alumínio.....	15
4.2.7.2. Avaliação da capacidade de síntese de ácido indol acético (AIA).....	15
4.2.7.3. Avaliação da antibiose a <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	16
4.2.7.4. Avaliação da produção da enzima ACC desaminase.....	16
4.2.7.5. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo.....	17
4.2.8. Delineamento experimental e análises estatísticas.....	17
4.3. RESULTADOS.....	19
4.4. DISCUSSÃO.....	30
4.4.1. Caracterização dos micro-organismos.....	30
4.4.2. Diversidade funcional.....	31
4.4.3. Diversidade funcional e tamanho do efeito das características do solo.....	32
4.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
4.6 REFERÊNCIAS.....	35
5. CAPÍTULO II: Traços funcionais da microbiota endofítica radicular e rizosférica de <i>Hymenaea coubaril</i> L., amostrada em Cerrado e no Pantanal.....	39
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
5.1. INTRODUÇÃO.....	42
5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
5.2.1. Obtenção do material vegetal.....	43
5.2.2. Isolamento dos micro-organismos endofíticos radiculares.....	44
5.2.3. Isolamento dos micro-organismos rizosféricos.....	44
5.2.4. Purificação e manutenção dos endofíticos e rizosféricos.....	45
5.2.5. Avaliação dos traços funcionais.....	45
5.2.5.1. Avaliação da capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, fosfato de ferro e fosfato de alumínio.....	45
5.2.5.2. Avaliação da capacidade de síntese de ácido indol acético (AIA).....	45
5.2.5.3. Avaliação da antibiose a <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Fusarium</i> sp.....	46
5.2.5.4. Avaliação da produção da enzima ACC desaminase.....	46
5.2.6. Delineamento experimental e análises estatísticas.....	47
5.3. RESULTADOS.....	47

5.3.1. Capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, fosfato de ferro e fosfato de alumínio.....	47
5.3.2. Capacidade de síntese de ácido indol acético (AIA).....	50
5.3.3. Capacidade de síntese de nitrogênio.....	52
5.3.4. Avaliação da antibiose a <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	53
5.3.5. Produção da enzima ACC desaminase.....	57
5.4. DISCUSSÃO.....	58
5.4.1. Avaliação da capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, fosfato de ferro e fosfato de alumínio.....	58
5.4.2. Síntese de AIA.....	60
5.4.3. Antibiose a fitopatógenos.....	60
5.4.4. Síntese de ACC desaminase.....	61
5.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
5.6. REFERÊNCIAS.....	63

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO I: Atributos nutricionais do solo afetam a diversidade funcional da microbiota endofítica e rizosférica de *Hymenaea courbaril* L.

Tabela 1. Classificação de micro-organismos isolados de raízes e solo rizosférico de *H. courbaril* dos biomas Pantanal e Cerrado, de acordo com sua eficiência em executar diferentes traços funcionais.....18

CAPÍTULO II: Traços funcionais da microbiota endofítica radicular e rizosférica de *Hymenaea courbaril* L., amostrada em Cerrado e Pantanal

Tabela 1. Solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO_4), de alumínio (AlPO_4) e de ferro (FePO_4) por bactérias obtidos de raízes e rizosfera de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado.....48

Tabela 2. Solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO_4), de alumínio (AlPO_4) e de ferro (FePO_4) por bactérias endofíticas e rizosféricas de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Pantanal, MS.....49

Tabela 3. Solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO_4), de alumínio (AlPO_4) e de ferro (FePO_4) por fungos obtidos de raízes e rizosfera de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado.....50

Tabela 4. Solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO ₄), de alumínio (AlPO ₄) e de ferro (FePO ₄) por fungos endofíticos e rizosféricos de <i>Hymenaea courbaril</i> , amostrada no Pantanal, MS.....	50
Tabela 5. Produção de ácido indol-acético (AIA) <i>in vitro</i> por bactérias e fungos endofíticos e rizosféricos de <i>Hymenaea courbaril</i> , amostrada no Cerrado.....	51
Tabela 6. Produção de ácido indol-acético (AIA) <i>in vitro</i> por bactérias e fungos endofíticos e rizosféricos de <i>Hymenaea courbaril</i> , amostrada no Pantanal, MS.....	52
Tabela 7. Avaliação de bactérias (Pantanal) endofíticas e rizosféricas de <i>Hymenaea courbaril</i> em antibiose a <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	53
Tabela 8. Avaliação dos fungos (Pantanal) endofíticos e rizosféricos de <i>Hymenaea courbaril</i> em antibiose a <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	54
Tabela 9. Avaliação de bactérias (Cerrado) endofíticas e rizosféricas de <i>Hymenaea courbaril</i> , em antibiose a <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Fusarium</i> sp....	55
Tabela 10. Avaliação de fungos (Cerrado) endofíticos e rizosféricos de <i>Hymenaea courbaril</i> em antibiose a <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	56
Tabela 11. Produção de ACC desaminase <i>in vitro</i> por bactérias endofíticas e rizosféricas de <i>Hymenaea courbaril</i> , amostrada no Pantanal e no Cerrado.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO I: Atributos nutricionais do solo afetam a diversidade funcional da microbiota endofítica e rizosférica de *Hymenaea courbaril* L.

Figura 1. Percentual de micro-organismos isolados endofíticos em raízes e solo de rizosfera de *H. courbaril* nos biomas Cerrado e Pantanal.....20

Figura 2. Classificação de grupos microbianos (Gram +, Gram - e fungos) isolados de *Hymenaea courbaril* dos biomas Pantanal e Cerrado, de acordo com a intensidade da expressão de diferentes traços funcionais.....21

Figura 3. Classificação dos micro-organismos endofíticos radiculares e rizosféricos isolados de *Hymenaea courbaril* dos biomas Pantanal e Cerrado, de acordo com a intensidade da expressão de diferentes traços funcionais.....23

Figura 4. Diversidade funcional dos micro-organismos endofíticos radiculares e rizosféricos isolados de *Hymenaea courbaril* dos biomas Pantanal e Cerrado, de acordo com a intensidade da expressão de diferentes traços funcionais.....24

Figura 5. Comparação entre Biomassa microbiana, Carbono Orgânico, Matéria orgânica e pH do solo rizosférico de *Hymenaea courbaril* dos biomas Pantanal e Cerrado.....25

Figura 6. Tamanho de Efeito d de Cohen's (DZ) e intervalo de confiança a 95% de probabilidade (95% IC) de: a) N da raiz; b) N parte aérea; c) P parte aérea; P da raiz; e) P do solo; f) K do solo; g) Ca do solo; h) Mg do solo; i) Cu do solo; j) Fe da raiz; k) Fe da parte aérea, l) Fe do solo; m) Mn dos solo; n) Zn do solo; o) Al do solo; p) pH do solo; q) Matéria orgânica; r) Saturação de Al (M%) do solo; s) CTC do solo e; t) Carbono orgânico total sobre a: Biomassa microbiana do solo; Solubilização de CaHPO_4 ; Solubilização de AlPO_4 ; Solubilização de FePO_4 ; Síntese de AIA; Síntese de ACC Desaminase; Antibiose a *Fusarium sp.*; Antibiose a *Sclerotinia sclerotiorum*; Antibiose a *Rhizoctonia sp.*, obtidos de micro-organismos endófitos e rizosféricos isolados de *Hymenaea courbaril* do Pantanal.....27

Figura 7. Tamanho de Efeito d de Cohen's (DZ) e intervalo de confiança a 95% de probabilidade (95% IC) de: a) N da raiz; b) N parte aérea; c) P da parte aérea; d) P da raiz; e) P do solo; f) K do solo; g) Ca do solo; h) Mg do solo; i) Cu do solo; j) Fe da raiz; k) Fe da parte aérea, l) Fe do solo; m) Mn dos solo; n) Zn do solo; o) Al do solo; p) pH do solo; q) Matéria orgânica; r) Saturação de Al (M%) do solo; s) CTC do solo e; t) Carbono orgânico total, sobre a: Biomassa microbiana do solo; Solubilização de CaHPO_4 ; Solubilização de AlPO_4 ; Solubilização de FePO_4 ; Síntese de AIA; Síntese de ACC Desaminase; Antibiose a *Fusarium sp.*; Antibiose a *Sclerotinia sclerotiorum*; Antibiose a *Rhizoctonia sp.*, obtidos de micro-organismos endófitos e rizosféricos isolados de *Hymenaea courbaril* do Cerrado.....28

Figura 8. Análises de Componentes Principais (PCA) relativas a PC1 e PC2, obtidas de dados de traços funcionais e grupos de micro-organismos endófitos e rizosféricos, isolados de *Hymenaea courbaril* nos biomas Pantanal e Cerrado. a) Biplot de grupos de micro-organismos e variáveis (traços funcionais), b) gráfico de variáveis (traços funcionais), c) Coordenadas de grupamento de micro-organismos por local avaliado.....29

CAPÍTULO II: Traços funcionais da microbiota endofítica radicular e rizosférica de *Hymenaea courbaril* L., amostrada em Cerrado e Pantanal

Figura 1. A: Teste para avaliação da capacidade de fixação de nitrogênio por microorganismos simbióticos isolados de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado e Pantanal. Tratamento controle com o *Azospirillum brasilense*, em que é possível ver o biofilme e a mudança da cor do meio; B: tratamento com a bactéria isolada em que não houve presença da película e nem mudança de cor do meio.....53

Figura 2. Teste para avaliação da capacidade de inibitória de bactérias simbióticas isoladas de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Pantanal. A: Antagonismo da bactéria HPAEB7 a *Fusarium* sp.; B. Antagonismo da bactéria HPAR27 a *Sclerotinia sclerotiorum*.....54

Figura 3. Teste para avaliação da capacidade de inibitória de fungos simbióticos isolados de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Pantanal. A: Antagonismo do fungo HPAF5 a *Fusarium* sp.; B. Antagonismo do fungo HPAF4 a *Sclerotinia sclerotiorum*55

Figura 4. Teste para avaliação da capacidade de inibitória de bactérias simbióticas isoladas de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado. A: Antagonismo da bactéria HCEB7 a *Fusarium* sp.; B. Antagonismo da bactéria HCEB4 contra *Sclerotinia sclerotiorum*..... 56

Figura 5. Teste para avaliação da capacidade de inibitória de bactérias simbióticas isoladas de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado. A: Antagonismo do fungo HCEF10 contra *Fusarium* sp.; B: Antagonismo do fungo HCEF3 contra *Rhizoctonia* sp.; C: Antagonismo do fungo HCEF8 contra *Sclerotinia sclerotiorum*.....57

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

μL	Micro litro
ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato
AIA	Ácido indolacético
NA	Ágar nutriente
BDA	Ágar batata dextrose
CaHPO_4	Fosfato de cálcio
DO	Densidade óptica
FePO_4	Fosfato de ferro
AlPO_4	Fosfato de alumínio
H'	Índice de Shannon
M	Molar
ml	Mililitro
NaCl	Cloreto de sódio nm Nanômetro
pH	Potencial de hidrogênio CaCl_2
v/v	Volume/volume
P	Fósforo
N	Nitrogênio
Ca	Cálcio
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
Al	Alumínio
K	Potássio
Cu	Cobre
Zn	Zinco
Fe	Ferro
M.O	Matéria orgânica
CTC ..	Capacidade de troca catiônica

RESUMO

ROCHA, ANA FLÁVIA DE SOUZA. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde – GO, fevereiro de 2020. **Diversidade funcional da microbiota endofítica e rizosférica de *Hymenaea courbaril* L. no Cerrado e Pantanal.** Orientadora: Luciana Cristina Vitorino. Coorientadores: Dra. Juliana de Fátima Sales; Dra. Layara Alexandre Bessa; Dr. Raoni Ribeiro Guedes Fonseca Costa.

A microbiota do solo pode influenciar na manutenção da biodiversidade, na participação da ciclagem de nutrientes, promovendo crescimento vegetal, realizando antibiose a patógenos e até auxiliando na reparação ambiental pelo estabelecimento de associação com as plantas. Tais relações são alvo de interesse de pesquisadores e têm diversas aplicações ecológicas e biotecnológicas. Este estudo é o primeiro relato da diversidade microbiana associada à *Hymenaea courbaril*. Objetivou-se com esse estudo avaliar o efeito dos atributos nutricionais do solo sobre os traços funcionais da microbiota endofítica radicular e rizosférica de *Hymenaea courbaril*, amostrada em Cerrado e Pantanal, e também avaliar a funcionalidade desta microbiota com vistas à promoção do crescimento vegetal. Amostras de raízes e solo rizosférico foram obtidas de espécimes coletados no Cerrado e Pantanal. Para este estudo, foram feitas a caracterização nutricional do solo e os testes de solubilização dos fosfatos de CaHPO_4 , AlPO_4 ou FePO_4 , síntese de AIA, enzima ACC desaminase bem como a ação antagonista frente aos fitopatógenos *Fusarium* sp. *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*. Foram isolados um total de 56 bactérias e 21 fungos, tendo sido verificado que características do solo como pH, M.O, Fe da raiz, Fe da parte aérea, Fe do solo e Mn do solo exerceram efeito sobre a funcionalidade da comunidade microbiana. Em diferentes proporções, foi detectada capacidade de alguns isolados em solubilizar fosfatos CaHPO_4 , FePO_4 e AlPO_4 , produzir o fitormônio auxina, enzima ACC desaminase, bem como terem apresentado ação antagonista a *Fusarium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia* sp. Conclui-se que existem micro-organismos endofíticos e rizosféricos associados a *Hymenaea courbaril* com potencial para promoção do crescimento vegetal a serem explorados para produção de bioinoculantes.

PALAVRAS-CHAVE: biodiversidade, micro-organismos, bioprospecção.

ROCHA, ANA FLÁVIA DE SOUZA. Federal Institute of Goiás – Rio Verde Campus – Goiás, Brazil, February 2020. **Functional diversity of the endophytic and rhizospheric microbiota of *Hymenaea courbaril* L. in the Cerrado and Pantanal.** Supervisor: Luciana Cristina Vitorino. Co-supervisors: Dr. Juliana de Fátima Sales; Dr. Layara Alexandre Bessa; Dr. Raoni Ribeiro Guedes Fonseca Costa.

ABSTRACT

The soil microbiota can influence the maintenance of biodiversity, contribute to nutrient cycling, promote plant growth, establish antibiosis to pathogens, and even help repair the environment, by establishing associations with plants. These relationships are of considerable interest to researchers, given that they may have numerous ecological and biotechnological applications. This study is the first report on the diversity of the microbiota associated with *Hymenaea courbaril*. The study evaluated the effects of the nutritional attributes of the soil on the functional features of the radicular, endophytic, and rhizospheric microbiota of *Hymenaea courbaril*, sampled in the Cerrado savanna and Pantanal wetlands, and the functionality of this microbiota for the promotion of plant growth. Samples of the roots and rhizospheric soil were obtained from specimens collected in the Cerrado and Pantanal. The study was based on the nutritional analysis of the soil and tests for the solubilization of phosphates CaHPO_4 , AlPO_4 , and FePO_4 , the synthesis of AIA and the enzyme ACC desaminase, as well as antagonist action toward the phytopathogens *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., and *Sclerotinia sclerotiorum*. A total of 56 bacteria and 21 fungi were isolated, and the analyses indicated that soil characteristics, such as the pH, organic matter, Fe in the root, plant, and soil, and Mn in the soil had an effect on the functionality of the microbial community. The analyses also determined the capacity, in different degrees, of some of the isolates to solubilize phosphates, CaHPO_4 , FePO_4 , and AlPO_4 , synthesize the phytohormone auxin and the ACC desaminase enzyme, as well as antagonistic action against *Fusarium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Rhizoctonia* sp. Overall, the results of the study indicate the existence of endophytic and rhizospheric microorganisms associated with *Hymenaea courbaril* that have the potential to promote plant growth, and may be exploited for the production of bioinoculants.

KEYWORDS: biodiversity, microorganisms, bioprospecting.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é formado por biomas de características distintas: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Cada um desses ambientes abriga diferentes tipos de flora e fauna (MMA, 2019). Na região Centro-Oeste, há predomínio dos biomas Cerrado e Pantanal. O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro (MMA, 2019). As espécies de plantas que vivem em suas fitofisionomias desenvolveram adaptações para solos de baixa fertilidade, ácidos, com altos teores de alumínio e baixa precipitação média anual (Oliveira et al., 2002).

Esse bioma é um dos cinco hotspots de biodiversidade da América do Sul, compreendendo um número significativo de espécies endêmicas (Joppa et al., 2011). O bioma Pantanal é considerado uma das maiores extensões úmidas contínuas do planeta. Os endemismos são raros por ser uma planície recente, estruturada já no quaternário, outro fator que contribui são as barreiras geográficas que favorecem o processo de especiação entre a planície e os domínios em seu entorno (Cerrado, Amazônico, Atlântico) e a região do Chaco, abrigando uma biodiversidade com mais de 2.000 plantas (Alho, 2008; Pott et al., 2011; Alho et al., 2011).

Uma espécie comum aos dois biomas é *Hymenaea courbaril*, popularmente conhecida como jatobá. Essa espécie tem sido indicada para a recuperação de áreas degradadas e vem sendo foco de trabalhos científicos em diversas áreas como fisiologia e bioquímica vegetal, biotecnologia e melhoramento genético de plantas (Paiva, 2003; Oliveira et al., 2011). Seus frutos, folhas, sementes, cascas e madeira são usados nas indústrias e têm expressiva importância econômica (Zuba et al., 2010; Costa et al., 2011). É uma espécie de ampla distribuição geográfica, que se desenvolve satisfatoriamente em ambientes com diferentes características edafoclimáticas.

No entanto, não somente a fauna e a flora dos biomas são influenciadas pelas características edafoclimáticas locais, mas também a microbiota do solo de rizosférico e endofíticos (Leff et al., 2015), sendo as variáveis ambientais mais relevantes para o estabelecimento da microbiota simbiótica a plantas, pH, CTC, matéria orgânica, teores de P e N. Deste modo, a qualidade ambiental pode ser medida pela diversidade biológica local, entre elas a microbiana, sendo a biomassa microbiana considerada um excelente bioindicador de qualidade dos solos, uma vez que atua nos

processos biogeoquímicos, refletindo o nível de degradação ou alterações na qualidade do solo e do ambiente (Hoffmann et al., 2018).

Deste modo, em um contexto ecológico, a relação planta x micro-organismo tem merecido destaque, principalmente no que diz respeito à diversidade biológica e funcional de micro-organismos que podem desenvolver associações benéficas com as plantas, que influenciam a nutrição, o crescimento e sua resistência a patógenos (Gaggia et al., 2013; Santoyo et al., 2016).

A influência dos micro-organismos que vivem associados simbioticamente à planta está relacionada às suas atividades metabólicas únicas, que possibilitam a promoção do crescimento vegetal de forma direta ou indireta (Compant et al., 2010).

Como ação direta, está a expressão de traços funcionais associados à capacidade de fazer a fixação biológica de nitrogênio (Ashraf et al., 2011), solubilização de fosfatos (Rodriguez et al., 2009), produção de fitormônios como auxinas, giberelinas e citocininas e atividade da ACC desaminase (Cassán et al., 2009; Siddikee et al., 2010). Indiretamente, agem por meio do controle biológico de fitopatógenos (Wang et al., 2009; Pandya et al., 2015). E, desta forma, podem ser fonte de novos compostos químicos e biológicos, com propriedades antimicrobianas de ampla utilização industrial (Strobel, 2003).

Entre os diversos efeitos destes micro-organismos nas plantas, também são verificados ajuste osmótico, controle da abertura e fechamento estomático, modificação da morfologia radicular, aumento da eficiência fotossintética, aumento da captação e alteração do acúmulo de minerais, suprimento de vitaminas essenciais e metabolismo do nitrogênio (Figueiredo et al., 2008).

Esses micro-organismos podem viver externa ou internamente na planta associada em um nicho endofítico e/ou rizosférico. Os endofíticos vivem no interior dos tecidos vegetais sem causar prejuízos e podem não apenas promover o crescimento da planta, mas também ajudar o hospedeiro a tolerar condições de estresse e inibir a ação dos fitopatógenos (Hardoim et al., 2015; Santos et al., 2011; Mehnz, 2011). Em contrapartida, esses micro-organismos encontram em seu hospedeiro um habitat livre da concorrência com outros micro-organismos. Já os rizosféricos habitam e obtêm seus nutrientes da rizosfera. Vivem nos solos ao redor das raízes, onde ocorre a maior parte das interações entre micro-organismos e plantas, sendo considerada uma das interfaces mais dinâmicas da Terra (Philippot et al., 2013).

O conhecimento destas interações tem sido explorado visando à sua aplicação na agricultura, seja como biofertilizantes, biocontrole de pragas e doenças ou como promotores do crescimento vegetal (Compant et al., 2010). Como exemplo, podemos citar a busca por micro-organismos solubilizadores de P. O fósforo (P) é um dos principais macronutrientes essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, dado seu papel nos processos estruturais, funcionais e de transferência de energia (Parentoni et al., 2011). Existem grandes reservas de P em formas insolúveis no solo, e sua alta reatividade com elementos como alumínio (AlPO_4), ferro (FePO_4) e cálcio (CaHPO_4) o torna indisponível para as plantas.

Entre as bactérias da rizosfera, algumas são capazes de secretar ácidos orgânicos e fosfatases, que facilitam a conversão do P de formas insolúveis em solúveis, tornando-o disponível para as plantas (Chen et al., 2006; Venieraki et al., 2011). E, considerando que solos do Cerrado são extremamente intemperizados, com alta adsorção química, baixa disponibilidade de P e predominância de óxidos de Fe e Al (Reatto et al., 1998; Lopes et al., 2012), o uso destes micro-organismos não só possibilitaria a promoção do crescimento vegetal, como também minimizaria a necessidade do uso da fertilização química. Cabe ressaltar que as fontes de P não são renováveis, portanto, finitas, além de ter um custo agregado e gerar impactos ambientais.

Alguns micro-organismos desempenham papéis importantes na tolerância das plantas a estresses ambientais, entre eles o hídrico, condições essas comuns na região dos cerrados, principalmente durante o inverno. Estes micro-organismos têm capacidade de produzir a enzima ACC desaminase, que diminui a produção do etileno nas raízes de plantas, resultando no seu alongamento (Prigent-combaret et al., 2008; Vurukonda et al., 2016), promovendo, por consequência, seu crescimento mesmo em condições de estresse hídrico. A promoção do crescimento vegetal também pode ocorrer pela síntese do ácido indolacético (AIA) (Golubev et al., 2011; Gaggia et al., 2013), que pode favorecer a planta no alongamento de suas raízes e no aumento de pelos radiculares, o que favorece a captação de nutrientes e água.

Por outro lado, o controle biológico de fitopatógenos e pragas tem sido uma das aplicações da funcionalidade desta microbiota. Alguns fungos são produtores de substâncias secundárias que podem atuar como inibidores de herbivoria (Mahapatra e Banerjee, 2012; Venugopalan e Srivastava, 2015; Musavi et al., 2015). Outros micro-organismos sintetizam biomoléculas que podem atuar diretamente no controle

biológico de outros micro-organismos fitopatogênicos, nematoides e insetos (Aktar et al., 2014; Parmar et al., 2015).

Diante do exposto, estudos que visam a isolar, avaliar e identificar micro-organismos que têm um ou mais traços funcionais, sejam eles efetivos na promoção direta ou indireta do crescimento e produtividade vegetal, são fundamentais para o melhor entendimento das relações ecológicas planta-micro-organismo, além da possibilidade de explorar estes conhecimentos em prol de uma agricultura mais sustentável.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos atributos nutricionais do solo sobre a diversidade funcional da microbiota endofítica radicular e rizosférica cultivável de *Hymenaea courbaril*, amostrada em Cerrado e Pantanal, e também avaliar a funcionalidade desta microbiota com vistas à promoção do crescimento vegetal.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKTAR, M.T.; HOSSAIN, K.S; BASHAR, M.A. Antagonistic potential of rhizosphere fungi against leaf spot and fruit rot pathogens of brinjal. **Bangladesh Journal of Botany** 43(2): 213-217, 2014.

ALHO, C.J.R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. **Brazilian Journal of Biology**, n.200, p.957-66, 2008.

ALHO, C.J.R; SABINO J. A conservation agenda for the Pantanal's biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, n.1, p.327-35, 2011.

ASHRAF, M.; AKRAM, N.A.; ALQURAINY, F.; FOOLAD, M.R. Drought tolerance: roles of organic osmolytes, growth regulators, and mineral nutrients. **Advances in Agronomy**, v.111, p.249-296, 2011.

