

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO EM QUATRO ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS  
DO BRASIL.**

**Maria Teresa Oliverio Lemos**

**Bióloga**

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE  
CRESCIMENTO EM QUATRO ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS  
DO BRASIL.**

**Maria Teresa Oliverio Lemos**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agropecuária

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**Julho de 2009**

L557p Lemos, Maria Teresa Oliverio  
Prospecção de rizobactérias promotoras de crescimento em  
quatro espécies arbóreas nativas do Brasil./ Maria Teresa Oliverio  
Lemos. -- Jaboticabal, 2009  
x, 59 f. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009  
Orientadora: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos  
Banca examinadora: Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva e  
Miguel Luiz Menezes Freitas  
Bibliografia

1. essências nativas. 2. crescimento radicular. 3. caracterização  
molecular I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e  
Veterinárias.

CDU 631.461

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM QUATRO ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS DO BRASIL.

**AUTORA:** MARIA TERESA OLIVERIO LEMOS

**ORIENTADORA:** Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA pela Comissão Examinadora:

Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

Dra. CRISTINA LACERDA SOARES PETRAROLHA SILVA

Dr. MIGUEL LUIZ MENEZES FREITAS

Data da realização: 01 de julho de 2009.

Presidente da Comissão Examinadora

Dra. ELIANA GERTRUDES DE MACEDO LEMOS

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**MARIA TERESA OLIVERIO LEMOS** - nascida em 14 de abril de 1976, no município de Franca, Estado de São Paulo, é Bióloga formada pela Universidade Federal de Uberlândia, em dezembro de 1999. Na graduação realizou a iniciação científica com bolsa de estudo da FAPEMIG. Em março de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Microbiologia Agropecuária na UNESP - FCAV, em Jaboticabal - SP, onde defendeu sua dissertação de mestrado em julho de 2009. Durante os estudos de pós-graduação foi bolsista CAPES.

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

**(Cora Coralina)**

Aos meus pais, **Cida e Marco Antônio**, pelo amor incondicional que recebo em todos os momentos da vida, pelo apoio, dedicação...

A meus irmãos, **Marco e Francisco**, pela ajuda e incentivo

**OFEREÇO**

À minha sobrinha, **Gabriela** e meus **amigos de sempre...**

**DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho e, em especial aos seguintes:

À FCAV - UNESP e professores dos cursos de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária e Produção Vegetal pelos ensinamentos ministrados.

A Professora Dr<sup>a</sup>. Eliana G. de Macedo Lemos pela orientação, incentivo, confiança e oportunidade.

Ao Dr. João Carlos Campanharo, pelos ensinamentos no laboratório, atenção, ajuda e amizade.

A Professora Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Carareto Alves e Professor Dr. Rinaldo César de Paula pela amizade e pelas sugestões no exame de qualificação.

Aos membros da comissão examinadora Dr<sup>a</sup>. Cristina Lacerda Soares Petrarolha Silva e Dr. Miguel Luiz Menezes Freitas, pelas correções sugeridas, as quais contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho e também um agradecimento especial ao Dr. Miguel pela disponibilidade em conseguir as mudas usadas neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas, pelo alegre convívio, ajuda e amizade em especial a Érico, Renato, Rosinha e Tehuni que muito me ensinaram sobre a rotina laboratorial.

Ao Dr. Luciano Takeshi Kishi pelos ensinamentos, imensa ajuda nas análises filogenéticas e amizade.

Aos funcionários do departamento de Tecnologia;

Aos funcionários da seção de Pós-graduação pelo esclarecimento e condução nas tarefas de atendimento às normas regulamentares;

A CAPES pela bolsa de estudos concedida durante o mestrado.

Aos **amigos** que presentes ou ausentes, próximos ou distantes, recentes ou velhos que contribuíram para a finalização desta etapa de minha vida, muitíssimo obrigada pelo apoio.

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Espécies Arbóreas Nativas utilizadas no estudo.....	3
2.2 Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs).....	4
2.3 Aplicação da biologia molecular no estudo da diversidade de promotores de crescimento vegetal.....	6
2.4 Bactérias produtoras de fitormônios.....	9
2.5 Bactérias solubilizadoras de fosfato.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Localização dos experimentos.....	12
3.2 Obtenção dos isolados.....	12
3.3 Caracterização de novos isolados.....	13
3.3.1 Extração e purificação do DNA genômico (SAMBROOK et al.,1989).....	13
3.3.2 Quantificação do DNA genômico.....	14
3.3.3 Amplificação do DNA por oligonucleotídeo iniciadores correspondente ao gene 16S rRNA.....	15
3.3.4 Amplificação do DNA por oligonucleotídeo iniciadores correspondente a sequência repetitiva BOX-A 1R.....	15
3.3.5 Eletroforese em Gel de Agarose contendo Brometo de Etídio e documentação.....	16
3.3.6 Reação da PCR para sequenciamento do fragmento gênico 16S rDNA.....	16
3.3.7 Sequenciamento dos produtos da PCR 16S rDNA.....	17
3.3.8 Análises Individuais e Combinadas dos Produtos da PCR.....	17