CASSÁN, F.; MAIALE, S.; MASCIARELLI, O.; VIDAL, A.; LUNA, V.; RUIZ, O. Cadaverine production by *Azospirillum brasilense* and its possible role in plant growth promotion and osmotic stress mitigation. **European Journal of Soil Biology**, 45:12–19, 2009.

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

COMPANT, S., CLÉMENT, C., AND SESSITSCH, A. Plant growth promoting bacteria in the rhizoand endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry** 42, 669–678, 2010.

COSTA, V.P.; MAYWORM, M.A.S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes - município de Extrema, MG Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s. 13, 282–292, 2011.

FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; MARTINEZ, C.R.; CHANWAY, C.P. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. **Applied soil ecology**, Amsterdam, NL, v. 40, p. 182-188, 2008.

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.

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

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within Plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Rev. 79, 293–320, 2015.

HOFFMANN, R.B; MOREIRA, É.E.A; HOFFMANN, G.S.S; ARAÚJO, N.S.F. Efeito do manejo do solo no carbono da biomassa microbiana. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**. v. 1, n.1, 2018.

JOPPA L.N; ROBERTS D.L; PIMM S.L. How many species of flowering plants are there? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, 278:554–559, 2011.

LEFF, J.W; JONES, S.E; PROBER, S.M; BARBERÁN, A; BORER, E.T; FIRN, J.L; HARPOLE, W.S; HOBBIIE, S.E; HOFMOCKEL, K.S; KNOPS, J.M.H; MCCULLEY, R.L; PIERRE, K.L; RISCH, A.C; SEABLOOM, E.W; SCHÜTZ, M; STEENBOCK, C; STEVENS, C.J; FIERER, N. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 112 (35) 10967-10972, 2015.

LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.G.; RAMOS, S.J. The saga of agricultural development of the Brazilian Cerrado. **International Potash Institute**, Horgen, Suíça, v. 32, p. 29-56, 2012.

MAHAPATRA, S.; BANERJEE, D. Structural elucidation and bioactivity of a novel exopolysaccharide from endophytic *Fusarium solani* SD5. **Carbohydrate Polymers** 90: 683-689, 2012.

MEHNAZ, S. **Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with Sugarcane.** Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems, pp. 165-187. DOI: 10.1007 / 978-3-642-18357-7_7, 2011.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>> Acesso em: 26 nov. 2019.

MUSAVI, S.F.; DHAVALA, A.; BALAKRISHNAN, R.M. Optimization and Kinetic Modeling of Cell-Associated Camptothecin Production from an Endophytic *Fusarium oxysporum* NFX06. **Preparative Biochemistry and Biotechnology** 45(2): 158-172, 2015.

OLIVEIRA, D.R.; DE BRITO JÚNIOR, F.E.; BENTO, E.N.; MATIAS, E.F.; SOUSA, A.C.; COSTA, J.G.; COUTINHO, H.D.; KERNTOPF, M.R.; MENEZES, I.R. Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*. **Pharmaceutical Biology**, 49, 1265–1270, 2011.

OLIVEIRA, P.S; MARQUES, R. J. Cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savana. **Columbia Press**, New York, 2002.

PAIVA, L.A.F.; GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; TOMÉ, A.R.; GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**. 39, 303–307, 2003.

PANDYA M.; RAJPUT M.; RAJKUMAR S. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiate*. **Microbiology**, 84, pp.80-89, 2015.

PARENTONI, S.N.; MENDES, F.F.; GUIMARÃES, L.J.M. **Melhoramento para eficiência no uso do fósforo.** In: FRITSCHÉ-NETO, R.; BOREM, A. (Ed. 1). Melhoramento de plantas para condições de estresse abiótico. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2011.

PARMAR, H.J.; BODAR, N.P.; LAKHANI, H.N.; PATEL, S.V.; UMRANIA, V.V.; HASSAN, M.M. Production of lytic enzymes by *Trichoderma* strains during in vitro antagonism with *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of stem rot of groundnut. **African Journal of Microbiology Research** 9(6): 365-372, 2015.

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

POTT, V.J.; POTT, A.; LIMA, L.C.P.; MOREIRA, S.N.; OLIVEIRA, A.K.M. Aquatic macrophyte diversity of the Pantanal wetland and upper basin. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 71, no. 1 suppl., p. 255-563. PMid: 21537598, 2011.

PRIGENT-COMBARET, C.; BLAHA, D.; POTHIER, J.F.; VIAL, L.; POIRIER, M.A.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; MOENNE-LOCCOZ, Y. Physical organization and phylogenetic analysis of *acdR* as leucineresponsive regulator of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene *acdS* in phytobeneficial *Azospirillumlipoferum* 4B and other Proteobacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v.65, n.1, p.202-219, 2008.

REATTO, A.; CORREIA, J.R.; SPERA, S.T. Solos do bioma Cerrado. In: SANA, S. M.; ALMEIDA, S.P. (Ed). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, P. 47-86, 1998.

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.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research** 183, 92-99, 2016.

SIDDIKEE, M.A.; CHAUHAN, P.S.; ANANDHAM, R.; GWANG-HYUN, H.; TONGMIN, S. Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC desaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 20 (11), pp.1577-1584, 2010.

STROBEL G. A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v.5, p.535–544. DOI: 101016 / s1286-4579 (03) 00073-x, 2003.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; PERGALIS, P; KEFALOGIANNI, L.; CHATZIPAVLIDIS, L.; KATINAKIS, P. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microbial Ecology**, v. 61, p. 277-285, 2011.

VENUGOPALAN, A.; SRIVASTAVA, A. Enhanced camptothecin production by ethanol addition in the suspension culture of the endophyte, *Fusarium solani*. **Bioresource Technology** 188: 251-257, 2015.

VURUKONDA, S.S.; VARDHARAJULA, S.; SHRIVASTAVA, M.; SKZ, A. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, 2016.

WANG, S.; HUIJUN, W.; JUNQING Q.; LINGLI, M.; JUN, L.; YANFEI, X.; XUEWEN, G.; Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 19(10):1250-1258, 2009.

ZUBA JUNIOR, G.R.; SAMPAIO, R.A.; PEREIRA, C.M.; PRATES, F.B.S.; FERNANDES, L.A.; ALVARENGA, I.C.A. Crescimento do jatobá e de leguminosas arbóreas em diferentes espaçamentos, em área degradada. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 4, p. 63-68, 2010.

4. CAPÍTULO I

Atributos nutricionais do solo que afetam a diversidade funcional da microbiota endofítica e rizosférica de *Hymenaea courbaril* L.

Atributos nutricionais do solo que afetam a diversidade funcional da microbiota endofítica e rizosférica de *Hymenaea courbaril* L.

RESUMO

Este trabalho objetivou verificar a influência de atributos do solo sobre a diversidade funcional da microbiota endofítica e rizosférica isolada de *Hymenaea courbaril* L. nos biomas Pantanal e Cerrado. Os micro-organismos foram testados quanto à sua capacidade de solubilização de CaHPO_4 , FePO_4 e AlPO_4 , quanto à capacidade de sintetizar AIA e a enzima ACC desaminase, bem como por sua ação antagonista a *Fusarium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia* sp. A diversidade funcional, dentro de cada traço, foi confrontada com características do solo rizosférico de *H. courbaril* amostradas nos diferentes biomas. Foram isolados 77 micro-organismos, 59 bactérias e 21 fungos, havendo predomínio das bactérias Gram-negativas (49% dos isolados). Os atributos do solo que influenciaram a diversidade funcional dos micro-organismos endofíticos e rizosféricos de *H. courbaril* entre os dois biomas foram matéria orgânica e pH. O Cerrado apresentou mais isolados que inibiram fortemente *Rhizoctonia* sp., 24% quando comparado a 11% do Pantanal, permanecendo esta tendência para as antibioses a *S. sclerotiorum* 24% e *Fusarium* sp. 50% contra 22 e 27% observados no Pantanal, respectivamente. Os dois biomas apresentaram 100% de micro-organismos que sintetizam ACC desaminase. O Pantanal apresentou maior número de micro-organismos classificados como muito fortes, quando comparados ao Cerrado. O bioma Cerrado se destacou quanto ao número de micro-organismos solubilizadores de FePO_4 , mas menor número de micro-organismos solubilizadores de AlPO_4 , quando comparado ao Pantanal. Para a capacidade de solubilização de CaHPO_4 , o Pantanal apresentou maior número de micro-organismo classificados como muito fortes. A análise de agrupamento da PCA indicou que o grupo de micro-organismos não difere entre os biomas. Conclui-se que características do solo rizosférico como pH, M.O, Fe da raiz, Fe da parte aérea, Fe do solo e Mn do solo exerceram efeito sobre a funcionalidade da comunidade microbiana de *H. courbaril*. Não observamos diferença na diversidade funcional da microbiota simbiótica a *H. courbaril*, amostrada nos biomas, mas bactérias gram-negativas do Pantanal e fungos do Cerrado se mostraram bastante divergentes dos outros grupos e especializados nos traços solubilização de CaHPO_4 , FePO_4 e AlPO_4 e síntese de AIA e ACC para bactérias gram-negativas do Pantanal e antibiose *Fusarium* sp. a *Sclerotinia sclerotiorum* e a *Rhizoctonia* sp para os fungos do Cerrado.

PALAVRAS-CHAVE: bactérias, fungos, diversidade microbiana.

Soil nutritional attributes affect the functional diversity of the endophytic and rhizospheric microbiota of *Hymenaea courbaril* L.

ABSTRACT

The objective of this chapter was to verify the influence of soil attributes on the functional diversity of the endophytic and rhizospheric microbiota isolated from *Hymenaea courbaril* L. in the Pantanal and Cerrado biomes. The microorganisms were tested for their capacity to solubilize CaHPO_4 , FePO_4 and AlPO_4 , to synthesize AIA and the enzyme ACC deaminase, as well as for their antagonistic action toward *Fusarium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Rhizoctonia* sp. The functional diversity of each trait was compared with the characteristics of the rhizospheric soil of *H. courbaril* sampled in the two biomes. A total of 77 microorganisms were isolated, including 59 bacteria and 21 fungi were, with a predominance of Gram-negative bacteria (49% of the isolates). The soil attributes that most influenced the functional diversity of the endophytic and rhizospheric microorganisms of *H. courbaril* between the two biomes were organic matter and pH. More isolates from the Cerrado (24%) presented a strong inhibitive effect on *Rhizoctonia* sp. in comparison with the Pantanal (11%), with a similar pattern being found in the antibiosis to *S. sclerotiorum* (24% of the isolates from the Cerrado vs. 22% of those from the Pantanal) and *Fusarium* sp. (50% vs. 27%). In both biomes, 100% of the microorganisms synthesize ACC deaminase. A larger number number of microorganisms classified as very strong were recorded in the Pantanal in comparison with the Cerrado. While a larger number of FePO_4 solubilizing microorganisms were recorded in the Cerrado in comparison with the Pantanal, it had a smaller number of AlPO_4 solubilizing microorganisms. In the case of the capacity of the microorganisms for the solubilization of CaHPO_4 , the Pantanal had a larger number classified as very strong. The PCA cluster analysis indicated that the set of microorganisms does not vary between the biomes. The results of the study indicated that the characteristics of the rhizospheric soil, such as the pH, OM, Fe of thd root, plant, and the soil, and the Mn of the soil all had a significant effect on the functionality of the microbial community associated with *H. courbaril*. No major variation was found in the functional diversity of the symbiotic *H. courbaril* microbiota sampled in the two biomes, although the gram-negative bacteria from the Pantanal and the fungi from the Cerrado were quite distinct from the other groups. The gram-negative bacteria from the Pantanal presented a degree of specialization for the solubilization of CaHPO_4 , FePO_4 , and AlPO_4 , and the synthesis of AIA and ACC. The fungi from the Cerrado presented distinct traits for the antibiosis of *Fusarium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Rhizoctonia* sp.

KEYWORDS: bacteria, fungi, microbial diversity.

4.1 INTRODUÇÃO

A diversidade estrutural e funcional de comunidades microbianas é influenciada por vários fatores bióticos e abióticos, entre eles, clima, sazonalidade, uso e ocupação do solo, manejo do solo, tipo e estrutura do solo, espécies de plantas e estágio de desenvolvimento vegetal (Berg e Smalla, 2009).

É pressuposto que, para os diferentes tipos de solo e plantas, existem comunidades microbianas específicas, podendo ser estas comunidades afetadas por propriedades químicas e físicas dos solos, sobretudo em se tratando de pH e textura do solo (Bach et al., 2010; Bissett et al., 2010, Mendes et al., 2012; Barnett et al., 2019). Do mesmo modo, os nutrientes do solo podem alterar o perfil transcricional de seu microbioma (Carvalhais et al., 2013).

Alguns estudos têm avaliado o efeito dos diferentes usos do solo e suas características nas dinâmicas das comunidades microbianas. Leff et al. (2015) observaram que o microbioma é sensível à adição de N e P, acarretando redução da biomassa microbiana e das taxas respiratórias (Ramirez et al., 2012; Campbell et al., 2010; Ramirez et al., 2010), o que influencia diretamente sobre grupos funcionais específicos, como oxidantes de amônia e fungos micorrízicos (Treseder, 2004).

Efeitos de outras propriedades do solo foram avaliados por Barnett et al. (2019), que verificaram que o pH em solos florestais explica 69% da variação na composição da comunidade microbiana. Já em áreas de cultivo, o pH juntamente com a relação C:N explicam 59% e, em solos mais antigos, o pH e a relação C:N bem como a matéria orgânica do solo explicaram 71% da variação na comunidade microbiana.

Contudo o solo é apenas um dos fatores que influenciam a diversidade estrutural e funcional da comunidade microbiana. Sabe-se que as plantas liberam na rizosfera exsudatos (ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas, açúcares, compostos fenólicos e outros metabolitos secundários) (McNear Jr., 2013) e mucilagens que são facilmente utilizados pelos micro-organismos, sendo que estes fatores frequentemente moldam as comunidades microbianas (Shi et al., 2011). Além disso, a liberação de exsudatos ocasiona vários processos biológicos e ecológicos complexos (Sasse et al., 2018; Philippot et al., 2013) que afetam diretamente a colonização pelos micro-organismos.

Assim como as plantas influenciam a presença de micro-organismos na rizosfera, eles desempenham papel importante na nutrição mineral de plantas, seja pela solubilização de nutrientes como o P, que pode estar presente nos solos em grandes

concentrações, mas imobilizado nas formas de fosfato de alumínio (AlPO_4), ferro (FePO_4) e cálcio (CaHPO_4), não estando, por consequência, prontamente disponível para as plantas (Smith et al., 2011; Bini e Lopez, 2016; Alori et al., 2017); participam da ciclagem biogeoquímica do carbono e nitrogênio, como indicadores da qualidade do solo, como decompositores e também exercendo efeito de antibiose contra patógenos (Tedersoo et al., 2014; Dantas et al., 2014). Isto se deve à grande diversidade genética e à capacidade de exercer funções únicas e de extrema importância na manutenção de ecossistemas.

Há consenso sobre o fato de que tanto as propriedades do solo quanto as espécies vegetais influenciam na estrutura e função das comunidades microbianas. Entretanto a proporção em que ambos os fatores contribuem ainda não é totalmente elucidada (Berg e Smalla, 2009). Somado a isso, poucas pesquisas avaliam o efeito das propriedades químicas dos solos sobre a diversidade funcional de micro-organismos endofíticos e rizosféricos em áreas florestais nativas. Atualmente, não existem trabalhos na literatura que descrevem a microbiota funcional de *Hymenaea courbaril*. Descrever a funcionalidade da microbiota do Cerrado tem sido uma tendência, pois muitos desses micro-organismos têm propriedade biotecnológica, sendo assim, esse trabalho é pioneiro. Desta forma, procuramos responder às seguintes perguntas: 1) Os atributos químicos do solo afetam a diversidade funcional de micro-organismos endofíticos e rizosféricos isolados de *Hymenaea courbaril*? 2) A diversidade funcional de micro-organismo endofíticos e rizosféricos isolados de *Hymenaea courbaril* difere entre os biomas? Com isso, objetivou-se verificar a influência dos atributos químicos do solo sobre a diversidade funcional da microbiota endofítica e rizosférica isolada de *Hymenaea courbaril* nos biomas Pantanal e Cerrado (Serra de Caldas).

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Obtenção do material vegetal e características do solo

Foram amostradas mudas jovens, totalmente desenvolvidas, de ocorrência natural da espécie *H. courbaril* nos biomas Cerrado e Pantanal. A amostra do Cerrado foi obtida na área de preservação permanente do Parque da Serra de Caldas (Rio Quente-GO), ($17^{\circ}48'29.77''$ de latitude Sul e $48^{\circ}41'59.61''$ de longitude Oeste, a 985 m de altitude), enquanto a amostra do Pantanal foi coletada no Parque Natural Municipal

de Piraputangas (MS), (19°14'26.79" de latitude Sul e 57°37'20.23" de longitude Oeste, a 351m de altitude).

As mudas foram retiradas em blocos de solo, cortados com raio de 30 cm de distância do caule, de forma a proteger a raiz. Posteriormente, foram acondicionadas em saco plástico esterilizado, imersas em gelo e transportadas para o Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde, em Rio Verde, GO. Juntamente foram feitas a coleta e o armazenamento asséptico de 10g de solo que estava em contato direto com as raízes de cada uma das plantas coletadas. As raízes foram imediatamente conduzidas à assepsia.

Amostras em triplicata de solo rizosférico foram analisadas e os dados da concentração nutricional foram obtidos para os dois biomas. Foi avaliada a concentração nutricional em amostras de raiz e de parte aérea das mudas amostradas. A caracterização nutricional média do solo rizosférico e muda de Serra de Caldas foi: pH em CaCl₂: 4,8; N (raiz): 0,6 %; N (aérea): 0,63; Ca (solo): 1,23 cmol_c dm⁻³; Mg (solo): 0,63 cmol_c dm⁻³; Mn (solo): 10,33 mg/dm³; Al: 0,13 cmol_c dm⁻³; K (solo): 0,4 cmol_c dm⁻³; P (raiz): 0,10 %; P (aérea): 0,12 %; P (Solo): 1,2 mg dm⁻³; Cu (solo): 0,8 mg dm⁻³; Zn (solo): 0,4 mg dm⁻³; Fe (raiz): 1216,66 mg/Kg; Fe (aérea): 684 mg/Kg ; Fe (solo): 68,33 mg dm⁻³; M.O.: 2,33 g/Kg; Sat. Al (M%): 4 %; C. Org. Tot.: 1,33 %.

E a caracterização nutricional média do solo rizosférico e das mudas do Pantanal foi: pH em CaCl₂: 5,93; N (raiz): 0,5 %; N (aérea): 1,03; Ca (solo): 6,43 cmol_c dm⁻³; Mg (solo): 1,23 cmol_c dm⁻³; Mn (solo): 124 mg/dm³; Al: 0 cmol_c dm⁻³; K (solo): 0,38 cmol_c dm⁻³; P (raiz): 0,04 %; P (aérea): 0,08 %; P (Solo): 6 mg dm⁻³; Cu (solo): 0,9 mg dm⁻³; Zn (solo): 0,33 mg dm⁻³; Fe (raiz): 656,66 mg/Kg; Fe (aérea): 6153,33 mg/Kg ; Fe (solo): 21,33 mg dm⁻³; M.O.: 1,63 g/Kg; Sat. Al (M%): 0 %; C. Org. Tot.: 0,93 %. Além disso, amostras de solo rizosférico, em sextuplicata, foram utilizadas na determinação da biomassa microbiana presente nos solos das diferentes fitofisionomias.

4.2.2. Isolamento dos micro-organismos endófitos radiculares

Fragmentos de raízes de aproximadamente 10 cm de comprimento foram amostrados e submetidos a tratamento prévio de desinfestação, segundo método descrito por Petrini e Muller (1986), com modificações. As amostras foram lavadas em água corrente, posteriormente imersas em água de torneira com detergente neutro e

agitadas em mesa agitadora a 150 rpm, por 5 minutos. O material foi levado ao fluxo laminar para assepsia com álcool 70% (v/v)/ um min, hipoclorito de sódio (2,5%) de cloro ativo (v/v)/ três min e novamente álcool 70% (v/v)/ 30 s, por fim, submetido a 3 enxágues consecutivos. Como controle do processo de assepsia, foram coletados 500 µL da água utilizada no enxágue final das amostras para inoculação em tubos contendo 5 mL de caldo nutriente. Fragmentos de aproximadamente 1 cm de raiz foram obtidos com auxílio de pinça e tesoura e distribuídos superficialmente em placas de Petri contendo meio Ágar nutriente. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C e observadas diariamente.

4.2.3. Isolamento dos micro-organismos rizosféricos

Alíquotas de 10g de solo rizosférico foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 90 ml de solução salina (0,85% NaCl) esterilizada. Os frascos foram agitados manualmente por meia hora em temperatura ambiente (28 ± 1 °C). Transcorrido esse tempo, foi feita uma diluição seriada, fator 10, coletando-se uma alíquota de 1000 µl da suspensão de solo e depositando-a em tubos de ensaio contendo 9000 µL de solução salina (0,85% NaCl) (v/v) esterilizada. A quantia de 100 µL de cada diluição foi pipetada para placas de Petri contendo ágar nutriente e espalhada com alça de Drygalski. As placas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ °C por um período de 24 a 48 horas.

4.2.4. Purificação e manutenção dos endofíticos e rizosféricos

Colônias bacterianas individuais foram purificadas pela técnica da semeadura por estria em ágar nutriente, já as colônias de fungo foram purificadas por obtenção de fragmento de micélio jovem que surgem das bordas dos fragmentos. Os isolados foram estocados em coleção de culturas em geladeira a 4°C.

4.2.5. Coloração de Gram e classificação das bactérias

As bactérias foram diferenciadas em Gram-positivas e Gram-negativas de acordo com o protocolo de coloração de Gram (FREITAS & PICOLI 2007) e classificadas com base na sua morfologia.

4.2.6. Avaliação da diversidade funcional

A diversidade funcional foi estimada para cada traço funcional analisado (solubilização de fosfatos, síntese de auxina, síntese de ACC desaminase e antibiose), utilizando uma adaptação do índice de diversidade de Shannon-Weaver (H'):

Em que:

S = é a riqueza de isolados desempenhando o traço funcional

$\ln p_i$ = logaritmo de base neperiana;

4.2.7. Avaliação dos traços funcionais

4.2.7.1. - Avaliação da capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, fosfato de ferro e fosfato de alumínio

Para a avaliação das fontes de P, foi utilizado o meio de cultura GL (10g glicose, 2g extrato de levedura) como testemunha, suplementado com uma das três fontes (CaHPO_4 , AlPO_4 ou FePO_4). Para as amostras de bactérias, foi inoculado 1 mL da cultura previamente padronizada em 10 mL de meio líquido GL e adicionado $1,26 \text{ g L}^{-1}$ de cada uma das fontes fosfatadas (CaHPO_4 , AlPO_4 e FePO_4) (Barroso e Nahas 2008). Para os fungos, foi retirado um disco de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial e inoculado em frasco de penicilina (um disco por vidro). As culturas permaneceram sob agitação a 90 rpm, em 30 °C, por 72h. Posteriormente, foi feita a medição do pH. Para a determinação da quantidade de P inorgânico, foi utilizado o método colorimétrico da vitamina C, a 725nm, de Gadagi e Sa (2002).

4.2.7.2. - Avaliação da capacidade de síntese de ácido indol acético (AIA)

A quantificação de ácido indol acético (AIA) foi feita de acordo com Kuss et al. (2007) em meio DYGS. Uma curva padrão de AIA foi construída com auxina comercial e correlacionada com a absorbância da amostra bacteriana. Os valores foram expressos em $\mu\text{g mL}$.

4.2.7.3. - Avaliação da antibiose a *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e a *Fusarium* sp.

O teste de cultura pareada foi feito segundo Shiomi et al. (2008) em meio batata dextrose (BDA). Para as bactérias, o teste foi por meio de duas estrias equidistantes e um disco de 5mm do micélio do fungo disposto no centro da placa, crescido por cinco dias. Para os fungos, foram utilizados discos de 6 mm de diâmetro de colônias dos fitopatógenos e um disco de 6 cm de colônia fúngica, que foram inoculados em polos opostos em placas de Petri (4 cm de distância). As culturas pareadas foram incubadas a 28°C durante 7 dias. Os testes foram feitos em triplicata. Para o controle negativo, foi inoculado somente o fitopatógeno em um polo da placa. A inibição foi avaliada por medições do raio de crescimento do fitopatógeno e por comparação com o controle, não submetido às bactérias ou fungos simbióticos testados.

As interações competitivas foram analisadas segundo a escala de Badalyan et al. (2002). O diâmetro da colônia fungo fitopatogênico foi medido com paquímetro e a porcentagem de supressão de cada fungo, calculada através do índice de inibição relativo (IR):

$$\text{IR (\%)} = \frac{\text{RC} - \text{RX}}{\text{RC}} \times 100, \text{ sendo:}$$

RC = raio da colônia do fitopatógeno no tratamento controle

RX = raio da colônia do fitopatógeno pareada com o isolado endofítico ou rizosférico

4.2.7.4. -Avaliação da produção da enzima ACC desaminase

Para esta avaliação, foi utilizado o método descrito por Lucon et al. (2008), em que a capacidade de crescimento dos isolados, em presença de ACC, foi verificada em meio líquido pela incubação por 48h a 27°C, sob agitação constante. Foi utilizado um meio mínimo com adição de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) como única fonte de N, com a seguinte composição: 4 g de KH₂PO₄, 10 mg de H₃BO₄, 6 g de Na₂HPO₄, 10 mg de MnSO₄.7H₂O, 0,2 g de MgSO₄.7H₂O, 70 mg de ZnSO₄, 1 mg de FeSO₄.7H₂O, 50 mg de CuSO₄, 2 g de glicose, 10 mg de MoO₃, 2 g de ácido glucônico, 2 g de ácido cítrico, 3 mM de ACC e 1 L de água destilada. A avaliação final foi dada pela quantificação do crescimento bacteriano, utilizando o método

turbidimétrico (Romeiro, 2007), efetivado pela leitura de absorvância (595 nm) em espectrofotômetro, comparando-se a leitura final (48 horas) com a do tempo zero.

4.2.7.5. - Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo

Para a determinação da biomassa microbiana (mg kg^{-1} solo), umidade na capacidade de campo do solo úmido (CCU) e seco (CCS), foi utilizado o método descrito por Silva et al. (2007).

Cada amostra de solo rizosférico foi dividida em sete subamostras de 20 g (três fumigadas, três não fumigadas e uma para umidade do solo) em frascos de vidro de 100 ml. Para determinação de umidade do solo, as amostras foram secas em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e, em seguida, pesadas. Nos frascos destinados à fumigação, foi adicionado 1 ml de clorofórmio isento de etanol. Os frascos foram seguidamente fechados e armazenados por 24 horas. No dia seguinte, foi retirada a tampa dos frascos em capela de exaustão, deixando evaporar todo o clorofórmio (Witt et al., 2000).

Para a extração, que se dá nas amostras fumigadas e não fumigadas, foram adicionados 50 ml de solução de sulfato de potássio (K_2SO_4) em cada amostra e levado para agitador orbital por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido com auxílio de uma pipeta para um filtro de papel acoplado a funil e tubo de 50 ml. Ao final da filtragem, é obtido o extrato de cada subamostra.

Para determinação do carbono microbiano, foram transferidos 8 ml do extrato para Erlenmeyer de 250 ml, adicionando 2 ml de solução 0,066 M de dicromato de potássio, 10 ml de ácido sulfúrico P.A e 5 ml de ácido orto-fosforico P.A. Posteriormente, foram adicionados 70 ml de água deionizada, esperando esfriar e adicionando 4 gotas de difenilamina. Por último, foi feita uma titulação sob agitação com uma solução 0,033 M de sulfato ferroso amoniacal. A solução titulada teve sua coloração modificada de púrpuro para verde.

4.2.8. Delineamento experimental e análises estatísticas

Foram feitos gráficos exploratórios, classificando os micro-organismos em 3 grupos (Bacterias Gram +, Gram – e Fungos) e de acordo com sua morfologia (cocos e bacilos), dentro de cada bioma (Pantanal e Cerrado).

A classificação dos traços funcionais avaliados - solubilização de CaHPO_4 , solubilização de AlPO_4 e solubilização de FePO_4 , síntese de auxina (AIA), atividade ACC desaminase e antibiose em relação a *Fusarium sp.*, *S. sclerotiorum* e *Rhizoctonia sp.* - foi conduzida de acordo com a Tabela 01. Para estimativa da diversidade funcional, foram considerados os micro-organismos enquadrados dentro da classificação forte e muito forte.

Tabela 1. Classificação de micro-organismos isolados de raízes e solo rizosférico de *H. courbaril* dos biomas Pantanal e Cerrado, de acordo com sua eficiência em executar diferentes traços funcionais.

Traços Funcionais	BACTÉRIA PANTANAL				BACTÉRIA CERRADO			
	Weak	Moderate	Strong	Very strong	Weak	Moderate	Strong	Very strong
CaHPO₄ solubilization	≤ 1,727	≤ 3,455	≤ 5,188	≤ 6,909	≤ 1,742	≤ 3,484	≤ 5,226	≤ 6,968
FePO₄ solubilization	≤ 0,989	≤ 1,978	≤ 2,966	≤ 3,955	≤ 1,097	≤ 2,193	≤ 3,290	≤ 4,386
AlPO₄ solubilization	≤ 0,192	≤ 0,384	≤ 0,576	≤ 0,768	≤ 0,231	≤ 0,461	≤ 0,692	≤ 0,922
IAA synthesis	≤ 5,1625	≤ 10,325	≤ 15,487	≤ 20,65	≤ 3,488	≤ 6,975	≤ 10,463	≤ 13,950
ACC desaminase	≤ 0,251	≤ 0,334	≤ 0,502	≤ 1,003	≤ 0,231	≤ 0,463	≤ 0,694	≤ 0,925
Ant. a <i>Fusarium sp.</i>	≤ 8,183	≤ 16,365	≤ 24,548	≤ 32,730	≤ 4,945	≤ 9,890	≤ 14,835	≤ 19,780
Ant. a <i>S. sclerotiorum</i>	≤ 13,055	≤ 26,110	≤ 39,165	≤ 52,220	≤ 12,870	≤ 25,740	≤ 38,610	≤ 51,480
Ant. a <i>Rhizoctonia sp.</i>	≤ 1,363	≤ 2,725	≤ 4,088	≤ 5,450	0,000	0,000	0,000	0,000
	FUNGI PANTANAL				FUNGI CERRADO			
	Weak	Moderate	Strong	Very strong	Weak	Moderate	Strong	Very strong
CaHPO₄ solubilization	≤ 0,264	≤ 0,529	≤ 0,793	≤ 1,057	≤ 0,490	≤ 0,980	≤ 1,469	≤ 1,959
FePO₄ solubilization	≤ 0,212	≤ 0,423	≤ 0,635	≤ 0,846	≤ 0,216	≤ 0,431	≤ 0,647	≤ 0,862
AlPO₄ solubilization	≤ 0,098	≤ 0,196	≤ 0,294	≤ 0,392	≤ 0,144	≤ 0,287	≤ 0,430	≤ 0,574
IAA synthesis	≤ 21,280	≤ 42,560	≤ 63,840	≤ 85,120	≤ 27,845	≤ 55,690	≤ 83,535	≤ 111,380
Ant. a <i>Fusarium sp.</i>	≤ 11,895	≤ 23,790	≤ 35,685	≤ 47,580	≤ 12,500	≤ 25,000	≤ 37,500	≤ 50,000

Ant. a <i>S. sclerotiorum</i>	≤ 11,575	≤ 23,150	≤ 34,725	≤ 46,300	≤ 8,518	≤ 17,035	≤ 25,553	34,070
Ant. a <i>Rhizoctonia</i> sp.	≤ 9,140	≤ 18,280	≤ 27,420	≤ 36,560	≤ 9,168	≤ 18,335	≤ 27,503	≤ 36,670

Para a comparação da diversidade funcional dos micro-organismos entre os biomas, foi feita uma ANOVA pacote *lm*, seguida pelo teste de *t de Student*, utilizando a função *Two Sample t-test*. Para a análise do tamanho do efeito entre as características dos solos e os traços funcionais, utilizou-se o Teste de Cohens DZ, utilizando o pacote *effsize* e a função *cohensD*. A estimativa do intervalo de confiança (95%) foi obtida pela função *des* do pacote *compute.es*.

Os dados de diversidade ecológica e funcional da microbiota endofítica radicular e rizosférica foram correlacionados por meio de uma matriz de correlação com os diferentes grupos de micro-organismos (bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos) e combinados, com estas em uma análise de componentes principais (PCA).

Visando a reduzir a dimensionalidade de dados multivariados para dois componentes principais, foram utilizados os pacotes *FactoMineR* (para análise) e *factoextra* (para visualização baseada no *ggplot2*) e a função *prcomp*. A padronização dos dados foi feita automaticamente pela função *PCA* do pacote *FactoMineR*. O número de componentes foi escolhido em função dos autovalores (>1.0), e a variância, explicada (acima de 80%). Estabelecidos os componentes principais, procedeu-se aos testes de inferência ANOVA para avaliar o efeito entre grupos de micro-organismos por bioma.

Os dados relacionados à capacidade funcional (solubilização de fosfatos, síntese de AIA, etc.) foram comparados em grupos de micro-organismos, sendo eles: gram +, gram – e fungos de cada bioma. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o pacote estatístico R.

4.3. RESULTADOS

Foram isolados um total de 77 micro-organismos em raízes (endofíticos) e em solo de rizosfera de *H. courbaril* nos biomas Cerrado e Pantanal, sendo 59 bactérias e 21 fungos. Destes, 21 bactérias e 15 fungos foram isolados na amostra do Cerrado e 35 bactérias e 6 fungos do Pantanal.

Na amostra coletada no bioma Pantanal, verificou-se predominância de cocos gram-negativos 49% (n=20), seguido por bacilos gram-negativos 24% (n=10), fungos 15% (n=6) e cocos gram-positivos 12% (n=5), não tendo sido verificada presença de bacilos gram-positivos para este bioma. Na amostra coletada no Cerrado, verificou-se predomínio de fungos com 42% (n=15), seguido por bacilos gram-negativos 28% (n=10), bacilos gram-positivos 14%(n=5), cocos gram-negativos 11%(n=4) e cocos gram-positivos 5%(n=2) (Figura 1).

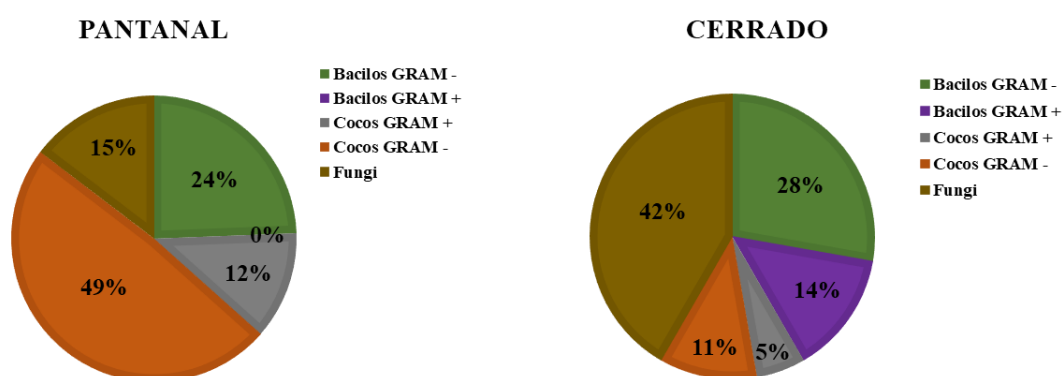


Figura 1: Percentual de micro-organismos isolados endofíticos em raízes e solo de rizosfera de *H. courbaril* nos biomas Cerrado e Pantanal.

As classificações das bactérias gram-positivas em relação aos traços funcionais mostraram que 100% delas apresentavam fraca capacidade de antibiose a *Rhizoctonia* sp. nos dois biomas. Não foram isoladas bactérias capazes de promover antibiose a *S.sclerotiorum* no Pantanal, entretanto, no Cerrado, verificou-se 50% de bactérias classificadas como moderadas e 50% muito fortes na inibição deste patógeno. Quanto à antibiose a *Fusarium* sp., ambos os locais apresentaram bactérias eficientes em sua inibição, sendo no Cerrado com 25% dos isolados classificados como muito forte, 50% forte e 25% moderadas e no Pantanal, 40 % fortes, 20% moderadas e 40% fracas (Figura 02).

Em relação à atividade ACC Desaminase, 100% das bactérias foram classificadas como muito fortes para os dois biomas. Quanto à síntese de AIA, no Pantanal, foram verificadas as seguintes proporções: 14% muito forte, 71% forte e 14% moderada; no Cerrado, 14% muito forte, 43% forte, 29% moderada e 14% fraco (Figura 02).

Para a solubilização de $FePO_4$, as bactérias do Cerrado apresentaram maior eficiência, sendo 71% classificadas como muito fortes e 29% fortes, comparada ao

Pantanal, com 63% muito fortes, 25% fortes e 25% moderadas. Da mesma forma, observa-se para a solubilização de $AlPO_4$ que o Cerrado apresentou 57% de bactérias classificadas como muito fortes e 43% fortes; já no Pantanal, com 25% como muito fortes, 50% fortes e 25% consideradas moderadas. Avaliando a solubilização de $CaHPO_4$, os dois biomas apresentaram 100% de bactérias classificadas como muito fortes (Figura 02).

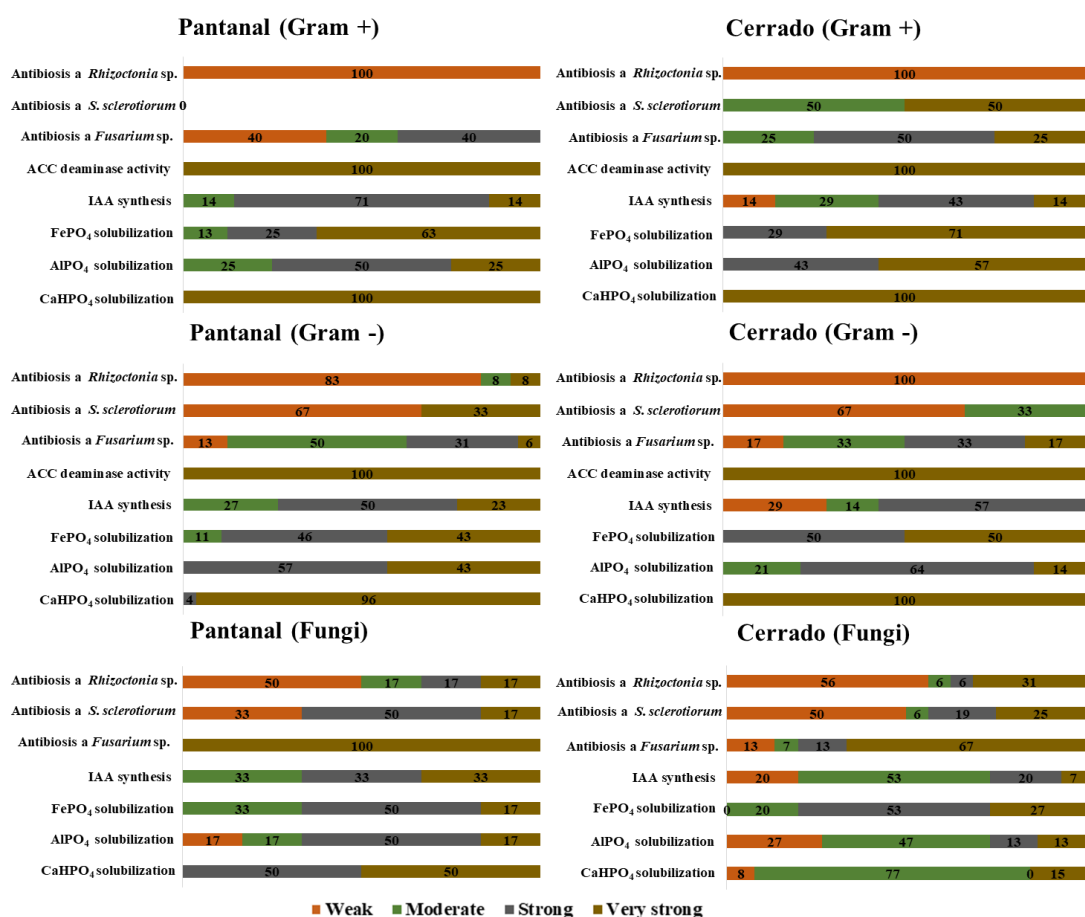


Figura 2: Classificação de grupos microbianos (Gram +, Gram - e fungos) isolados de *Hymenaea courbaril* dos biomas Pantanal e Cerrado, de acordo com a intensidade da expressão de diferentes traços funcionais.

Para a classificação das bactérias gram-negativas, Figura 02, em relação aos traços funcionais no Pantanal, para a capacidade de inibição a *Rhizoctonia* sp., isolou-se 8% de bactérias que inibiram fortemente este patógeno, 8% que inibiram moderadamente e 83% que inibiram fracamente. No Cerrado, verificou-se que 100% das bactérias inibem fracamente este fitopatógeno.

Em relação à capacidade de inibição do *S. sclerotiorum* no Cerrado, isolou-se 33% de bactérias que foram capazes de inibir moderadamente e 67% que inibiram fracamente esse fitopatógeno; já na amostra do Pantanal, foram isoladas 33% de

bactérias que inibiram fortemente e 67% que inibiram moderadamente esse patógeno. Quanto à capacidade de antibiose a *Fusarium* sp., os isolados de ambos os locais mostraram eficiência na inibição desse fitopatógeno. No Pantanal, as bactérias apresentaram taxa de inibição de 6%, inibindo fortemente, 31% fortes, 50% como moderadas e 13% como fracas. No bioma Cerrado, houve maior número de isolados classificados como muito fortes 17%, 33% como fortes, 33% como moderados e 17% como fracas.

Considerando a atividade ACC desaminase, ambos os biomas apresentaram 100% de bactérias que expressam fortemente este traço. Para a síntese de AIA, observa-se no Pantanal 23% dos isolados classificados como muito fortes, 30% como fortes e 27% moderados. E no Cerrado, 57% fortes, 14% moderados e 29% fracas.

Quanto à solubilização de FePO_4 , no Pantanal 17% foram classificadas como muito fortes, 50% fortes e 33 moderadas, em comparação com o Cerrado, com 27% muito fortes, 53% fortes e 20% moderadas. Para solubilização de AlPO_4 , no Pantanal foram verificadas 17% muito fortes, 50% fortes 17% moderadas e 17% fracas, enquanto no Cerrado, 13% muito fortes, 13% fortes, 47% moderadas e 27% fracas. Na solubilização de CaHPO_4 , observa-se no Pantanal 96% dos isolados classificados como muito fortes e 4% como fortes, no Cerrado, 100% das bactérias expressaram fortemente este traço.

Os resultados para os fungos, Figura 02, classificados em relação aos traços funcionais nos biomas indicam que para a ação de antibiose a *Rhizoctonia* sp., os fungos foram classificados no Pantanal como 17% muito fortes, 17% fortes, 17% moderados e 50% fracas; já no Cerrado, foram verificados 31% muito fortes, 6% fortes, 6% moderados e 56% fracas. Atividade de antibiose contra *S. sclerotiorum* apresentou para o Pantanal 17% dos isolados classificados como muito fortes, 50% fortes e 33% fracas no Cerrado, 25% muito fortes, 16% fortes, 6% moderados e 50% fracas. Quanto à inibição do *Fusarium* sp., cem por cento dos fungos do Pantanal foram classificados como muito fortes; no Cerrado, eles foram classificados em 67% muito fortes, 13% fortes, 7% moderados e 13% fracas.

Para capacidade de síntese de AIA, os fungos do Pantanal foram classificados em 33% muito fortes, 33% fortes e 33% moderados; no Cerrado, 7% muito fortes, 20% fortes, 53% moderados e 20% fracas.

A capacidade fúngica de solubilização de FePO_4 no Pantanal apresentou 17% dos isolados classificados como muito fortes, 50% fortes e 33% moderados: no

Cerrado, 27% como muito fortes, 53% moderados e 20% fracos. Para capacidade de solubilização de $AlPO_4$, no Pantanal, 17% muito fortes, 50% fortes, 17% moderados e 17% fracos; já no Cerrado, 13% muito fortes, 13% fortes, 47% moderados e 27% fracos. Quanto à capacidade de solubilização de $CaHPO_4$, os fungos foram classificados no Pantanal como 50% muito fortes e 50% fortes; no Cerrado, 15% muito fortes, 77% moderados e 8% fracos.

Os resultados obtidos para a classificação do traço funcional quanto à sua capacidade (fraco, moderado, forte e muito forte) para todos os isolados (bactérias e fungos) são apresentados na Figura 3. Nota-se que no Cerrado há maior número de isolados que inibem fortemente *Rhizoctonia* sp. (24%) quando comparado ao Pantanal (11%), permanecendo esta tendência para as antibioses a *S. sclerotiorum* (24%) e *Fusarium* sp. (50%) contra 22% e 27% observados no Pantanal, respectivamente. Quanto à atividade ACC desaminase nos dois biomas, verificou-se que 100% dos micro-organismos sintetizam essa enzima.

Em relação à síntese de AIA, os micro-organismos do Pantanal apresentaram maior número de isolados classificados como muito fortes 23% e forte 51%, quando comparados ao Cerrado 6% e 39%, respectivamente. Para a solubilização de $FePO_4$, o Cerrado apresentou maior número de micro-organismo classificados como muito fortes 44%, em comparação com o Pantanal 25%, mas menor número de micro-organismos solubilizadores de $AlPO_4$, classificados como muito fortes 22%, contra 35% do Pantanal. Para capacidade de solubilização de $CaHPO_4$, no bioma Pantanal foi detectado maior número de micro-organismo classificados como muito fortes 90%, enquanto para o Cerrado, 62%.

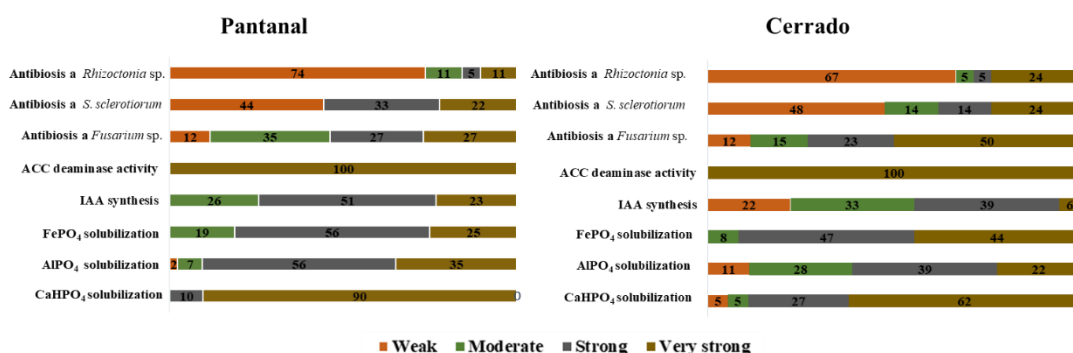


Figura 3: Classificação dos micro-organismos endofíticos radiculares e rizosféricos isolados de *Hymenaea courbaril* dos biomas Pantanal e Cerrado, de acordo com a intensidade da expressão de diferentes traços funcionais.

Não se verificou diferença ($p>0.05$) pelo teste F ao comparar os traços funcionais dentro de cada bioma. Da mesma forma, não se observa diferença ($p>0,05$) pelo teste T para cada um dos traços funcionais entre os biomas (Figura 4).

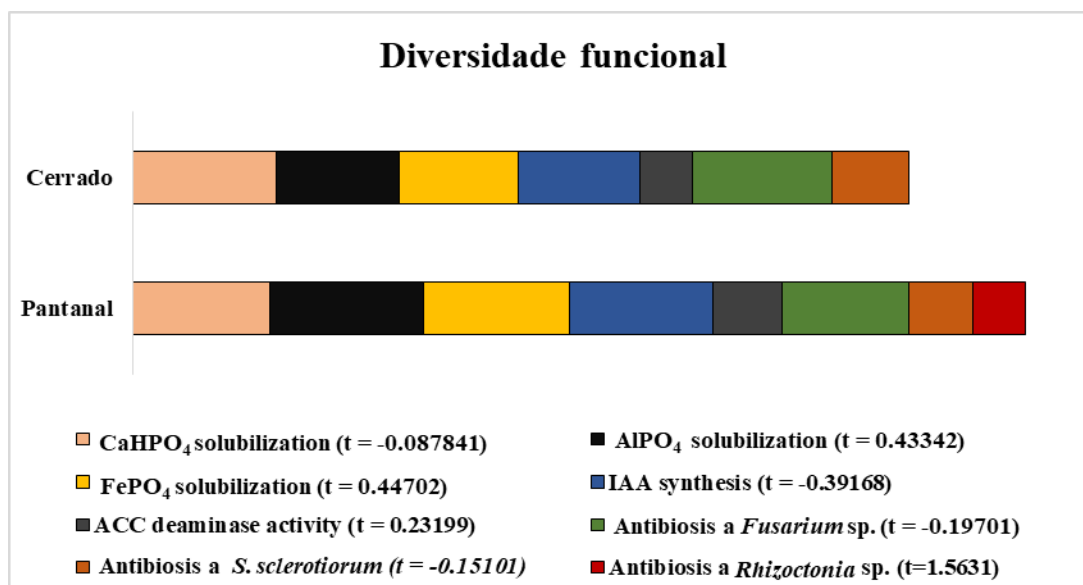


Figura 4: Diversidade funcional dos micro-organismos endofíticos radiculares e rizosféricos isolados de *Hymenaea courbaril* dos biomas Pantanal e Cerrado, de acordo com a intensidade da expressão de diferentes traços funcionais.

Entretanto, ao avaliar as características do solo rizosférico, verifica-se que a biomassa microbiana apresentou efeito ($p<0,05$) pelo teste F, quando comparada com os demais traços funcionais (Figura 05). Também se observa diferença significativa pelo teste t para Matéria Orgânica ($p=0,003$) e pH ($p=0,017$) e não significativa para Biomassa ($p=0,46$) e Carbono orgânico total ($p=0,07$), quando se compara cada característica do solo entre os biomas Pantanal e Cerrado (Figura 05).

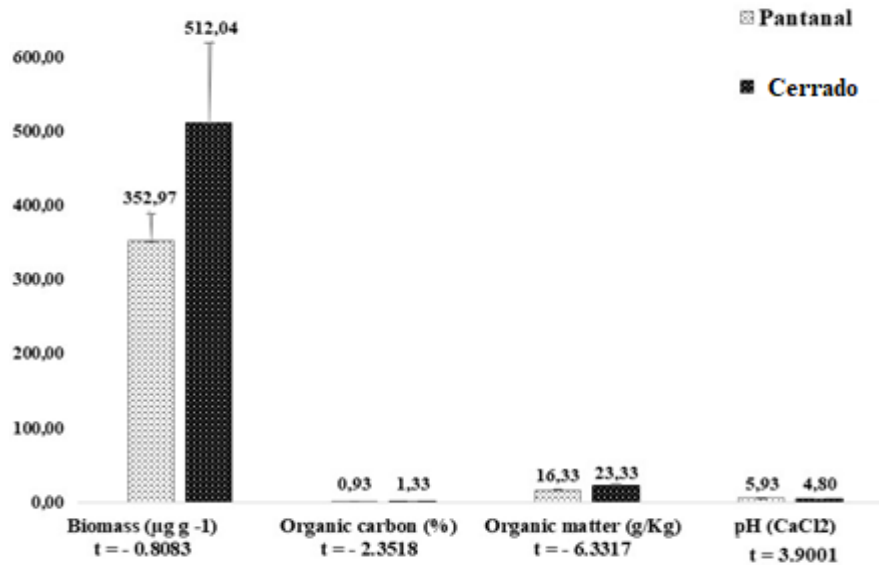


Figura 5: Comparação entre Biomassa microbiana, Carbono Orgânico, Matéria orgânica e pH do solo rizosférico de *Hymenaea courbaril* dos biomas Pantanal e Cerrado.

Visando a avaliar a influência de cada característica nutricional do solo e da própria planta na funcionalidade da microbiota, foi feita análise do tamanho do efeito de Cohen's DZ por bioma. Observa-se na Figura 6 que as características que apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) foram aquelas cujo intervalo de confiança não ultrapassou a linha vertical do efeito nulo. Deste modo, observa-se que, na amostra do Pantanal, o Fe da raiz, Figura 6-j, influenciou todos os traços funcionais, com exceção da biomassa microbiana do solo.

O Fe da parte aérea, Figura 6-k, influenciou na antibiose a *S. sclerotiorum* e *R. sp.*. O Fe do solo, Figura 06-l, influenciou todas as três antibioses (*Fusarium sp.*, *S. sclerotiorum* e *Rhizoctonia sp.*). O Manganês do solo, Figura 06-m, assim como o ferro da raiz afetou todos os traços funcionais, exceto a biomassa microbiana. O pH e a matéria orgânica do solo, Figuras 06-p e q, influenciaram apenas a antibiose a *S. sclerotiorum* e *Rhizoctonia sp.*.

O tamanho do efeito das características dos solos N rizosférico do Cerrado sobre os traços funcionais é apresentado na Figura 07. Observa-se que o Fe da parte aérea, Figura 07-k, influenciou todos os traços funcionais, exceto a biomassa microbiana. O Fe do solo influenciou a solubilização de fosfato de alumínio e ferro, ACC desaminase, síntese de AIA e as antibioses. Nota-se que o Magnésio apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) apenas sobre a antibiose a *S. sclerotiorum* (Figura 07-h). O Manganês do solo afetou apenas ACC desaminase e a antibiose a *Fusarium sp.*

(Figura 07 –m). O pH do solo influenciou apenas a ACC desaminase, Figura 07-p, enquanto CTC influenciou apenas a síntese de AIA (Figura 07 –s).

Cabe ressaltar que todos os valores de tamanhos de efeito d de Cohen's foram classificados como muito grandes e positivos, de modo a indicar que influenciaram na seleção de micro-organismos que expressam traços funcionais de modo a elevar a diversidade no âmbito destes traços (Figuras 6 e 7).

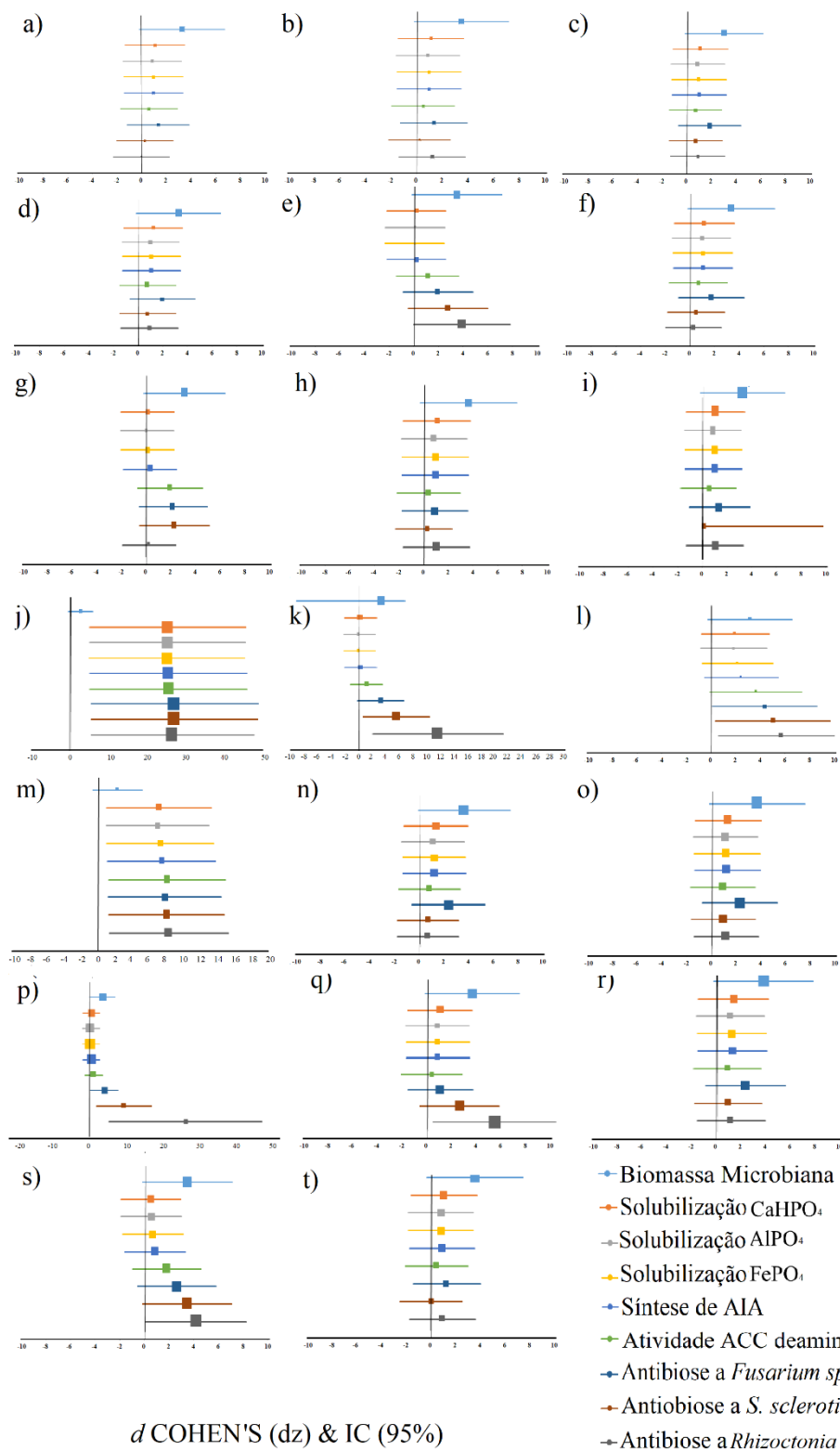


Figura 6- Tamanho de Efeito *d* de Cohen's (DZ) e intervalo de confiança a 95% de probabilidade (95% IC) de: a) N da raiz; b) N parte aérea; c) P parte aérea; P da raiz; e) P do solo; f) K do solo; g) Ca do solo; h) Mg do solo; i) Cu do solo; j) Fe da raiz; k) Fe da parte aérea, l) Fe do solo; m) Mn dos solo; n) Zn do solo; o) Al do solo; p) pH do solo; q) Matéria orgânica; r) Saturação de Al (M%) do solo; s) CTC do solo e; t) Carbono orgânico total sobre a: Biomassa microbiana do solo; Solubilização de CaHPO_4 ; Solubilização de AlPO_4 ; Solubilização de FePO_4 ; Síntese de AIA.; Síntese de ACC Desaminase; Antibiose a *Fusarium sp.*; Antibiose a *Sclerotinia sclerotiorum*; Antibiose a *Rhizoctonia sp.*, obtidos de micro-organismos endófitos e rizosféricos isolados de *Hymenaea courbaril* do Pantanal.

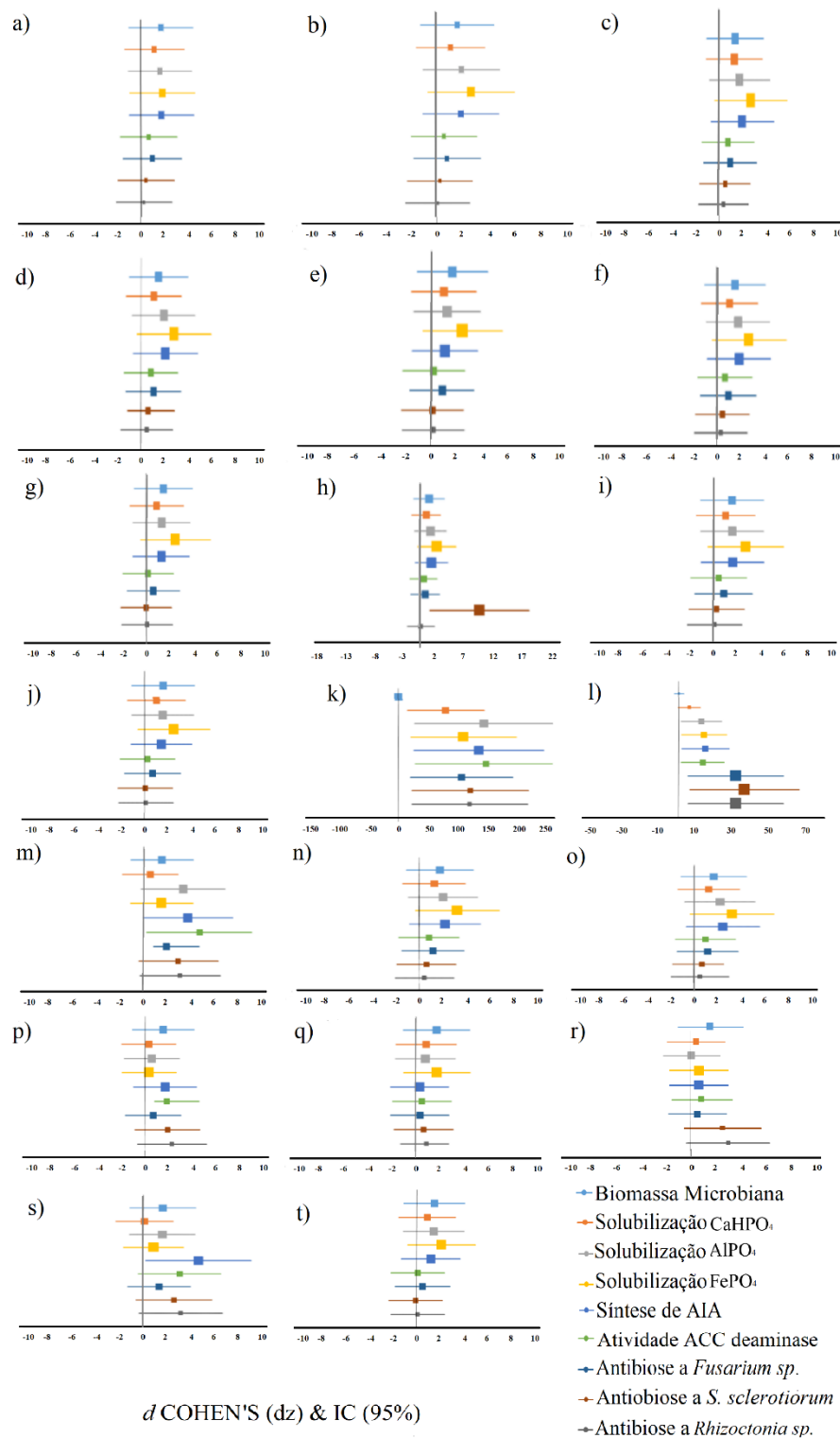


Figura 7- Tamanho de Efeito d de Cohen's (DZ) e intervalo de confiança a 95% de probabilidade (95% IC) de: a) N da raiz; b) N parte aérea; c) P da parte aérea; d) P da raiz; e) P do solo; f) K do solo; g) Ca do solo; h) Mg do solo; i) Cu do solo; j) Fe da raiz; k) Fe da parte aérea, l) Fe do solo; m) Mn dos solo; n) Zn do solo; o) Al do solo; p) pH do solo; q) Matéria orgânica; r) Saturação de Al (M%) do solo; s) CTC do solo e; t) Carbono orgânico total, sobre a: Biomassa microbiana do solo; Solubilização de CaHPO_4 ; Solubilização de AlPO_4 ; Solubilização de FePO_4 ; Síntese de AIA.; Síntese de ACC Desaminase; Antibiose a *Fusarium sp.*; Antibiose a *Sclerotinia sclerotiorum*; Antibiose a *Rhizoctonia sp.*, obtidos de micro-organismos endófitos e rizosféricos isolados de *Hymenaea courbaril* do Cerrado.

Ao avaliar as contribuições individuais, Figura 08-a, nota-se que as bactérias gram-negativas do Pantanal explicam 49,9% da variação no conjunto de dados, e fungos de Serra de Caldas (Cerrado) explicam 19,9%. É também possível avaliar pela disposição nos eixos que os fungos do pantanal têm comportamento mais próximo das bactérias gram-negativas do Cerrado, assim como as bactérias gram-positivas do Pantanal se assemelham mais às bactérias gram-positivas do Cerrado.

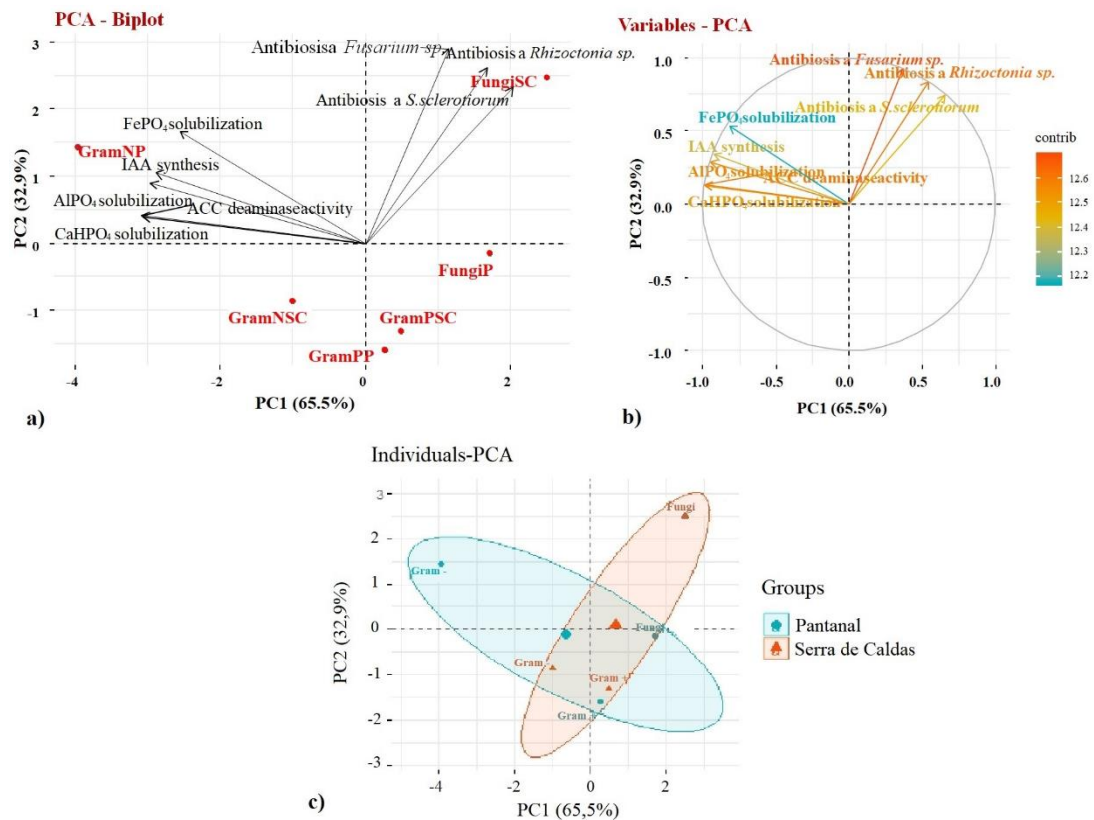


Figura 8 –Análises de Componentes Principais (PCA) relativas a PC1 e PC2, obtidas de dados de traços funcionais e grupos de micro-organismos endofíticos e rizosféricos, isolados de *Hymenaea courbaril* nos biomas Pantanal e Cerrado. a) Biplot de grupos de micro-organismos e variáveis (traços funcionais), b) gráfico de variáveis (traços funcionais), c) Coordenadas de grupamento de micro-organismos por local avaliado.

Os dois eixos principais juntos (PCA1-65,5 e PCA2 32,9%) explicaram 98,4% da variação dos dados. As variáveis correlacionadas que melhor explicaram o conjunto de dados foram solubilização de CaHPO₄ 19%, ACC desaminase 18%, síntese de AIA 16,4%, solubilização de AlPO₄ 17% e solubilização de FePO₄ 12,8% no primeiro eixo. No segundo eixo, a antibiose a *Fusarium sp.* explicou 32% da variação (Figura 08-b).

Na análise de grupamento, foi possível distribuir cada classe de micro-organismo entre os dois biomas (Figura 08-c). Observa-se que os grupos de biomas apresentam considerável sobreposição de comportamento. Deste modo, verifica-se que

as bactérias gram-negativas do Pantanal posicionadas mais à esquerda da elipse estão mais fortemente associadas à solubilização de FePO_4 , síntese de AIA, atividade da ACC desaminase e solubilização de AlPO_4 e CaHPO_4 . Enquanto os fungos do Cerrado estão mais associados à antibiose a *Fusarium* sp, *Rhizoctonia* sp. e *Sclerotium* e à solubilização de FePO_4 , estando posicionados no canto direito da elipse. Entretanto a sobreposição das elipses indica que os grupos de micro-organismos são similares entre os locais, corroborado ausência de significância ($p > 0,05$) da análise de variância dos tipos de micro-organismo entre os biomas.

4.4. DISCUSSÃO

4.4.1. Caracterização dos micro-organismos

Verificamos em nosso estudo predomínio entre os isolados de cocos gram-negativos no Pantanal (49% dos isolados)

e de fungos no Cerrado (42% do total de isolados). Maiores frequências de bactérias do tipo cocos gram-negativos também foram verificadas na pesquisa feita por Amarantes et al., (2010), ao analisar amostras de diferentes profundidades dos solos da Amazônia, tendo verificado que este tipo de bactéria representava 81,25% da população bacteriana.

Entretanto, maior frequência de gram-negativas não é regra, avaliando a microbiota em solo rizosférico de *Aristida adscensions* na Caatinga, Gorlach-lira e Coutinho (2007) verificaram que 83% dos seus isolados eram de perfil gram-positivo, sendo eles actinomicetos e bacilos. Ramos et al. (2018), avaliando a diversidade microbiana em solo rizosférico e não rizosférico de milho, verificaram predomínio de bacilos gram-positivos, que corresponderam a 43,3% de seus isolados. E Silva e Nahas (2002), avaliando a microbiota do solo sob diferentes formas de manejo, observaram predomínio de bacilos gram-positivos em 94,7% dos isolados.

A diferença nos resultados observados nesta pesquisa em comparação aos outros estudos provavelmente se deve a diferenças abióticas inerentes ao próprio bioma e inerentes também à seleção que *H. courbaril* pode conduzir na sua microbiota simbiótica. De acordo com Berg e Smalla (2009), as diversidades estruturais e funcionais de comunidades microbianas são influenciadas por vários fatores bióticos e

abióticos entre eles, o clima, a sazonalidade, o uso e ocupação do solo, manejo do solo, tipo e estrutura do solo, espécies de plantas e estágio de desenvolvimento vegetal.

Além disso, a composição química da rizosfera difere em razão da interação raiz-solo, principalmente em virtude das mudanças de pH e da exsudação de ácidos orgânicos, que são responsáveis pela disponibilização de nutrientes tais como P, Fe, Mn, Zn e Cu, assim como sua solubilidade (Braccini et al., 2000), deste modo influenciando na dinâmica das comunidades microbianas da rizosfera. Provavelmente o uso de plantas juvenis de *H. Courbaril* e as especificidades de sua rizosfera, aliados micro-organismos endofíticos, tenham sido importantes no estabelecimento dos grupos específicos de bactérias e fungos isolados.

Muitos exsudatos de plantas têm propriedades alelopáticas que podem influenciar na seleção do fitobioma e microbioma rizosférico. Desta forma, a planta e os micro-organismos a ela associados podem controlar e modelar o microbioma em geral e, desta forma, promover o crescimento vegetal e o biocontrole de patógenos (Jones et al 2019; Ab Rahman et al., 2018).

Assim sendo, a possibilidade de isolar micro-organismos capazes de desenvolver funções ecológicas diversas, seja como promotores do crescimento vegetal, solubilização de nutrientes e ação antagonista em relação a patógenos, é alternativa promissora, não só para um melhor entendimento da ecologia de um bioma, mas também pelo potencial desta microbiota para ser empregada na agricultura.

4.4.2. Diversidade funcional

A rizosfera é um campo de batalha onde a complexa comunidade microbiana interage com patógenos transmitidos pelo solo e influencia o resultado da infecção, deste modo, o desenvolvimento e atividades de fungos patogênicos, oomicetos, bactérias e/ou nematoides podem ser inibidos por vários microrganismos benéficos da rizosfera (Raaijmakers et al., 2009).

O antagonismo é geralmente mediado por enzimas líticas, metabolitos antimicrobianos ou efetores (Raaijmakers et al., 2009) bem como a inibição ao patógeno também pode ocorrer também via competição e hiperparasitismo. A ação

antagonista de micro-organismos rizosféricos isolados de milho foi reportada por Ramos et al. (2018) que identificaram 20 isolados bacterianos capazes de produzir proteases. Em bactérias associadas ao milho, no trabalho de Figueroa Lopez (2016), 14 isolados rizosféricos apresentaram efeito antagônico contra *Fusarium verticillioides*.

Além da atividade de biocontrole, o potencial uso de micro-organismos na promoção do crescimento vegetal (PGPR) é evidenciado pela sua capacidade na síntese de fitormônios como AIA e enzimas como ACC desaminase, ou pela solubilização de nutrientes como P. Rizobactérias (PGPR), que são um grupo heterogêneo de bactérias que podem melhorar a extensão ou a qualidade do crescimento das plantas, direta ou indiretamente (Ahmad et al. 2008). São relatadas como PGPR os gêneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Micrococcous*, *Rhizobium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Serratia* (Ahemad e Kibret 2014; Figueroa-López et al., 2016).

A capacidade de síntese de AIA, produção de sideróforos e solubilização de fosfatos, foi observada por Figueroa-Lopes et al. (2016), tendo sido *Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, *Paenibacillus polymyxa* e *Bacillus subtilis* eficazes na síntese de AIA. Na produção de sideróforos, destacaram-se isolados de *Pseudomonas putida*, *Bacillus flexus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*. Ramos et al. (2018) verificaram em 7 de 29 isolados bacterianos da rizosfera, capacidade de produzir halo de solubilização em meio cultura contendo $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Após 15 dias de cultivo, 27 bactérias isoladas de raízes de milho foram capazes de solubilizar fosfato (CaHPO_4) em pesquisa conduzida por Pedrinho et al. (2010).

Identificar e isolar micro-organismos capazes de solubilizar o P e disponibilizar para as plantas é uma alternativa promissora para uso como biofertilizantes, proporcionando estratégias de manejo dos sistemas agrícolas de modo mais sustentável, principalmente considerando que as fontes de P para fertilização química são finitas.

4.4.3. Diversidade funcional e tamanho do efeito das características do solo

As diferentes características dos biomas, apesar de atraírem diferentes tipos microbianos, não selecionam grupos específicos, segundo sua funcionalidade, diferentes características do solo têm efeito sobre a diversidade funcional.

Jones et al. (2019) apontam uma série de fatores envolvidos na colonização da rizosfera por micro-organismos, entre eles, a importância dos exsudatos e mucilagens, que propiciam disponibilidade de nutrientes, bem como a síntese de fitormônios como etileno e ácidos salicílico, que estão relacionadas a sinalizações moleculares em resposta à defesa vegetal.

Este fato é corroborado por nossa observação de que a matéria orgânica e o pH do solo afetam diferentemente a microbiota nos biomas avaliados. O efeito do pH na relação C:N e a MO na estrutura da comunidade microbiana são tratados nas pesquisas de Bach et al. (2010), Bissett et al. (2010) e Bernett et al. (2019), e geralmente a redução do pH está associada a uma menor diversidade da comunidade microbiana. A matéria orgânica tem importância como fonte de nutrientes para os micro-organismos durante o processo de decomposição e também por estar associada a uma maior retenção de umidade e nutrientes do solo (Leff et al., 2015), favorecendo, portanto, a colonização microbiana.

Os conteúdos de Fe da raiz, parte aérea e solo, Mn, pH, Matéria orgânica e CTC foram os que mais influenciaram na diversidade dentro dos traços funcionais, sendo todos os efeitos considerados muito grandes de acordo com a classificação de Cohen's modificada (Rosenthal, 1996).

A importância das propriedades do solo na determinação da constituição da comunidade microbiana foi apresentada por Jones et al. (2019), que sinalizaram o efeito da disponibilidade de nutrientes como Ca, Mg e K sobre o perfil transcricional do microbioma. Leff et al. (2015) observaram que a adição de N e P ao solo rizosférico acarreta redução da biomassa microbiana e das taxas respiratórias.

As bactérias gram-negativas do Pantanal e os fungos do Cerrado explicam a maior parte da variação dos dados: as primeiras mais associadas à solubilização de CaHPO_4 , FePO_4 e AlPO_4 bem como à síntese de AIA e ACC desaminase; já os segundos estão mais relacionados à antibiose contra os três fitopatógenos testados.

Na análise de agrupamento da PCA, Figura 8, observa-se que os traços funcionais solubilização de CaHPO_4 , FePO_4 e AlPO_4 , síntese de AIA e ACC desaminase estão posicionados na parte superior esquerda, fortemente associados às bactérias Gram negativas do Pantanal, e os traços relacionados à atividade de

antibiose estão mais fortemente associados ao fungos do Cerrado, indicando uma tendência na distinção destes efeitos em cada bioma, entretanto, apesar do posicionamento entre as elipses dos biomas quanto aos traços funcionais. Estas elipses se encontram no ponto de distribuição das variáveis, conforme já comentado, apesar do efeito positivo de algumas variáveis do solo sobre os traços funcionais.

A exemplo, a concentração de Fe nos solos do Cerrado, que é três vezes maior do que observado no solo do Pantanal, influenciou sobremaneira quase todos os traços funcionais. A disponibilização de Fe à planta em pequenas quantidades estimula a produção de auxinas, bem como a redução da toxicidade por metais pesados como Al^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} além do próprio ferro. A produção de sideróforos também tem papel importante na antibiose pela competição contra patógenos por este nutriente (Pelzer et al., 2011).

A interação entre solo e micro-organismos também se evidencia quando correlacionamos as concentrações dos nutrientes com os traços funcionais, assim como verificamos maior número de micro-organismos solubilizadores de ferro no bioma Cerrado. As maiores concentrações de cálcio nos solos do Pantanal também promoveram maior colonização de micro-organismos com traço de solubilização para este nutriente. A maior frequência de fungos no bioma Cerrado também pode ser explicada pelo pH mais ácido observado neste bioma. Entretanto, deve ser considerado também que a *H. courbaril* tem capacidade atrair estes micro-organismos via exsudatos ou mucilagens.

Este trabalho traz informações relevantes sobre a interação solo x micro-organismos endofíticos e rizosféricos isolados de *H. courbaril* dos biomas Cerrado e Pantanal, que podem ser usadas para embasar trabalhos futuros e entender melhor como os fatores ambientais influenciam na funcionalidade dos micro-organismos no microbioma.

4.5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Características do solo rizosférico como pH, M.O, Fe da raiz, Fe da parte aérea, Fe do solo e Mn do solo exerceram efeito significativo sobre a funcionalidade da comunidade microbiana de *H. courbaril*.

Não observamos diferença na diversidade funcional da microbiota simbiótica a *H. courbaril*, amostrada nos biomas Pantanal e Cerrado, contudo bactérias gram-

negativas do Pantanal e fungos do Cerrado se mostraram bastante divergentes em relação a outros grupos especializados na solubilização de CaHPO_4 , FePO_4 e AlPO_4 e na síntese de AIA e ACC para a primeira e antibiose *Fusarium* sp. a *Sclerotinia sclerotiorum* e a *Rhizoctonia* sp para a segunda.

4.6 REFERÊNCIA (checar se todas as citações acima, estão aqui)

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University Science**, 26: 1-20, 2014.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Triagem de bactérias rizosféricas de vida livre para suas múltiplas atividades promotoras de crescimento de plantas. **Microbiol Res**, 163:173–181, 2008.

ALORI, E.T.; GLICK, B.R.; BABALOLA, O.O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. **Frontiers in Microbiology**. 8: 1664-302. 2017.

AMARANTES, C.B.; RUIVO, M.L.P; OLIVEIRA, M.L.; MOURA, Q.L. Diversidade Microbiana em solos de Terra Preta Arqueológica. **Enciclopédia biosfera**, v. 6, n. 11, p. 1-10, 2010.

BACH, E.M.; BAER, S.G.; MEYER, C.K.; SIX, J. Soil texture affects soil microbial and structural recovery during grassland restoration. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, 2182-2191, 2010.

BADALYAN, S.M.; INNOCENTI G.; GARIBYAN N.G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterrânea**. 41: 200-225. 2002.

BARNETT, S.E.; YOUNGBLUT, N.D.; BUCKLEY, D.H. Soil characteristics and land-use drive bacterial community assembly patterns. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, 2019.

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, Páginas 1–13, 2009.

BINI, D.; LOPEZ, M.V. **Microbiologia do solo**. 2º ed Piracicaba, SP: ESALQ, p.159, 2016.

BISSETT, A.; RICHARDSON, A.E.; BAKER, G.; WAKELIN, S.; THRALL, P.H. Life history determines biogeographical patterns of soil bacterial communities over multiple spatial scales. **Molecular Ecology**, 19(19), 4315-4327, 2010.

BRACCINI, M.D.C.L.; MARTINEZ, H.E.P.; BRACCINI, A.D.L.; MENDONÇA, S.M.D. Avaliação do pH da rizosfera de genótipos de café em resposta à toxidez de alumínio no solo. **Bragantia**. vol. 59, n.1, pp.83-88, 2000.

CAMPBELL, B.J.; POLSON, S.W.; HANSON, T.E.; MACK, M.C.; SCHUUR, E.A.G. The effect of nutrient deposition on bacterial communities in Arctic tundra soil. **Environ Microbiol** 12(7):1842–1854, 2010.

CARVALHAIS, L.C.; DENNIS, P.G.; FAN, B.; FEDOSEYENKO, D.; KIERUL, K.; BECKER, A.; WIREN, N.V.; BORRIS, R. Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. **PLoS ONE** 8:e68555, 2013.

DANTAS G.; SOMMER, M.O.A. How to fight back against antibiotic resistance. **American Scientist**, 102 (1): 42–51, 2014.

FIGUEROA-LÓPEZ, A.M.; CORDERO-RAMÍREZ, J.D.; MARTINEZ, J.; LOPEZ-MEYER, M. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. **Springer Plus**, 5(1):1-12, 2016.

FREITAS, V.R.; PICOLI, S.U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. **NewsLab** 82: 124-128, 2007.

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.

GORLACH-LIRA, K.; COUTINHO, H.D.M. Population dynamics and extracellular enzymes activity of mesophilic and thermophilic bacteria isolated from semi-arid soil of Northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 1, p. 135-141, 2007.

JONAS, P.; GARCIA, B.J.; FURCHES, A.; TUSKAN, G.J.; JACOBSON, D. Plant host-associated mechanisms for microbial selection. **Plant Sci**. Doi.org/10.3389, 2019.
KUSS AV, KUSS VV, LOVATO T, FLÔRES ML. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indol acético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:1459-1465, 2007.

LEFF, J.W.; JONES, S.E.; PROBER, S.M.; BARBERÁN, A.; BORER, E.T.; FIRN, J.L.; W. HARPOLE, S.; HOBBIE, S.E.; HOFMOCKEL, K.S.; KNOPS, J.M.H.; MCCULLEY, R.L.; PIERRE, K.L.; RISCH, A.C.; SEABLOOM, E.W.; SCHÜTZ, M.; STEENBOCK, C.; STEVENS, C.J.; FIERER, N. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. **PNAS**, V. 112 (35) 10967-10972, 2015.

LUCON, C.M.M.; AKAMATSU, M.A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 43, n. 6, p. 691-697, 2008.

MCNEAR, D.H. The rhizosphere-roots, soil and everything in between. **Nature Education**, 4(3):1, 2013.

MENDES, I.C.; FERNANDES, F.M.; CHAER, G.M.; REIS JUNIOR, F.B. Biological functioning of Brazilian Cerrado soils under different vegetation types. **Plant and Soil** 352: 183-195, 2012.

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

PELZER, G.Q.; VIEIRA, B.A.H.; NECHET, K.L.; SOUZA, G.R.; ZILLI, J.É.; PERIN, L. Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical plant pathology**. Brasília, vol.36 no.2, 2011.

PETRINI, O., E. Muller. Haupt und nebenfruchtformen europaischer pilze. **Mycologia Helvetica**, 1: 501-627, 1986.

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

RAAIJMAKERS, J.M.; PAULITZ, T.C.; STEINBERG, C.; ALABOUVETTE, C.; LOCCOZ, Y.M. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. **Plant and Soil**, Volume 321, p. 341–361, 2009.

RAMIREZ, K.S.; CRAINE J.M.; FIERER, N. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. **Glob Change Biol**, 18:1918–1927, 2012.

RAMIREZ, K.S; LAUBER, C.L; KNIGHT, R.; BRADFORD, M.; FIERER, N. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. **Ecology**, 91(12):3463–3470, 2010.

RAMOS, R.F.; SOBUCKI, L.; ROHRIG, B.; LUDWIG, J.; DAROIT, D.J. Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférico e não rizosférico em cultura de milho. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, n. 3, 2018.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas – Fundamentos**. Viçosa - MG: UFV, p. 296, 2007.

Rosenthal, J.A. Descritores Qualitativos da Força da Associação e Tamanho do Efeito. **Journal of Social Service Research**, 21 (4), 37–59, 1996.

SASSE, J.; MARTINOIA, E.; NORTHEN, T. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome?. **Trends in Plant Science**, 23, 25–41, 2018.

SHI, J.Y.; YUAN, X.F.; LIN, H.R.; YANG, Y.Q.; LI, Z. Y. Differences in soil properties and bacterial communities between the rhizosphere and bulk soil and among different production areas of the medicinal plant *Fritillaria thunbergii*. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, p. 3770-3785, 2011.

SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v.9, n.4, p.535-538, 2008.

SILVA, E.E.; AZEVEDO, P.H.S.; DE-POLLI, H. Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (BMS-C). Embrapa Agrobiologia. **Comunicado Técnico, 98**. 6 p. 2007.

SILVA, P.; NAHAS, E. Bacterial diversity in soil in response to different plants, phosphate fertilizers and liming. **Brazilian Journal of Microbiology** 33: 304-310, 2002.

SMITH, S.E.; JAKOBSEN, I.; GRONLUND, M.; SMITH, F.A. Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Phosphorus Nutrition: Interactions between Pathways of Phosphorus Uptake in Arbuscular Mycorrhizal Roots Have Important Implications for Understanding and Manipulating Plant Phosphorus Acquisition Plant Physiology. **American Society of Plant Biologists**. Australia, v. 156, p. 1050– 1057. 2011.

SYED-AB-RAHMAN S.,F; CARVALHAIS, L.C; CHUA, E.; XIAO, Y.; WASS, T.J.; SCHENK, P.M. Identification of Soil Bacterial Isolates Suppressing Different *Phytophthora* spp. and Promoting Plant Growth. **Front Plant Sci**, 9:1502. 18, 2018.

TEDERSOO, L.; BAHRAM, M.; POLME, S.; KOLJALG, U.; YOROU, N.S.; WIJESUNDERA, R.; VILLARREAL R.L.; VASCO-PALACIOS, A.M.; et al. Fungal biogeography. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**. v. 346 (6213):1256688, 2014.

TRESEDER, K.K. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric CO₂ in field studies. **New Phytologist**, 164: 347– 355, 2004.

5. CAPÍTULO II

Traços funcionais da microbiota radicular endofítica e rizosférica de *Hymenaea coubaril* L., amostrada em Cerrado e Pantanal

Traços funcionais da microbiota radicular endofítica e rizosférica de *Hymenaea coubaril* L., amostrada em Cerrado e Pantanal

RESUMO

Micro-organismos endofíticos e rizosféricos vivem associados a plantas nos mais diversos ecossistemas, sendo muitas vezes relacionados à promoção do crescimento de espécies pela síntese de compostos bioativos. Por isso, estes micro-organismos têm chamado atenção na aplicação agrícola e/ou biotecnológica bem como no controle de fitopatógenos, já que sua ação pode estar relacionada à síntese de compostos que atuam no mecanismo da antibiose. O objetivo desse trabalho foi avaliar a funcionalidade da microbiota endofítica radicular e rizosférica cultivável de *Hymenaea courbaril*, obtida do Pantanal e Cerrado. Amostras de raízes e solo rizosférico foram obtidas de espécimes coletados no Cerrado e Pantanal. Para este estudo, foram feitos testes de solubilização dos fosfatos de CaHPO_4 , AlPO_4 ou FePO_4 , síntese de AIA, enzima ACC desaminase bem como da ação antagonista frente aos fitopatógenos *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium* sp. Foi isolado um total de 56 bactérias e 21 fungos. Todas as bactérias testadas foram capazes de solubilizar CaHPO_4 . A quantificação da solubilização de AlPO_4 por bactérias apresentou resultados positivos, sendo as maiores taxas verificadas para os isolados HSCB3 (0,922 mg L⁻¹), HSCB15 (0,861 mg L⁻¹) do Cerrado, e HPAB35 (0,863 mg L⁻¹), HPAB19 (0,858 mg L⁻¹) do Pantanal. Para a solubilização de FePO_4 , destacaram-se os isolados HPAB32 (3,955 mg L⁻¹), HPAB11 (3,267 mg L⁻¹) do Pantanal, e HSCB1 (4,386 mg L⁻¹), HSCB6 (4,272 mg L⁻¹) do Cerrado. Nos isolados do Cerrado, a maior eficiência de solubilização foi observada para os fungos HSCF14 (0,574 mg L⁻¹ AlPO_4), HSCF13 (0,862 mg L⁻¹ FePO_4) e no Pantanal, destacaram-se HPAF3 (0,392 mg L⁻¹ AlPO_4) e HPAF2 (0,846 mg L⁻¹ FePO_4). Os fungos apresentaram maior capacidade de síntese de AIA. O isolado HSCF14 (Cerrado) produziu 111,38 µg mL⁻¹, seguido por HPAF6 (Pantanal) com 85,12 µg mL⁻¹. As rizobactérias que apresentaram maior produção de AIA foram HPAB26 com 20,65 µg mL⁻¹, proveniente do Pantanal, seguida de HSCB10 com 13,95 µg mL⁻¹, do Cerrado. Na avaliação de antibiose para isolados do Pantanal, HPAEB7 e HPAB27 inibiram principalmente o crescimento de *Fusarium* sp. e *Sclerotinia sclerotiorum*. Em relação aos fungos, HPAF4 e HPAF5 obtiveram a maior taxa de inibição a *Rhizoctonia* sp.; já para *S. sclerotiorum*, foram os HPAF1 e HPAF3, HPAF2 e HPAF4. Para Cerrado, a bactéria rizosférica HCEB19 inibiu até 19,78% de *Fusarium* sp. e a bactéria HCEB4 inibiu 51,48% a *S. sclerotiorum*. Em relação aos fungos isolados do Cerrado, eles apresentaram grande potencial de inibição aos fitopatógenos testados. Todos os isolados bacterianos foram capazes de crescer em meio contendo ACC. Conclui-se que existem micro-organismos endofíticos e rizosféricos associados a *Hymenaea courbaril*, com potencial para serem explorados para produção de bioinoculantes promotores do crescimento vegetal.

PALAVRAS-CHAVES: Potencial biotecnológico, auxina, antibiose, solubilização de fosfato, ACC desaminase.

**Functional traits of the radicular and rhizospheric endophytic microbiota of
Hymenaea courbaril L. sampled in the Cerrado and Pantanal biomes**

ABSTRACT

Endophytic and rhizospheric microorganisms are found in association with plants in an ample diversity of ecosystems, and are often related to the promotion of plant growth through the synthesis of bioactive compounds. For this reason, these microorganisms have attracted attention with regard to their potential agricultural and/or biotechnological applications, as well as for the control of phytopathogens, given that they may be related to the synthesis of compounds that have antibiotic effects. This study evaluated the functionality of the cultivable radicular, endophytic, and rhizospheric microbiota of *Hymenaea courbaril*, obtained from the Pantanal and Cerrado biomes. Samples of the root and the rhizospheric soil were obtained from specimens collected in both biomes. In the present study, the samples were tested to determine their capacity to solubilize CaHPO_4 , FePO_4 and AlPO_4 , to synthesize AIA and the enzyme ACC deaminase, as well as for their antagonistic action toward *Fusarium* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*, and *Rhizoctonia* sp. A total of 56 bacteria and 21 fungi were isolated. All the bacteria tested were able to solubilize CaHPO_4 . Positive results were also obtained for the solubilization of AlPO_4 by the bacteria, with the highest rates being recorded for the HSCB3 (0.922 mg L⁻¹) and HSCB15 strains (0.861 mg L⁻¹) isolated in the Cerrado, and the HPAB35 (0.863 mg L⁻¹) and HPAB19 (0.858 mg L⁻¹) isolates from the Pantanal. In the case of FePO_4 , the HPAB32 (3.955 mg L⁻¹) and HPAB11 (3.267 mg L⁻¹) isolates were the best solubilizers from the Pantanal, while the HSCB1 (4.386 mg L⁻¹) and HSCB6 (4.272 mg L⁻¹) isolates from the Cerrado were the most prominent. In the Cerrado isolates, the greatest solubilizing efficiency was observed in the fungi HSCF14 (0.574 mg.L⁻¹ AlPO_4) and HSCF13 (0.862 mg.L⁻¹ FePO_4), while in the Pantanal, the two most efficient strains were HPAF3 (0.392 mg.L⁻¹ AlPO_4) and HPAF2 (0.846 mg.L⁻¹ FePO_4). The fungi presented the greatest capacity for the synthesis of AIA. The HSCF14 isolate (Cerrado) produced 111.38 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, followed by HPAF6 (Pantanal) with 85.12 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The rhizobacteria that produced the most AIA were HPAB26, from the Pantanal, at 20.65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, followed by HSCB10 (Cerrado) at 13.95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. In the evaluation of antibiosis in the Pantanal isolates, HPAEB7 and HPAB27 were the primary inhibitors of the growth of *Fusarium* sp. and *Sclerotinia sclerotiorum*. In the case of the fungi, isolates HPAF4 and HPAF5 were the primary inhibitors of *Rhizoctonia* sp., while the isolates HPAF1, HPAF3, HPAF2, and HPAF4 all inhibited *S. sclerotiorum*. In the Cerrado, the rhizospheric bacterium HCEB19 inhibited up to 19.78% of *Fusarium* sp. while the HCEB4 strain inhibited 51.48% of *S. sclerotiorum*. The fungi isolated from the Cerrado presented considerable potential for the inhibition of the phytopathogens tested. All the bacterial isolates were able to grow in medium containing ACC. The findings of the present study indicated that a number of the endophytic and rhizospheric microorganisms associated with *Hymenaea courbaril* have potential for the production of bioinoculants that promote plant growth.

KEYWORDS: Biotechnological potential, auxin, antibiosis, solubilization of phosphate, ACC desaminase.

5.1. INTRODUÇÃO

O interesse na interação planta-micro-organismo tem aumentado progressivamente visando à descoberta e à exploração do potencial biotecnológico de fungos e bactérias (Gaggia et al., 2013).

Muitos micro-organismos têm grande importância ecológica por apresentarem estreita relação com as plantas, como os endofíticos e rizosféricos. A rizosfera é a região do solo que tem influência direta das raízes, onde ocorre a maior parte das interações entre micro-organismos e plantas (Philippot et al., 2013). Desta forma, é considerada um importante ecossistema por ter grande fluxo de energia, exercendo forte impacto sobre o funcionamento da biosfera e de outros ecossistemas (Berg et al., 2009). Da mesma forma ocorre com endofíticos, que beneficiam a nutrição, o crescimento vegetal, impedindo a colonização de organismo fitopatogênicos. Em contrapartida, os endofíticos encontram nas plantas um habitat com nutrientes e com menor competição com outros micro-organismos (Hardoim et al., 2015; Santos et al., 2011).

A influência desses micro-organismos que vivem associados simbioticamente à planta está relacionada às suas atividades metabólicas únicas, que possibilitam a promoção do crescimento (Compant et al., 2010). Eles aumentam a aquisição de nutrientes pelas plantas e estão envolvidos em uma ampla gama de processos biológicos, incluindo a transformação de nutrientes insolúveis do solo (Alori et al., 2017).

A seleção de cepas com potencial multifuncional é estratégica, visto serem micro-organismos que têm mais de uma característica benéfica à planta (Vassilev et al., 2012). Entre as diversas atividades exercidas pelos endofíticos e/ou rizosféricos simbioticamente associados aos tecidos vegetais, estão a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a produção de fitormônios, a solubilização de fosfatos, produção de ACC desaminase e até mesmo a síntese de moléculas antibióticas que atuam no controle de fitopatógenos (Pandya et al., 2015; Ashraf et al., 2011; Rodriguez et al., 2009).

Conhecer a microbiota associada a espécies vegetais nativas dos biomas bem como sua diversidade funcional e possível aplicação agrícola e/ou biotecnológica ainda é um desafio. Como os atributos do solo são importantes para definir a microbiota simbiótica das plantas, foi levantada a hipótese de que uma mesma planta amostrada em diferentes biomas pudesse abrigar microbiomas funcionalmente diferentes.

Estudar as relações de espécies de plantas destes biomas com micro-organismos é promissor para o entendimento de como estas adaptações se desenvolveram frente aos eventos de simbiose. Assim, trabalhos como este se destacam por ser um ponto de partida para novas descobertas de importância biotecnológicas. Diante disto, o objetivo foi avaliar os traços funcionais (solubilização dos fosfatos CaHPO_4 , AlPO_4 ou FePO_4 , síntese de AIA, atividade da enzima ACC desaminase e ação antagonista frente aos fitopatógenos *Rhizoctonia sp.*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium sp.*) da microbiota endofítica radicular e rizosférica cultivável de *Hymenaea courbaril*, obtida do Pantanal e Cerrado.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Obtenção do material vegetal

Foram amostradas mudas jovens, totalmente desenvolvidas, de ocorrência natural da espécie *H. courbaril* nos biomas Cerrado e no Pantanal. A amostra do Cerrado foi obtida na área de preservação permanente do Parque da Serra de Caldas (Rio Quente-GO), (17°48'29.77" de latitude Sul e 48°41'59.61" de longitude Oeste a 985 m de altitude), enquanto a amostra do Pantanal foi coletada no Parque Natural

Municipal de Piraputangas (MS), (19°14'26.79" de latitude Sul e 57°37'20.23" de longitude Oeste a 351 m de altitude).

As mudas foram retiradas em blocos de solo, cortados com raio de 30 cm de distância do caule, de forma a proteger a raiz. Posteriormente, as mudas foram acondicionadas em saco plástico esterilizado, imersas em gelo e transportadas para o Laboratório de Microbiologia Agrícola do Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde, em Rio Verde, Goiás. Também foram feitos coleta e armazenamento asséptico de 10g de solo que estava em contato direto com as raízes de cada uma das plantas coletadas. As raízes foram imediatamente conduzidas à assepsia.

5.2.2. Isolamento dos micro-organismos endófitos radiculares

Fragmentos de raízes de aproximadamente 10 cm de comprimento foram amostrados da espécime e submetidos a tratamento prévio de desinfestação, segundo método descrito por Petrini e Muller (1986), com modificações. As amostras foram lavadas em água corrente, posteriormente imersas em água de torneira com tween 80 e agitadas em mesa agitadora a 150 rpm, por 5 minutos. O material foi levado ao fluxo laminar para assepsia com álcool 70% (v/v)/ um min, hipoclorito de sódio (2,5%) de cloro ativo (v/v)/ três min e novamente álcool 70% (v/v)/ 30 seg. Como controle do processo de assepsia, foram coletados 500 µL da água utilizada no enxágue final das amostras para inoculação em tubos contendo 5 mL de caldo nutriente. Fragmentos de aproximadamente um cm de raiz foram obtidos com auxílio de pinça e tesoura e distribuídos superficialmente em placas de Petri contendo meio Ágar nutriente (AN). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30°C e observadas diariamente.

5.2.3. Isolamento dos micro-organismos rizosféricos

Alíquotas de 10g de solo foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL, contendo 90ml de solução salina (0,85% NaCl) (v/v) esterilizada. Os frascos foram agitados manualmente por meia hora em temperatura ambiente (28 ± 1 °C). Transcorrido esse tempo, foi feita uma diluição seriada 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶, coletando uma alíquota de 1000 µl da suspensão de solo, depositando-a em tubos de ensaio contendo 9000 µl de solução salina (0,85% NaCl) (v/v) esterilizada. Cerca de 100 µl de cada diluição foram pipetados para placas de Petri contendo AN e espalhado

com alça de Drygalski, utilizando as diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . As placas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 a 48 horas.

5.2.4. Purificação e manutenção dos endofíticos e rizosféricos

Colônias bacterianas individuais foram purificadas via esgotamento por estria em AN, já as de fungo foram purificadas por obtenção de fragmento de micélio jovem que surgem das bordas dos fragmentos. Os isolados foram estocados em coleção de culturas em geladeira a 4°C .

5.2.5. Avaliação dos traços funcionais

5.2.5.1. - Avaliação da capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, ferro e alumínio

Para a avaliação das fontes de P, foi utilizado o meio de cultura GL (10g glicose, 2g extrato de levedura) como testemunha, suplementado com uma das três fontes (CaHPO_4 , AlPO_4 ou FePO_4). Para as amostras de bactérias, foi inoculado 1 mL da cultura previamente padronizada em 10 mL de meio líquido GL e adicionado $1,26 \text{ g L}^{-1}$ de cada uma das fontes fosfatadas (CaHPO_4 , AlPO_4 e FePO_4) (Barroso e Nahas 2008). Para os fungos, foi retirado um disco de 5 mm de diâmetro com crescimento micelial e inoculado em frasco de penicilina (um disco por vidro). As culturas permaneceram sob agitação a 90 rpm, em 30°C , por 72h. Posteriormente, foi feita medição do pH. Para a determinação da quantidade de P inorgânico, foi utilizado o método colorimétrico da vitamina C, a 725nm, de Gadagi e Sa (2002).

5.2.5.2. - Avaliação da capacidade de síntese de ácido indol acético (AIA)

A quantificação de ácido indol acético (AIA) foi feita de acordo com Kuss et al. (2007), em meio DYGS. Uma curva padrão de AIA foi construída com auxina comercial e utilizada para avaliação da síntese de AIA por parte das bactérias, utilizando dados de absorvância. Os valores foram expressos em $\mu\text{g mL}$.

5.2.5.3. - Avaliação da antibiose a *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium* sp.

O teste de cultura pareada foi feito segundo Shiomi et al. (2008), em meio batata dextrose Agar (BDA). Para as bactérias, foi feito por meio de duas estrias equidistantes e um disco de 5mm do micélio do fungo disposto no centro da placa, crescido por cinco dias. Para os fungos, foram utilizados discos de 6 mm de diâmetro de colônias dos fitopatógenos e um disco de 6 mm de colônia fúngica, que foram inoculados em polos opostos em placas de Petri (4 cm de distância). As culturas pareadas foram incubadas a 28°C durante 7 dias. Os testes foram feitos em triplicata. Para o controle negativo, foi inoculado somente o fitopatógeno em um polo da placa. A inibição foi avaliada por medições do raio de crescimento do fitopatógeno em comparação com o controle (não submetido a bactérias ou fungos simbióticos testados). Inicialmente, foi feita uma seleção com as bactérias isoladas. Em placa de Petri, foram colocados cinco bactérias e um disco do fitopatógeno no meio da placa. As bactérias que apresentavam inibição inicial ao fitopatógeno foram selecionadas para a avaliação final de inibição.

As interações competitivas foram analisadas segundo a escala de Badalyan et al. (2002). O diâmetro da colônia fungo fitopatogênico foi medido com paquímetro, e a porcentagem de supressão de cada fungo, calculada pelo índice de inibição relativo (IR):

$$IR (\%) = \frac{(RC - RX)}{RC} \times 100, \text{ sendo:}$$

RC = raio da colônia do patógeno no tratamento controle

RX = raio da colônia do patógeno pareada com o isolado

5.2.5.4. -Avaliação da produção da enzima ACC desaminase

Foi utilizado o método descrito por Lucon et al. (2008), tendo sido a capacidade de crescimento dos isolados em presença de ACC verificada em meio líquido, com incubação por 48h a 27°C, sob agitação constante. Foi utilizado um meio mínimo, com adição de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) como única fonte de N, com a seguinte composição: 4 g de KH₂PO₄, 10 mg de H₃BO₄, 6 g de Na₂HPO₄, 10 mg de MnSO₄.7H₂O, 0,2 g de MgSO₄.7H₂O, 70 mg de ZnSO₄, 1 mg de

FeSO₄.7H₂O, 50 mg de CuSO₄, 2 g de glicose, 10 mg de MoO₃, 2 g de ácido glucônico, 2 g de ácido cítrico, 3 mM de ACC e 1 L de água destilada. A avaliação final foi feita pela quantificação do crescimento bacteriano pelo método turbidimétrico (Romeiro, 2007), efetivado pela leitura de absorvância (595 nm) em espectrofotômetro, comparando a leitura final (48 horas) com a do tempo zero.

5.2.6. Delineamento experimental e análises estatísticas

Os dados relacionados à capacidade funcional de cada isolado foram comparados entre si dentro de cada bioma. Todos os testes foram feitos em triplicada, e os dados, submetidos à ANOVA. Quando as diferenças se mostraram significativas pelo teste de F, as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5%, utilizando o software Sisvar (Ferreira, 2008).

5.3. RESULTADOS

5.3.1. - Capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, ferro e alumínio

Foram obtidos 56 isolados bacterianos e 21 isolados fúngicos em solo de rizosfera e raízes de *H. courbaril*. Destes, 20 bactérias e 15 fungos foram isolados em amostra do Cerrado e 36 bactérias e 6 fungos em amostra do Pantanal.

Todas as bactérias isoladas de *H. courbaril* tanto Cerrado quanto do Pantanal apresentaram capacidade de solubilização de CaHPO₄, com resultados superiores ao controle, Tabelas 1 e 2, sendo esta a fonte mais solubilizada. As bactérias isoladas do Cerrado, testadas para solubilização de AlPO₄, Tabela 1, foram superiores ao tratamento controle (0,130 mg L⁻¹), com destaque para três bactérias (15%) que se destacaram, HCEB3 (0,922 mg L⁻¹), HCEB15 (0,861 mg L⁻¹) e HCEB20 (0,789 mg L⁻¹).

Em relação à capacidade de solubilização de FePO₄, 75% (n=14) das bactérias possibilitaram as maiores taxas de solubilização, com valores superiores a 3 mg L⁻¹, contudo as demais apresentaram valores mais baixos, sendo elas: HCEB8 (2,929 mg L⁻¹), HCEB15 (3,061 mg L⁻¹), HCEB17 (2,329 mg L⁻¹), HCEB18 (2,992 mg L⁻¹), HCEB19 (2,315 mg L⁻¹) e HCEB20 (2,880 mg L⁻¹) (Tabela 1). Verificou-se que a

atividade de solubilização de CaHPO_4 , AlPO_4 e FePO_4 induziu reduções do pH do meio, o que pode ser evidenciado quando se compara o pH observado nas amostras com o controle, sem inoculação.

Tabela 1. Solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO_4), de alumínio (AlPO_4) e de ferro (FePO_4) por bactérias obtidas de raízes e rizosfera de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado.

Isolados	Endofíticos/ Rizoféricos	CaHPO_4		AlPO_4		FePO_4	
		P solúvel (mg L^{-1})	pH	P solúvel (mg L^{-1})	pH	P solúvel (mg L^{-1})	Ph
HCEB1	Endofíticos	6,71 a	4,99 b	0,69 b	3,29 d	4,39 a	4,55 c
HCEB2	Endofíticos	6,06 a	4,89 c	0,63 b	3,35 d	4,28 a	4,52 c
HCEB3	Endofíticos	6,22 a	5,05 b	0,92 a	3,80 d	3,91 a	4,79 c
HCEB4	Endofíticos	6,16 a	5,21 b	0,71 b	3,42 d	3,99 a	4,68 c
HCEB5	Endofíticos	6,16 a	4,96 b	0,69 b	3,38 d	3,89 a	4,20 c
HCEB6	Endofíticos	6,29 a	4,75 c	0,60 c	3,68 d	4,27 a	4,57 c
HCEB7	Endofíticos	6,56 a	4,99 b	0,67 b	4,10 c	3,75 a	4,65 c
HCEB8	Endofíticos	6,35 a	5,25 b	0,70 b	3,43 d	2,93 b	4,73 c
HCEB9	Endofíticos	-----	-----	0,55 c	3,84 d	3,49 a	4,70 c
HCEB10	Rizoféricos	6,36 a	4,82 c	0,71 b	3,70 d	3,78 a	4,44 c
HCEB11	Rizoféricos	6,83 a	4,57 c	0,50 c	3,36 d	3,62 a	5,18 c
HCEB12	Rizoféricos	6,74 a	4,53 c	0,42 c	3,76 d	3,30 a	4,89 c
HCEB13	Rizoféricos	6,61 a	4,56 c	0,44 c	3,55 d	2,61 a	4,23 c
HCEB14	Rizoféricos	6,67 a	4,68 c	0,41 c	3,41 d	3,66 a	4,64 c
HCEB15	Rizoféricos	6,52 a	5,05 b	0,86 a	3,46 d	3,06 b	4,82 c
HCEB16	Rizoféricos	6,74 a	4,61 c	0,49 c	3,53 d	3,28 a	4,57 c
HCEB17	Rizoféricos	6,81 a	4,71 c	0,47 c	3,42 d	2,33 b	4,83 c
HCEB18	Rizoféricos	6,67 a	4,75 c	0,59 c	3,44 d	2,99 b	4,59 c
HCEB19	Rizoféricos	6,54 a	4,77 c	0,52 c	4,09 c	2,31 b	5,81 b
HCEB20	Rizoféricos	6,62 a	5,53 b	0,79 a	4,80 b	2,88 b	5,01 c
Controle		0,72 b	6,83 a	0,13 d	6,52 a	0,57 c	6,63 a

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

---- = sem crescimento

Em relação aos isolados do Pantanal, Tabela 2, a maior eficiência de solubilização de FePO_4 foi atingida pelos isolados HPAB9 ($2,793 \text{ mg L}^{-1}$), HPAB11 ($3,267 \text{ mg L}^{-1}$), HPAB12 ($3,018 \text{ mg L}^{-1}$), HPA18 ($2,817 \text{ mg L}^{-1}$), HPAB19 ($3,669 \text{ mg L}^{-1}$), HPAB22 ($3,098 \text{ mg L}^{-1}$), HAPA23 ($3,202 \text{ mg L}^{-1}$), HPA25 ($3,392 \text{ mg L}^{-1}$), HPA26 ($3,456 \text{ mg L}^{-1}$), HPA29 ($3,575 \text{ mg L}^{-1}$), HPA30 ($3,193 \text{ mg L}^{-1}$), HPA31 ($3,086 \text{ mg L}^{-1}$), HPA32 ($3,955 \text{ mg L}^{-1}$), HPA33 ($3,413 \text{ mg L}^{-1}$), HPA34 ($3,540 \text{ mg L}^{-1}$), HPA35 ($3,395 \text{ mg L}^{-1}$) e HPA36 ($3,914 \text{ mg L}^{-1}$). Para a solubilização em AlPO_4 , os maiores resultados, quando comparamos ao controle ($-0,130 \text{ mg L}^{-1}$), foram observados para as bactérias HPAB35, HPAB19, HPAB22 ($0,863$, $0,858$ e $0,768 \text{ mg L}^{-1}$). Assim como observado para os dados de Cerrado, a atividade de solubilização de FePO_4 , CaHPO_4 e AlPO_4 também foi acompanhada pela redução do pH do meio.

Tabela 2. Solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO₄), de alumínio (AlPO₄) e de ferro (FePO₄) por bactérias endofíticas e rizosféricas de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Pantanal, MS.

Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	CaHPO ₄		AlPO ₄		FePO ₄	
		P solúvel (mg L ⁻¹)	pH	P solúvel (mg L ⁻¹)	pH	P solúvel (mg L ⁻¹)	pH
HPAB1	Endofíticos	6,15 a	4,240 c	0,45 c	3,27 c	1,99 b	3,43 b
HPAB2	Endofíticos	6,41 a	4,67 c	0,49 c	3,30 c	2,08 b	3,53 c
HPAB3	Endofíticos	6,05 a	6,96 a	0,61 b	3,16 c	2,10 b	3,51 c
HPAB4	Endofíticos	6,40 a	5,88 b	0,58 b	3,20 c	2,38 b	4,10 c
HPAB5	Endofíticos	6,25 a	5,84 b	0,47 c	3,36 c	2,50 b	5,17 b
HPAB6	Endofíticos	6,33 a	4,99 c	0,43 c	3,25 c	1,87 b	3,92 c
HPAB7	Endofíticos	6,08 a	4,97 c	0,43 c	3,28 c	2,45 b	3,58 c
HPAB8	Endofíticos	5,99 a	4,99 c	0,44 c	3,35 c	1,89 b	3,75 c
HPAB9	Endofíticos	5,88 a	4,72 c	0,49 c	3,27 c	2,79 a	3,55 c
HPAB10	Endofíticos	5,73 a	4,83 c	0,33 c	3,36 c	1,81 b	3,85 c
HPAB11	Endofíticos	5,86 a	4,89 c	0,59 b	3,32 c	3,27 a	3,56 c
HPAB12	Rizosféricos	6,17 a	5,25 c	0,46 c	3,33 c	3,02 a	3,95 c
HPAB14	Rizosféricos	-----	-----	0,61 b	3,30 c	2,50 b	5,03 b
HPAB15	Rizosféricos	6,91 a	6,08 b	0,40 c	3,29 c	2,47 b	4,53 b
HPAB16	Rizosféricos	6,80 a	6,27 b	0,47 c	3,45 c	1,92 b	4,34 a
HPAB17	Rizosféricos	6,64 a	5,25 c	0,47 c	3,17 c	2,03 b	4,82 b
HPAB18	Rizosféricos	6,55 a	5,12 c	0,61 b	4,86 b	2,82 a	4,83 b
HPAB19	Rizosféricos	6,17 a	5,59 b	0,86 a	3,53 b	3,67 a	5,11 b
HPAB21	Rizosféricos	5,46 a	5,46 b	0,53 c	3,12 c	2,64 b	5,02 b
HPAB22	Rizosféricos	6,26 a	5,50 b	0,77 a	6,65 a	3,10 a	5,03 b
HPAB23	Rizosféricos	6,27 a	5,09 c	0,37 c	4,69 b	3,20 a	4,95 b
HPAB24	Rizosféricos	5,89 a	5,71 b	0,44 c	3,75 c	2,66 b	5,00 b
HPAB25	Rizosféricos	5,68 a	5,04 c	0,43 c	3,27 c	3,39 a	4,96 b
HPAB26	Rizosféricos	5,46 a	5,06 c	0,56 b	3,76 c	3,46 a	3,78 c
HPAB27	Rizosféricos	6,01 a	4,83 c	0,63 b	4,02 c	2,45 b	3,65 c
HPAB28	Rizosféricos	6,18 a	5,34 c	0,52 c	3,72 c	2,32 b	3,72 c
HPAB29	Rizosféricos	6,13 a	4,92 c	0,59 b	4,12 c	3,57 a	4,75 b
HPAB30	Rizosféricos	5,92 a	4,95 c	0,59 b	3,82 c	3,19 a	4,60 b
HPAB31	Rizosféricos	5,90 a	5,33 c	0,51 c	4,67 b	3,09 a	4,32 c
HPAB32	Rizosféricos	6,76 a	4,65 c	0,53 c	4,64 b	3,95 a	4,25 a
HPAB33	Rizosféricos	6,04 a	5,62 c	0,66 b	3,73 c	3,41 a	4,60 b
HPAB34	Rizosféricos	5,88 a	4,73 a	0,42 c	3,38 c	3,54 a	4,25 c
HPAB35	Rizosféricos	5,84 a	6,09 b	0,86 a	3,29 c	3,39 a	3,79 c
HPAB36	Rizosféricos	4,96 a	6,25 b	0,66 b	3,46 c	3,91 a	4,56 b
Controle		0,79 b	6,83 a	0,13 d	6,52 a	0,48 c	6,63 a

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

---- = sem crescimento

Os fungos isolados do Cerrado mostraram baixa solubilização de fosfatos de CaHPO₄, AlPO₄ ou FePO₄, comparados ao controle (Tabela 3). Os melhores resultados foram verificadoss para os isolados HCEF13 e HCEF14 (1,798 e 1,959 mg L⁻¹ CaHPO₄), HCEF13 e HCEF14 (0,520 e 0,574 mg L⁻¹ AlPO₄) e HCEF11, HCEF5 HCEF12 e HCEF13 (0,729, 0,775, 0,790 e 0,862 mg L⁻¹ FePO₄).

Tabela 3. Solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO₄), de alumínio (AlPO₄) e de ferro (FePO₄) por fungos obtidos de raízes e rizosfera de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado.

Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	CaHPO ₄		AlPO ₄		FePO ₄	
		P solúvel (mg L ⁻¹)	pH	P solúvel (mg L ⁻¹)	pH	P solúvel (mg L ⁻¹)	pH
HCEF1	Endofíticos	1,44 b	5,49 c	0,33 b	4,80 c	0,44 c	4,20 c
HCEF2	Endofíticos	1,25 b	6,44 b	0,16 c	4,61 c	0,39 c	4,14 d
HCEF3	Endofíticos	1,31 b	6,35 b	0,18 c	4,45 d	0,48 b	3,99 d
HCEF4	Rizosféricos	1,19 b	5,21 d	0,05 c	4,45 d	0,35 c	3,99 d
HCEF5	Rizosféricos	1,23 b	5,67 c	0,21 c	4,34 d	0,77 a	4,13 d
HCEF6	Rizosféricos	1,22 b	5,75 c	0,12 c	5,48 b	0,39 c	4,60 a
HCEF7	Rizosféricos	1,22 b	4,43 e	0,15 c	4,53 c	0,55 b	4,59 a
HCEF8	Rizosféricos	0,43 c	4,40 e	0,13 c	4,37 d	0,57 b	4,61 a
HCEF9	Rizosféricos	0,53 c	5,82 b	0,19 c	4,15 d	0,53 b	4,08 d
HCEF10	Rizosféricos	1,18 b	5,40 d	0,29 b	4,30 d	0,62 b	4,26 c
HCEF11	Rizosféricos	1,11 b	4,76 e	0,22 c	4,75 c	0,73 a	4,39 b
HCEF12	Rizosféricos	1,08 b	5,98 b	0,31 b	5,22 b	0,79 a	4,46 b
HCEF13	Rizosféricos	1,80 a	4,84 e	0,52 a	4,74 c	0,86 a	4,32 c
HCEF14	Rizosféricos	1,96 a	5,82 e	0,57 a	5,38 b	0,58 b	4,72 a
HCEF15	Rizosféricos	0,65 c	5,83 c	0,06 c	5,62 b	0,61 b	4,65 a
Controle		0,36 c	6,83 a	0,13 d	6,52 a	0,35 c	6,63 a

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

Em relação aos isolados fúngicos do Pantanal, Tabela 4, o fosfato de cálcio foi a fonte mais solubilizada, destacando-se HPAF2 com maior índice de solubilização (1,057 mg L⁻¹). Nas solubilizações de AlPO₄ e FePO₄, destacaram-se os isolados HPAF3 e HPAF2 (0,392 e 0,846 mg L⁻¹, respectivamente). Independentemente do local de amostragem, a atividade de solubilização de P pelos isolados fúngicos também reduziu o pH do meio para todas as fontes testadas (Tabela 3 e 4).

Tabela 4. Solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO₄), de alumínio (AlPO₄) e de ferro (FePO₄) por fungos endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Pantanal, MS.

Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	CaHPO ₄		AlPO ₄		FePO ₄	
		P solúvel (mg L ⁻¹)	pH	P solúvel (mg L ⁻¹)	pH	P solúvel (mg L ⁻¹)	pH
HPAF1	Endofíticos	0,77 b	5,19 d	0,08 d	4,54 c	0,39 d	4,17 c
HPAF2	Endofíticos	1,06 a	5,19 d	0,20 b	4,77 b	0,85 a	4,04 c
HPAF3	Endofíticos	0,81 c	4,92 d	0,39 a	4,21 c	0,37 d	4,03 c
HPAF4	Endofíticos	0,73 d	5,48 c	0,21 b	4,34 c	0,63 b	3,99 c
HPAF5	Endofíticos	0,88 d	6,06 b	0,14 c	4,96 b	0,62 b	4,42 b
HPAF6	Endofíticos	0,56 d	5,19 c	0,20 b	4,34 c	0,45 c	4,01 c
Controle		0,36 e	6,83 a	0,13 e	6,52 a	0,35 d	6,63 a

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

5.3.2. - Capacidade de síntese de ácido indol acético (AIA)

Todos os isolados obtidos nesse estudo apresentaram resultados positivos para produção de AIA, fato evidenciado pela observação da mudança da cor do meio de cultivo para amarelo avermelhado após adição do reagente de Salkowsky. Entre os isolados do Cerrado, os melhores desempenhos foram observados para os endofíticos HCEB10, HCEB14, HCEB6 e HCEB5 e HCEB8 (13,95, 10,30, 9,42 e 9,36 e 9,26 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 5).

No presente estudo, o fungo HCEF14 teve a maior taxa de produção de AIA (111,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$), seguido pelo isolado HCEF15 (81,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 5).

Tabela 5. Produção de ácido indol-acético (AIA) *in vitro* por bactérias e fungos endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado.

Bactérias			Fungos		
Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
HCEB1	Endofíticos	7,63 a	HCEF1	Endofíticos	60,54 c
HCEB2	Endofíticos	8,73 a	HCEF2	Endofíticos	42,99 d
HCEB3	Endofíticos	7,09 a	HCEF3	Endofíticos	43,99 d
HCEB4	Endofíticos	6,37 a	HCEF4	Rizosféricos	42,91 d
HCEB5	Endofíticos	9,36 a	HCEF5	Rizosféricos	41,18 d
HCEB6	Endofíticos	9,42 a	HCEF6	Rizosféricos	36,76 e
HCEB7	Endofíticos	8,95 a	HCEF7	Rizosféricos	58,61 c
HCEB8	Endofíticos	9,26 a	HCEF8	Rizosféricos	24,91 e
HCEB9	Endofíticos	4,47 b	HCEF9	Rizosféricos	26,84 e
HCEB10	Rizosféricos	13,95 a	HCEF10	Rizosféricos	32,99 e
HCEB11	Rizosféricos	8,79 a	HCEF11	Rizosféricos	20,46 e
HCEB12	Rizosféricos	5,68 a	HCEF12	Rizosféricos	29,85 e
HCEB13	Rizosféricos	7,66 a	HCEF13	Rizosféricos	39,41 d
HCEB14	Rizosféricos	10,30 a	HCEF14	Rizosféricos	111,38 a
HCEB15	Rizosféricos	3,90 b	HCEF15	Rizosféricos	81,50 b
HCEB16	Rizosféricos	7,44 a	Controle		ND
HCEB17	Rizosféricos	0,32 b	-----	-----	-----
HCEB18	Rizosféricos	0,33 b	-----	-----	-----
HCEB19	Rizosféricos	1,81 b	-----	-----	-----
HCEB20	Rizosféricos	0,24 b	-----	-----	-----
Controle		ND	-----	-----	-----

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

ND = não detectado.

---- = sem crescimento

Em relação às bactérias isoladas do Pantanal, o destaque foi para HPAB3 (19,36 $\mu\text{g mL}^{-1}$), HPAB10 (18,82 $\mu\text{g mL}^{-1}$), HPAB12 (20,52 $\mu\text{g mL}^{-1}$), HPAB13 (16,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$), HPAB14 (17,34 $\mu\text{g mL}^{-1}$), HPAB26 (20,65 $\mu\text{g mL}^{-1}$), HPAB27 (15,58 $\mu\text{g mL}^{-1}$), HPAB28 (15,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e HPAB29 (17,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 6). Dos fungos analisados, destaca-se a eficiência do endofítico HCEF6 (85,12 $\mu\text{g mL}^{-1}$), seguido de HPAF4 (64,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 6).

Tabela 6. Produção de ácido indol-acético (AIA) in vitro por bactérias e fungos endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Pantanal, MS.

Bactérias			Fungos		
Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
HPAB1	Endofíticos	10,46 b	HPAF1	Endofíticos	42,06 c
HPAB2	Endofíticos	9,48 b	HPAF2	Endofíticos	33,55 d
HPAB3	Endofíticos	19,36 a	HPAF3	Endofíticos	48,29 c
HPAB4	Endofíticos	8,57 b	HPAF4	Endofíticos	64,63 b
HPAB5	Endofíticos	7,50 b	HPAF5	Endofíticos	48,69 c
HPAB6	Endofíticos	8,85 b	HPAF6	Endofíticos	85,12 a
HPAB7	Endofíticos	12,60 b	Controle		ND
HPAB8	Endofíticos	13,29 b	-----	-----	-----
HPAB9	Endofíticos	8,04 b	-----	-----	-----
HPAB10	Endofíticos	18,82 a	-----	-----	-----
HPAB11	Endofíticos	13,98 b	-----	-----	-----
HPAB12	Rizosféricos	20,52 a	-----	-----	-----
HPAB13	Rizosféricos	16,12 a	-----	-----	-----
HPAB14	Rizosféricos	17,34 a	-----	-----	-----
HPAB15	Rizosféricos	12,12 b	-----	-----	-----
HPAB16	Rizosféricos	13,51 b	-----	-----	-----
HPAB17	Rizosféricos	11,65 b	-----	-----	-----
HPAB18	Rizosféricos	12,69 b	-----	-----	-----
HPAB19	Rizosféricos	13,44 b	-----	-----	-----
HPAB20	Rizosféricos	12,63 b	-----	-----	-----
HPAB21	Rizosféricos	13,92 b	-----	-----	-----
HPAB22	Rizosféricos	12,09 b	-----	-----	-----
HPAB23	Rizosféricos	12,19 b	-----	-----	-----
HPAB24	Rizosféricos	8,98 b	-----	-----	-----
HPAB25	Rizosféricos	13,00 b	-----	-----	-----
HPAB26	Rizosféricos	20,65 a	-----	-----	-----
HPAB27	Rizosféricos	15,58 a	-----	-----	-----
HPAB28	Rizosféricos	15,14 a	-----	-----	-----
HPAB29	Rizosféricos	17,50 a	-----	-----	-----
HPAB30	Rizosféricos	12,50 b	-----	-----	-----
HPAB31	Rizosféricos	14,20 b	-----	-----	-----
HPAB32	Rizosféricos	12,03 b	-----	-----	-----
HPAB33	Rizosféricos	10,49 b	-----	-----	-----
HPAB34	Rizosféricos	10,22 b	-----	-----	-----
HPAB35	Rizosféricos	13,10 b	-----	-----	-----
HPAB36	Rizosféricos	7,91 b	-----	-----	-----
Controle		ND	-----	-----	-----

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

ND = não detectado.

---- = sem crescimento

5.3.3. - Capacidade de síntese de nitrogênio

Todos os isolados testados mostraram ineficiência para fixação de nitrogênio quando comparados ao controle contendo *Azospirillum brasilense*. Não foi observado crescimento bacteriano, ou seja, não se observou formação de biofilme na subsuperfície do meio de cultura, conforme apresentado na Figura 1(B).

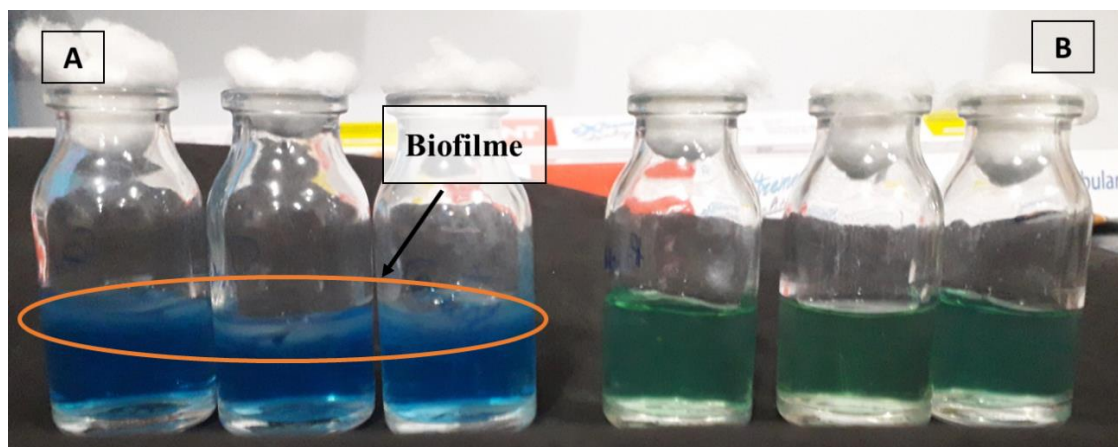


Figura 1: A: Teste para avaliação da capacidade de fixação de nitrogênio por micro-organismos simbióticos isolados de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado e Pantanal. Tratamento controle com o *Azospirillum brasilense*, em que é possível ver o biofilme e a mudança da cor do meio; B: tratamento com a bactéria isolada, em que não houve presença da película nem mudança de cor do meio.

5.3.4. - Avaliação da antibiose a *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*.

Em geral, os fungos possibilitaram melhores resultados de antibiose em comparação com as bactérias. Para os isolados do Pantanal, das 21 bactérias testadas, apenas uma conseguiu inibir o crescimento de *Fusarium* sp. HPAEB7 (32,73%) (Figura 3a). Para o fitopatógeno *Rhizoctonia* sp., não foi observada taxa de inibição entre os isolados testados, enquanto para *Sclerotinia sclerotiorum*, o isolado para o qual se observou maior inibição relativa foi HPAB27 (52,22 %) (Figura 3b) (Tabela 9).

Tabela 7. Avaliação de bactérias (Pantanal) endofíticas e rizosféricas de *Hymenaea courbaril*, em antibiose a *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*.

Isolados	<i>Fusarium</i> sp.		<i>Rhizoctonia</i> sp.		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			
	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %	Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %	Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %
HPAEB6	Endofíticos	20,86 b	HPAB3	Endofíticos	1,82 a	HPAB3	Endofíticos	5,56 b
HPAEB7	Endofíticos	32,73 a	HPAB8	Endofíticos	3,64 a	HPAB11	Rizosféricos	5,56 b
HPAEB8	Endofíticos	7,55 c	HPAB9	Endofíticos	3,64 a	HPAB27	Rizosféricos	52,22 a
HPAEB9	Endofíticos	14,75 b	HPAB12	Rizosféricos	0,00 a			
HPAEB10	Endofíticos	17,27 b	HPAB13	Rizosféricos	2,91 a			
HPAEB11	Endofíticos	21,94 b	HPAB14	Rizosféricos	1,82 a			
HPARB12	Rizosféricos	20,86 b	HPAB15	Rizosféricos	3,64 a			
HPARB14	Rizosféricos	13,67 c	HPAB20	Rizosféricos	5,45 a			
HPARB15	Rizosféricos	2,88 c	HPAB21	Rizosféricos	3,64 a			
HPARB16	Rizosféricos	8,99 c	HPAB22	Rizosféricos	1,82 a			
HPARB18	Rizosféricos	6,47 c	HPAB26	Rizosféricos	3,64 a			
HPARB19	Rizosféricos	16,55 b	HPAB30	Rizosféricos	0,00 a			
HPARB20	Rizosféricos	8,63 c	HPAB31	Rizosféricos	3,64 a			
HPARB21	Rizosféricos	16,91 b						
HPARB22	Rizosféricos	10,79 c						
HPARB25	Rizosféricos	8,63 c						

HPARB26 Rizosféricos	10,07 c
HPARB27 Rizosféricos	11,51 c
HPARB31 Rizosféricos	17,27 b
HPARB32 Rizosféricos	16,19 b

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

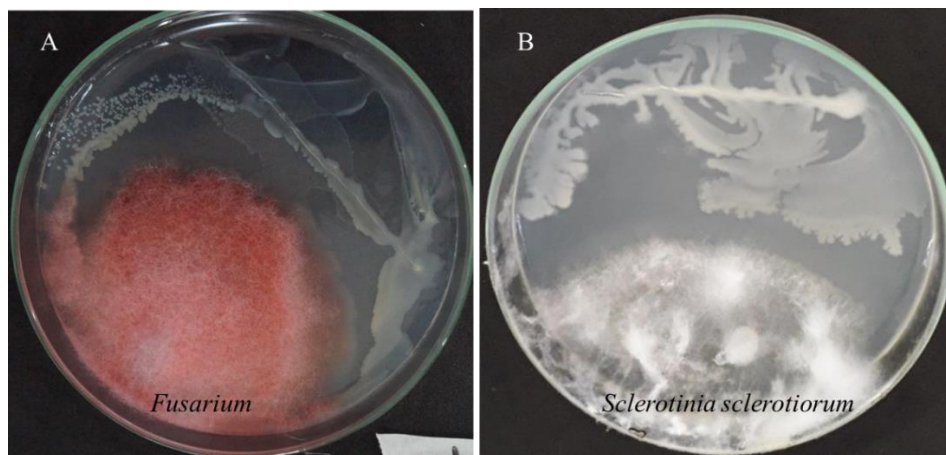


Figura 2: Teste para avaliação da capacidade de inibitória de bactérias simbióticas isoladas de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Pantanal. A: Antagonismo da bactéria HPAEB7 a *Fusarium* sp. B: Antagonismo da bactéria HPAR27 a *Sclerotinia sclerotiorum*.

Os fungos isolados apresentaram crescimento mais lento em relação aos patógenos testados (Tabela 8). Em relação à inibição a *Fusarium* sp., todos os fungos possibilitaram taxa de inibição e não diferiram entre si (Figura 3a). Os isolados HPAF4 (32,26 %) e HPAF5 (36,56 %) mostraram maior taxa de inibição a *Rhizoctonia* sp., já para o *S. sclerotiorum*, os isolados que proporcionaram as maiores taxas de inibição relativa foram HPAF1 (31,11%) e HPAF3 (31,11 %), HPAF2 (28,15 %) e HPAF4 (46,30 %) (Figura 3b).

Tabela 8. Avaliação dos fungos (Pantanal) endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril* em antibiose a *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*.

Isolados	<i>Fusarium</i> sp.		<i>Rhizoctonia</i> sp.		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			
	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %	Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %	Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %
HPAF1	Endofíticos	46,10 a	HPAF1	Endofíticos	2,87 b	HPAF1	Endofíticos	31,11 a
HPAF2	Endofíticos	45,72 a	HPAF2	Endofíticos	1,08 b	HPAF2	Endofíticos	28,15 a
HPAF3	Endofíticos	43,49 a	HPAF3	Endofíticos	10,04 b	HPAF3	Endofíticos	31,85 a
HPAF4	Endofíticos	45,72 a	HPAF4	Endofíticos	32,26 a	HPAF4	Endofíticos	46,30 a
HPAF5	Endofíticos	47,58 a	HPAF5	Endofíticos	36,56 a	HPAF5	Endofíticos	3,33 b
HPAF6	Endofíticos	40,89 a	HPAF6	Endofíticos	2,87 b	HPAF6	Endofíticos	10,00 b

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

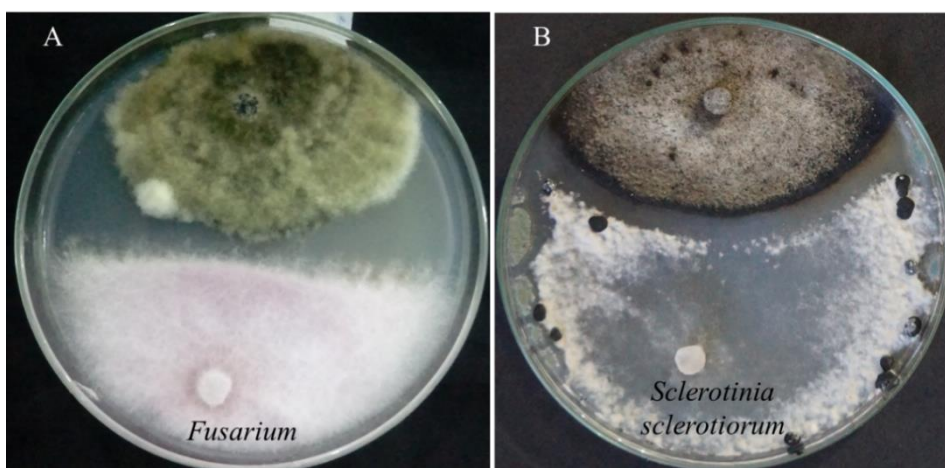


Figura 3: Teste para avaliação da capacidade de inibitória de fungos simbióticos isolados de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Pantanal. A: Antagonismo do fungo HPAF5 a *Fusarium* sp. B: Antagonismo do fungo HPAF4 a *Sclerotinia sclerotiorum*.

Considerando as bactérias isoladas de *H. courbaril* do Cerrado, não se verificou diferença estatística entre esses isolados contra o fitopatógeno *Fusarium* sp., sendo que todas as bactérias apresentaram efeitos inibitórios, sendo que a bactéria rizosférica HCEB19 inibiu até 19,78% do crescimento deste fitopatógeno. Contra *Rhizoctonia* sp., as bactérias não inibiram o crescimento desse fitopatógeno, enquanto para *S. sclerotiorum*, a bactéria HCEB4, Figura 5b, inibiu 51,48% do seu crescimento potencial (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação de bactérias (Cerrado) endofíticas e rizosféricas de *Hymenaea courbaril* em antibiose a *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium* sp.

Isolados	<i>Fusarium</i> sp.		<i>Rhizoctonia</i> sp.			<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>		
	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %	Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %	Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %
HCEB3	Endofíticos	6,47 a	HCEB1	Endofíticos	1,82 a	HCEB2	Endofíticos	1,85 c
HCEB4	Endofíticos	6,12 a	HCEB2	Endofíticos	0,00 a	HCEB3	Endofíticos	3,70 c
HCEB5	Endofíticos	12,23 a	HCEB4	Endofíticos	1,82 a	HCEB4	Endofíticos	51,48 a
HCEB6	Endofíticos	9,35 a	HCEB6	Endofíticos	1,45 a	HCEB7	Endofíticos	18,52 b
HCEB7	Endofíticos	12,95 a	HCEB11	Rizosféricos	1,82 a	HCEB19	Rizosféricos	20,74 b
HCEB10	Rizosféricos	19,06 a	HCEB13	Rizosféricos	3,64 a			
HCEB11	Rizosféricos	12,23 a						
HCEB12	Rizosféricos	2,88 a						
HCEB13	Rizosféricos	14,75 a						
HCEB19	Rizosféricos	19,78 a						

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

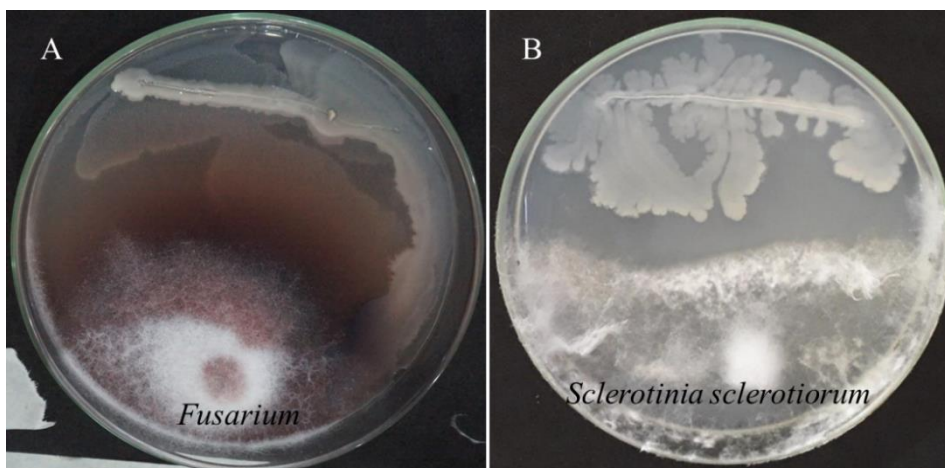


Figura 4: Teste para avaliação da capacidade de inibitória de bactérias simbióticas isoladas de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado. A: Antagonismo da bactéria HCEB7 a *Fusarium* sp. B. Antagonismo da bactéria HCEB4 contra *Sclerotinia sclerotiorum*.

Os fungos isolados do Cerrado apresentaram grande potencial de inibição aos fitopatógenos testados. Destacam-se os isolados HCEF1(45,71%), HCEF2 (48,21), HCEF3 (50%), HCEF10 (49,79%) (Figura 5a), HCEF15 (50%), que inibiram o crescimento de *Fusarium* sp. Os isolados HCEF2 (34,07%), HCEF3 (36,67%) (Figura 5b), HCEF5 (26,30%), HCEF6 (35,19%), HCEF7 (30%) e HCEF15 (31,48 %) mostraram maior potencial inibitório contra o fitopatógeno *Rhizoctonia* sp. Os isolados que apresentaram maior taxa de inibição a *S. sclerotiorum* foram HCEF3 (32,59%), HCEF5 (34,07%), HCEF7 (33,33 %) e HCEF8 (34,07%) (Figura 5c).

Tabela 10. Avaliação de fungos (Cerrado) endofíticos e rizosféricos de *Hymenaea courbaril* em antibiose a *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Sclerotinia sclerotiorum*.

Isolados	<i>Fusarium</i> sp.		<i>Rhizoctonia</i> sp.		<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>			
	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %	Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %	Isolados	Endofíticos/ Rizosféricos	IR %
HCEF1	Endofíticos	45,71 a	HCEF1	Endofíticos	3,70 c	HCEF1	Endofíticos	15,93 b
HCEF2	Endofíticos	40,36 a	HCEF2	Endofíticos	34,07 a	HCEF2	Endofíticos	3,70 c
HCEF3	Endofíticos	50,00 a	HCEF3	Endofíticos	36,67 a	HCEF3	Endofíticos	32,59 a
HCEF4	Rizosféricos	29,64 a	HCEF4	Rizosféricos	0,00 c	HCEF4	Rizosféricos	0,00 c
HCEF5	Rizosféricos	48,21 a	HCEF5	Rizosféricos	26,30 a	HCEF5	Rizosféricos	0,00 c
HCEF6	Rizosféricos	45,71 a	HCEF6	Rizosféricos	35,19 a	HCEF6	Rizosféricos	0,00 c
HCEF7	Rizosféricos	43,57 a	HCEF7	Rizosféricos	30,00 a	HCEF7	Rizosféricos	33,33 a
HCEF8	Rizosféricos	38,21 a	HCEF8	Rizosféricos	1,85 c	HCEF8	Rizosféricos	34,07 a
HCEF9	Rizosféricos	12,50 b	HCEF9	Rizosféricos	2,59 c	HCEF9	Rizosféricos	0,37 c
HCEF10	Rizosféricos	49,79 a	HCEF10	Rizosféricos	1,85 c	HCEF10	Rizosféricos	18,52 b
HCEF11	Rizosféricos	33,21 a	HCEF11	Rizosféricos	0,00 c	HCEF11	Rizosféricos	7,41 c
HCEF12	Rizosféricos	3,57 b	HCEF12	Rizosféricos	1,85 c	HCEF12	Rizosféricos	4,44 c
HCEF13	Rizosféricos	38,93 a	HCEF13	Rizosféricos	14,44 b	HCEF13	Rizosféricos	26,67 b
HCEF14	Rizosféricos	-----	HCEF14	Rizosféricos	3,70 c	HCEF14	Rizosféricos	23,33 b
HCEF15	Rizosféricos	50,00 a	HCEF15	Rizosféricos	31,48 a	HCEF15	Rizosféricos	24,44 b

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

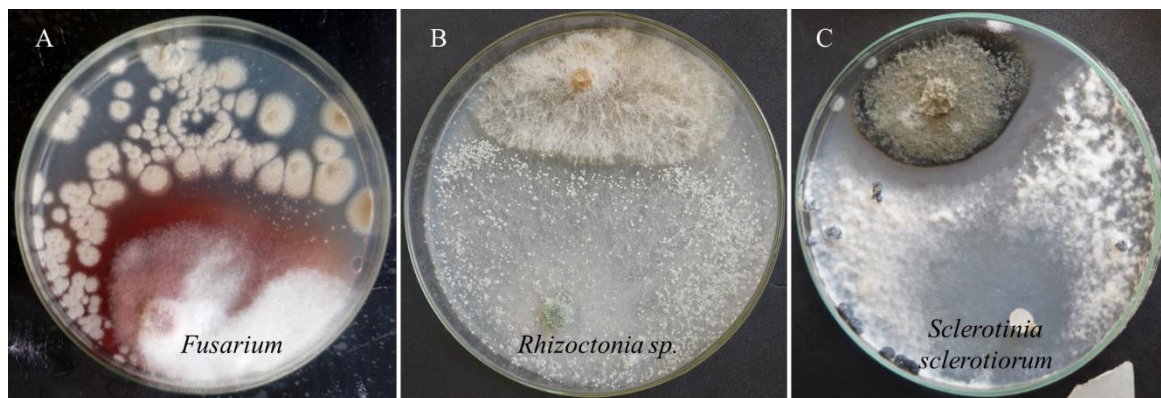


Figura 5: Teste para avaliação da capacidade de inibitória de bactérias simbióticas isoladas de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Cerrado. A: Antagonismo do fungo HCEF10 contra *Fusarium* sp. B: Antagonismo do fungo HCEF3 contra *Rhizoctonia* sp. C: Antagonismo do fungo HCEF8 contra *Sclerotinia sclerotiorum*.

5.3.5. - Produção da enzima ACC desaminase

Em relação à avaliação da atividade da enzima ACC desaminase, todos os isolados foram capazes de crescer em meio contendo ACC, indicando que sintetizam a enzima ACC desaminase, destacando-se os isolados HPAB33 do Pantanal e HCEB8 do Cerrado. Entretanto, não foi observada diferença no crescimento entre as bactérias testadas (Tabela 11).

Tabela 11: Produção de ACC desaminase *in vitro* por bactérias endofíticas e rizosféricas de *Hymenaea courbaril*, amostrada no Pantanal e Cerrado.

Isolados	Pantanal		Isolados	Cerrado	
	Endofíticos/ Rizosféricos	ACC desaminase		Endofíticos/ Rizosféricos	ACC desaminase
HPAB1	Endofíticos	0,92 a	HCEB1	Endofíticos	0,89 a
HPAB2	Endofíticos	0,86 a	HCEB2	Endofíticos	0,90 a
HPAB3	Endofíticos	0,94 a	HCEB3	Endofíticos	0,85 a
HPAB4	Endofíticos	0,83 a	HCEB4	Endofíticos	0,86 a
HPAB6	Endofíticos	0,87 a	HCEB5	Endofíticos	0,89 a
HPAB7	Endofíticos	0,97 a	HCEB6	Endofíticos	0,84 a
HPAB8	Endofíticos	0,92 a	HCEB7	Endofíticos	0,86 a
HPAB9	Endofíticos	0,87 a	HCEB8	Endofíticos	0,93 a
HPAB10	Endofíticos	0,90 a	HCEB9	Endofíticos	0,88 a
HPAB12	Rizosféricos	0,86 a	HCEB10	Rizosféricos	0,88 a
HPAB14	Rizosféricos	0,85 a	HCEB11	Rizosféricos	0,86 a
HPAB15	Rizosféricos	0,85 a	HCEB12	Rizosféricos	0,83 a
HPAB18	Rizosféricos	0,86 a	HCEB13	Rizosféricos	0,91 a
HPAB19	Rizosféricos	0,86 a	HCEB14	Rizosféricos	0,86 a
HPAB20	Rizosféricos	0,84 a	HCEB16	Rizosféricos	0,85 a
HPAB21	Rizosféricos	0,77 a	HCEB17	Rizosféricos	0,85 a
HPAB22	Rizosféricos	0,89 a	HCEB18	Rizosféricos	0,84 a
HPAB23	Rizosféricos	0,88 a	HCEB19	Rizosféricos	0,86 a
HPAB24	Rizosféricos	0,79 a	-----	-----	-----
HPAB25	Rizosféricos	0,86 a	-----	-----	-----
HPAB26	Rizosféricos	0,87 a	-----	-----	-----
HPAB27	Rizosféricos	0,86 a	-----	-----	-----

HPAB28	Rizosféricos	0,75 a	-----	-----	-----
HPAB29	Rizosféricos	0,88 a	-----	-----	-----
HPAB30	Rizosféricos	0,86 a	-----	-----	-----
HPAB31	Rizosféricos	0,86 a	-----	-----	-----
HPAB32	Rizosféricos	0,81 a	-----	-----	-----
HPAB33	Rizosféricos	1,00 a	-----	-----	-----
HPAB35	Rizosféricos	0,97 a	-----	-----	-----
HPAB36	Rizosféricos	0,85 a	-----	-----	-----

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

---- = sem crescimento

5.4. DISCUSSÃO

5.4.1. Avaliação da capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, fosfato de ferro e fosfato de alumínio

O número de micro-organismos isolados nesta pesquisa foi inferior ao observado em outros trabalhos, como de Da Silva et al. (2018), que isolaram 166 bactérias e 46 fungos endofíticos e rizosféricos de *Butia purpurascens*. Já nas pesquisas de Etesami e Alikhani (2016), foram isoladas 120 bactérias rizosféricas e 80 bactérias endofíticas radiculares de arroz. Wang et al. (2019) isolaram 120 cepas bacterianas da rizosfera de pepino. A densidade e diversidade de micro-organismos varia de acordo com a espécie vegetal associada e as condições edafoclimáticas estudadas, fato este observado no presente estudo, em que o bioma Pantanal apresentou maior número de micro-organismo isolados, em comparação com o Cerrado, exceção seja feita, considerando os fungos que apresentaram maior número de isolados no Cerrado, possivelmente pela sua preferência por solos com pHs mais baixos (Rousk et al., 2009).

O P é o segundo macronutriente mais requerido pelas plantas. No entanto, a disponibilidade do P no solo, nas formas solúveis para as plantas, é limitada pela sua fixação como fosfatos insolúveis de CaHPO_4 , AlPO_4 ou FePO_4 (Sharma et al., 2013). A maioria dos solos tem grande proporção de P ligada a seus constituintes. E apesar de ser possível a complementação do P em solos que apresentam déficit via fertilização química, 75 a 90% do P proveniente da fertilização torna-se precipitado em complexos de cátions metálicos e se fixa no solo.

Deste modo, o isolamento de bactérias e fungos solubilizadores de CaHPO_4 , AlPO_4 ou FePO_4 , verificados neste estudo, aponta o potencial uso de micro-organismos endofíticos e rizosféricos isolados de *H. courbaril* nos biomas Cerrado e

Pantanal, como biofertilizantes, promovendo, assim, uma melhor utilização do P acumulado nos solos (Zhu et al., 2012), atuando na promoção do crescimento vegetal.

Vários micro-organismos, incluindo bactérias, fungos, actinomicetos e algas, exibem capacidade de solubilização e mineralização de P (Alori et al., 2017). Bactérias do solo que foram relatadas como solubilizadoras e mineralizadoras de P incluem linhagens de *Azotobacter* (Kumar et al., 2014), *Bacillus* (Jahan et al., 2013; David et al., 2014), *Burkholderia* (Zhao et al., 2014; Istina et al., 2015), *Enterobacter*, *Erwinia* (Chakraborty et al., 2009), *Kushneria* (Zhu et al., 2011), *Paenibacillus* (Fernández Bidondo et al., 2011), *Ralstonia*, *Rhizobium* (Tajini et al., 2012), *Rhodococcus*, *Serratia*, *Bradyrhizobium*, *Salmonella*, *Sinomonas* e *Thiobacillus* (David et al., 2014).

Da Silva et al. (2018), isolando micro-organismos solubilizadores de CaHPO_4 de *Butia purpurascens*, verificaram 33 isolados expressando este traço funcional. Entre as bactérias isoladas, observaram cepas de *Pantoea* sp. ($0,37 \text{ mg L}^{-1}$), *Yokenella regensburgei* ($0,35 \text{ mg L}^{-1}$) e *Pantoea cyripedii* ($0,35 \text{ mg L}^{-1}$) com valores inferiores aos observados no presente estudo. Zhao et al. (2014) verificaram que os índices de solubilização de CaHPO_4 pelos isolados variaram de 58 a $452 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Faria et al. (2016) isolaram 67 cepas de fungos em caju-de-árvore-do-cerrado e verificaram eficiência na solubilização para as espécies *Fusarium oxysporum*, *Bionectria ochroleuca*, *Periconia macrospinoso*, *Phomopsis lagerstroemiae*, *Penicillium kloeckeri*, *Eupenicillium shearii*, *Phomopsis asparagi*, *Penicillium pinophilum*, *Agaricomycetes* sp., *Diaporthe* sp., *Cladosporium cladosporioide* e *Paecilomyces lilacinus*. Os valores observados por estes autores quanto à solubilização de CaHPO_4 , AlPO_4 ou FePO_4 foram semelhantes aos verificados no presente estudo.

Redução do pH foi observada durante as avaliações das atividades de solubilização de P. Existem várias justificativas para este comportamento, entre elas, a produção de ácidos orgânicos, prótons, sideróforos, íons hidroxila e CO_2 (Rodríguez e Fraga, 1999; Sharma et al., 2013; Da Silva et al., 2018), que reduzem o pH para promover a liberação de P (Seshachala e Tallapragada, 2012).

A excreção desses ácidos orgânicos é acompanhada pela redução dos valores do pH, resultando na acidificação das células microbianas e do meio, assim, os íons P são liberados por substituição de H^+ por Ca^{2+} (Goldstein, 1994). Sharmam et al. (2013) verificaram que a assimilação do NH_4^+ nas células microbianas é acompanhada pela liberação de prótons, resultando na solubilização do P.

5.4.2. Síntese de AIA

A síntese de AIA das bactérias variou de 0,32 a 20,65 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e nos fungos variou de 20,46 a 111,38 ($\mu\text{g mL}^{-1}$) nos dois biomas, destacando a eficiência dos fungos para este traço funcional, em comparação com as bactérias. Estes resultados divergem dos obtidos por Da Silva et al. (2018), que verificaram em bactérias valores entre 108.8 e 106.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e em fungos, entre 0,46 e 12,49 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Etesami e Alikhani (2016) verificaram que isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos isolados do arroz produziram AIA variando de 5 a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A capacidade de sintetizar o AIA é considerada uma ferramenta eficaz para a seleção de micro-organismos benéficos, sugerindo que as bactérias produtoras de AIA têm efeito relevante no crescimento das plantas (Wahyudi et al., 2011). A inoculação com bactérias produtoras de AIA induz a proliferação de raízes laterais e de pelos radiculares. Fátima et al. (2009) também mostraram que as taxas de germinação, raízes e crescimento das plantas foram aumentadas pela inoculação de rizobactérias produtoras de AIA.

Susilowat et al. (2018) verificaram que os isolados têm diferentes capacidades para síntese de AIA e encontraram valores variando entre 43,8 mgL^{-1} e 7,63 mgL^{-1} de AIA. Os autores comentam que a diferença entre espécies e linhagens dentro da mesma geração, as condições ambientais, taxas de crescimento e disponibilidade de substratos como aminoácidos influenciam na síntese deste fitormônio, assim, como o pH (Spaepen et al. 2007).

O AIA é um importante fitormônio que controla o crescimento e muitos fatores fisiológicos importantes como aumento celular e diferenciação celular. A síntese de AIA por bactérias pode afetar a sensibilidade do tecido vegetal, estimulando seu crescimento, causando impacto positivo na produtividade vegetal (Susilowat et al., 2018), daí o potencial a ser explorado em micro-organismos endofíticos e rizosféricos com habilidades para promoção do crescimento vegetal, tal como os isolados neste trabalho.

5.4.3. Antibiose a fitopatógenos

Bactérias endofíticas e rizosféricas, além de promoverem o crescimento vegetal também, atuam como agentes de biocontrole, seja pela produção de antibióticos, enzimas líticas como β - (1,3) glucanase e quitinase, enzimas que causam a lise da

parede celular fúngica, seja pela competição e inibição de fitopatógenos (Ahmad et al., 2008). Assim, bactérias endofíticas podem reduzir as doenças bacterianas, fúngicas e virais (Berg e Hallmann, 2006).

Vinayarani e Prakash (2018), avaliando o efeito de rizobactérias e bactérias endofíticas isoladas de *Curcuma longa* L., verificaram que 5 isolados dos gêneros *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* e *Bacillus* inibiram 70% dos fitopatógenos *P. aphanidermatum* e *Rhizoctonia solani*. Estas bactérias endofíticas provocaram deformações no micélio, incluindo sua fragmentação nos dois patógenos. Verificaram também que uma cepa rizosférica de *B. cereus* inibiu 86 e 84% do crescimento de *P. aphanidermatum* e *Rhizoctonia* sp., respectivamente, seguida pela endofítica *P. aeruginosa*, que inibiu 85 e 82% do crescimento destes patógenos.

Etesami e Alikhani (2016), avaliando bactérias endofíticas radiculares e rizosféricas do arroz, verificaram que estes isolados inibiram o crescimento micelial de patógenos fúngicos como *Fusarium proliferum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium fujikuroi*, *Magnaporthe salvinii* e *Magnaporthe grisea* (*M. oryzae*). Wang et al. (2019), avaliando o efeito de *Paenibacillus jamilae* HS-26 contra patógenos fúngicos, verificaram que as rizobactérias de pepino inibiram completamente o crescimento de *B. sorokiniana* e *Rhizoctonia solani*, além de reduzir em 17,65% o crescimento de *F. oxysporum*. De modo similar aos metabólitos antifúngicos extracelulares, os compostos orgânicos voláteis produzidos pela cepa HS-26 diminuíram o crescimento micelial, ocasionando inibição de *F. oxysporum*, *B. sorokiniana* e *Rhizoctonia* sp. em, aproximadamente, 46,30; 63,86 e 44%, respectivamente.

Vitorino et al. (2019) verificaram que as bactérias BA48R e BA88R, ambas rizosféricas isoladas de *Butia archeri*, inibiram o crescimento de *S. sclerotiorum* em plantas de *Glycine max*, demonstrando que plantas nativas de biomas brasileiros como o Cerrado podem constituir uma fonte importante para a prospecção de micro-organismos aplicados ao controle biológico de pragas.

5.4.4. Síntese de ACC desaminase

A capacidade de produção de ACC desaminase também foi avaliada no trabalho de Simarmata et al. (2019), que verificaram valores de 6,45 e 10,33 ppm.h⁻¹ em duas cepas de *P. agglomerans* e *R. terrigena*. Etesami e Alikhani (2016)

encontraram 5 isolados endofíticos e 8 rizosféricos de arroz, que produziram ACC desaminase intracelular.

Bactérias produtoras de ACC desaminase são de suma importância para a indução de tolerância à seca em plantas, pois grandes quantidades de etileno são produzidas pelas plantas quando submetidas a situações de estresse (Glick et al., 2005), como, por exemplo, altas temperaturas, escassez de água, luz ultravioleta, injúrias e produtos químicos (Glick et al., 2005), o que pode prejudicar seu desenvolvimento, afetando diretamente o sistema radicular. Deste modo, as bactérias que sintetizam ACC desaminase, quando associadas à planta, podem reduzir consideravelmente os níveis de etileno (Glick, 2005).

Assim como o AIA, a ACC desaminase tem ação direta na promoção do crescimento vegetal. Esta enzima cliva o ACC, que é precursor direto do etileno, reduzindo sua biossíntese. O etileno inibe o crescimento de raízes e brotos, por consequência, níveis mais baixos desse hormônio levam à promoção do crescimento da planta (Abbamondi et al., 2015).

Este é o primeiro trabalho a analisar os traços funcionais de micro-organismos endofíticos radiculares e rizosféricos de uma espécie nativa, a *Hymenaea coubaril* L. Esse estudo pode auxiliar em pesquisas futuras para o desenvolvimento de processos e ou produtos no intuito de contribuir com a melhoria para a promoção de uma agricultura mais sustentável.

5.5. CONCLUSÃO

Todas as bactérias isoladas neste estudo foram capazes de solubilizar em diferentes proporções CaHPO_4 , AlPO_4 e FePO_4 . Entre os 15 fungos isolados de Cerrado, 12 solubilizam CaHPO_4 , 15 AlPO_4 e 11 FePO_4 . No Pantanal, dos 6 fungos isolados, 6 solubilizaram CaHPO_4 , 6 AlPO_4 e apenas 4 solubilizaram FePO_4 . Todos os isolados apresentaram resultados positivos para produção de AIA, com destaque para os fungos, que atingiram altos níveis de produção.

Em relação à antibiose, os fungos se mostraram mais eficientes que as bactérias, possibilitando diferentes proporções inibitórias contra *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.*, *Sclerotinia sclerotiorum*. A avaliação produção da enzima ACC desaminase mostrou que todos os isolados foram capazes de sintetizar ACC.

O conhecimento da diversidade funcional é importante não só para a compreensão da ecologia da comunidade de micro-organismos como também para a

inovação de aplicabilidade biotecnológica e de produtividade para uma agricultura mais sustentável.

5.6. REFERÊNCIAS

ABBAMONDI, G.; TOMMONARO, G.; WEYENS, N. et al. Efeitos promotores de crescimento de plantas de bactérias rizosféricas e endofíticas associadas a diferentes cultivares de tomate e novos híbridos de tomate. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 3, 1, 2016.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M.S. Triagem de bactérias rizosféricas de vida livre para suas múltiplas atividades promotoras de crescimento de plantas. **Microbiol Res.** 2008; 163: 173–181, 2006.

ALORI, E.T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O.O. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. **Frontiers in Microbiology**. 8: 1664-302. 2017.

ASHRAF, MA; RASOOL M; MIRZA MS. Nitrogenfixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Advances in Biological Regulation**, 5(6):348-355, 2011.

BADALYAN, S.M.; INNOCENTI G.; GARIBYAN N.G. Antagonistic activity of xylophilic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. **Phytopathologia Mediterrânea**. 41: 200-225. 2002.

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.; HALLMANN, J. Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes. **In: Microbial root endophytes** (1 ed., pp. 53-70). Heidelberg, New York: Springer, 2006.

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.

CHAKRABORTY, U.; CHAKRABORTY, B.N.; BASNET, M.; CHAKRABORTY, A.P. Evaluation of *Ochrobactrum anthropi* TRS-2 and its talc based formulation for enhancement of growth of tea plants and management of brown root rot disease. **J. Appl. Microbiol.** v. 107, 625–634, 2009.

COMPANT, S., CLÉMENT, C., AND SESSITSCH, A. Plant growth promoting bacteria in the rhizoand endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry** 42, 669–678, 2010.

DAVID, P.; RAJ, R.S.; LINDA, R.; RHEMA, S.B. Molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria (PSB) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from pristine soils. **Int. J. Innov. Sci. Eng. Technol.** 1, 317–324, 2014.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H.A. Evaluation of Gram-positive rhizosphere and endophytic bacteria for biological control of fungal rice (*Oryza sativa* L.) pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147: p. 7-14, 2016.

FARIA, P.S.A.; SENÁBIO, J.A.; SOARES, M.A.; SILVA, F.G.; CUNHA, A.P.A.; SOUCHIE, E.L. Assessment of functional traits in the assemblage of endophytic fungi of *Anacardium othonianum rizzini*. **Pakistan Journal of Botany** 48(3):124, 2016.

FATIMA, Z., SALEEMI, M., ZIA, M., SULTAN, T., ASLAM, M., RIAZ-UR-REHMAN, CHAUDHARY, M.F. Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. **Afr. J. Biotechnol.** 8, 219-225, 2009.

FERNÁNDEZ BIDONDO, L.; SILVANI, V.; COLOMBO, R.; PÉRGOLA, M.; BOMPADRE, J.; GODEAS, A. Pre-symbiotic and symbiotic interactions between *Glomus intraradices* and two *Paenibacillus* species isolated from AM propagules. *In vitro* and *in vivo* assays with soybean (AG043RG) as plant host. **Soil Biol. Biochem.** 43, 1866–1872, 2011.

FERREIRA, D.F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v.6, p.36-41, 2008.

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.

GLICK, B.R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 251, p. 1-7, 2005.

GOLDSTEIN, A.H. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by Gram-negative bacteria. **In: Torriani-Gorini A, Yagil E & Silver S (Eds.) Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology.** Washington, ASM Press DC. p.197-203, 1994.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The hidden world within Plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Rev. 79, 293–320, 2015.

ISTINA, I.N.; WIDIASTUTI, H.; JOY, B.; ANTRALINA, M. Phosphate-solubilizing microbe from Saprists peat soil and their potency to enhance oil palm growth and P uptake. **Proc. Food Sci.** 3, 426–435, 2015.

JAHAN, M.; MAHALLATI, M.N.; AMIRI, M.B.; EHYAYI, H.R. Radiation absorption and use efficiency of sesame as affected by biofertilizers inoculation in a low input cropping system. **Ind. Crops Prod.** p. 43, 606–611, 2013.

KUMAR, S.; BAUDDH, K.; BARMAN, S.C.; SINGH, R.P. Amendments of microbial bio fertilizers and organic substances reduces requirement of urea and DAP with enhanced nutrient availability and productivity of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Ecol. Eng.** 71, 432–437, 2014.

KUSS AV, KUSS VV, LOVATO T, FLÔRES ML. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indol acético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42:1459-1465, 2007.

LUCON, C.M.M.; AKAMATSU, M.A.; HARAKAVA, R. Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 43, n. 6, p. 691-697, 2008.

PANDYA M.; RAJPUT M.; RAJKUMAR S. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiate*. **Microbiology**, 84, pp. 80-89. 2015.

PETRINI, O., E. Muller. Haupt und nebenfruchtformen europaischer pilze. **Mycologia Helvetica**, 1: 501-627, 1986.

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

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bactéria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 17, p. 319-339, 1999.

RODRIGUEZ H, GONZALEZ T, GOIRE I, BASHAN Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, 91:552–555, 2009.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas – Fundamentos**. Viçosa - MG: UFV, p. 296, 2007.

Rousk, J.; Brookes, P.C.; Bååth, E. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. **Microbial Ecology**, 2009.

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.

SESHACHALA, U.; TALLAPRAGADA, P. Phosphate solubilizers from the rhizosphere of *Piper nigrum* L. in Karnataka, India. **Chil. J. Agric. Res.** 72, 397–403, 2012.

SHARMA, S.B.; SAYYED, R.Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T.A. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, vol. 2, p. 587, 2013.

SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagonica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v.9, n.4, p.535-538, 2008.

SILVA, C.F.; VITORINO, L.C.; SOARES, M.A.; SOUCHIE, E.L. Multifunctional potential of endophytic and rhizospheric microbial isolates associated with *Butia purpurascens* roots for promoting plant growth. **Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 1, p. 1-18, 2018.

SIMARMATA, R.; SALAMAH, U.; NGADIMAN.; ROHMAN, S.; SIMANJUNTAK, P. Ecological and physiological characterization of ACC deaminase-producing bacteria isolated from specific sites in Yogyakarta, Indonesia. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 308 012046, 2019.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol Rev**, v.31, p.425-448, 2007.

SUSILOWATI, A.; PUSPITA, A.A.; YUNUS, A. Drought resistant of bacteria producing exopolysaccharide and IAA in rhizosphere of soybean plant (*Glycine max*) in Wonogiri Regency Central Java Indonesia. **In: IOP Conference Series Earth and Environmental Science**, 142(1):012058, 2018.

TAJINI, F.; TRABELSI, M.; DREVON, J.J. Combined inoculation with *Glomus intraradices* and *Rhizobium tropici* CIAT899 increases phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Saudi J. Biol. Sci.** 19, 157–163, 2012.

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

VINAYARANI, G.; PRAKASH, H.S. Growth Promoting Rhizospheric and Endophytic Bacteria from *Curcuma longa* L. as Biocontrol Agents against Rhizome Rot and Leaf Blight Diseases. **The plant pathology journal**, 34 (3), 218-235. doi: 10.5423 / PPJ.OA.11.2017.0225, 2018.

VITORINO, L. C.; PALHARINI, K. M. Z.; ROCHA, A. F.S.; PRATES, L.S.; GOULART, L.G.; SILVA, A.L.; BESSA, L.A. Application of bacteria symbiotic with *Butia archeri* (Arecaceae) to the biocontrol of the phytopathogenic fungi that deteriorate seeds of *Glycine max*. **Seed Science and Technology**, v. 47, p. 325-341, 2019.

WAHYUDI, A.T.; ASTUTI, R.P.; WIDYAWATI, A.; MERYANDINI, A.; NAWANGSIH, A.A. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere

of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**. 3, 34-40. 2011.

WANG, X.; LI, Q.; J.; ZHANG, J.; LIU, Z.; DU, J.; XU, R.; ZHOU, Y.; LIU, X. Isolation and Characterization of Antagonistic Bacteria *Paenibacillus jamilae* HS-26 and Their Effects on Plant Growth. **BioMed Research International**. P. 13, 2019.

ZHAO, K.; PENTTINEN, P.; ZHANG, X.; AO, X.; LIU, M.; YU, X.; ET AL. Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. **Microbiol. Res.** 169, 76–82, 2014.

ZHU, F.; QU, L.; HONG, X.; SUN, X. Isolation and characterization of a phosphate solubilizing halophilic bacterium *Kushmeria* sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of yellow sea of China. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2011:615032, 2011.

ZHU, H. J.; SUN, L.F.; ZHANG, Y.F.; ZHANG, X.L.; QIAO, J.J. Conversion of spent mushroom substrate to biofertilizer, using a stress-tolerant phosphate-solubilizing *Pichia farinose* FL7. **Bioresour. Technol.** 11 410–416, 2012.