3.3.9 Análises individuais e combinadas dos produtos de PCR da sequência repetitiva BOX-A 1R.....	18
3.4 Determinação colorimétrica do Ácido Indolacético (AIA).....	19
3.5 Teste de solubilização de fosfato.....	20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1 Isolados.....	21
4.2 Identificação dos isolados pela técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA.....	22
4.3 Avaliação da amplificação por PCR utilizando o oligonucleotídeo iniciador BOX-A 1R.....	27
4.4 Filogenia dos isolados baseado no marcador 16S rDNA e BOX-A 1R.....	28
4.5 Determinação colorimétrica do Ácido Indolacético (AIA).....	38
4.6 Seleção de isolados solubilizadores de fosfato.....	41
5. CONCLUSÕES.....	44
6. REFERÊNCIAS.....	45
7. APÊNDICE.....	58

## ABREVIATURAS

BOD - Demanda biológica de oxigênio (Biologic Oxigen Demand)

DNA - Ácido desoxirribonucléico

RNA - Ácido ribonucléico

dNTP - “2'-deoxynucleotides 5'-triphosphate”

ddNTP - “2', 3' dideoxynucleotides 5'-triphosphate”

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

$K_2HPO_4$  - Fosfato de potássio dibásico

$MgCl_2$  - Cloreto de magnésio

$MgSO_4$  - Sulfato de magnésio

$(NH_4)_2SO_4$  - Sulfato de amônio

NaCl - Cloreto de sódio

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

Tris - Hidroximetil aminometano

RNase - Ribonuclease A

BOX - Elemento BOX

REP - Sequência Palindrômica Extragênica Repetitiva (“Repetitive Extragenic Palindromic”).

ERIC - Sequência Intergênica Repetitiva Enterobacteriana (“Enterobacterial Repetitive Intergenic”).

rep-PCR - referente à técnica de PCR utilizando qualquer uma das três sequências repetitivas (REP, ERIC ou BOX)

SDS - “Sodium duodecyl sulfate”

AIA - Ácido Indolacético

DYGS - Dextrose Yeast Glucose Sucrose

EDTA - Ácido etileno diaminoacético

NBRIP - National Botanical Research Institute's Phosphate

RDP II - Ribosomal Database Project II

RNase - Ribonuclease A

## PROSPECÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO EM QUATRO ESPÉCIES ARBÓREAS NATIVAS DO BRASIL

**RESUMO** - A conservação da biodiversidade, implica em cultivar espécies arbóreas nativas que possam ser utilizadas em projetos de reflorestamento, recuperação de áreas degradadas e com o objetivo de obter produtos secundários importantes como madeira e produtos medicinais. O uso de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas, vem sendo muito estudado em culturas de importância econômica, devido a sua aplicabilidade em beneficiar o desenvolvimento destas. Neste trabalho foram escolhidas quatro espécies arbóreas nativas, leguminosas não nodulantes: *Pterogyne nitens* (Amendoim-bravo), *Albizia hasslerii* (Farinha-seca), *Copaifera langsdorffii* (Copaíba), e *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão). O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* as diferentes bactérias isoladas destas espécies florestais que possam ter efeito benéfico no crescimento e desenvolvimento inicial das plantas e caracterizá-las pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e perfil eletroforético do gene BOX-A 1R. As bactérias foram isoladas da rizosfera e da raiz de mudas de cada espécie, em meio de cultura NFb. No total, 29 isolados foram cultivados em meio de cultura DYGS enriquecido com triptofano. A estimativa colorimétrica do Ácido Indolacético (AIA) foi feita no espectrofotômetro, utilizando o sobrenadante da cultura de células e solução de Salkowski, com resultado positivo para o isolado Pn 6 *Sphingobium chlorophenolicum* com  $61,69 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os isolados também foram testados para a eficiência de solubilização de fosfato de cálcio que foi realizado e contabilizado até o 15º dia após a inoculação em placas de Petri com meio de cultura NBRIP sólido, onde 27 isolados apresentaram resultados positivos. A caracterização genética permitiu a diferenciação em gêneros e também em espécies de um mesmo gênero. Os isolados que deram resultados positivos para AIA e solubilização de fosfato não coincidiram entre si, o que sugere testes em viveiro, com combinações entre eles para avaliar a eficácia destes isolados como possíveis RPCPs.

**Palavras - chave:** essências nativas, PGPR, 16S rRNA, BOX-A 1R, ácido indolacético (AIA), crescimento radicular, caracterização molecular, solubilização de fosfato.

## PROSPECTION OF PLANT GROWTH PROMOTION RHIZOBACTERIA FROM FOUR NATIVE FOREST SPECIES IN BRAZIL

**Summary** - The biodiversity conservation implies cultivating native forest species that can be used in reforestation projects, recovery of degraded areas as well as getting others like wood and medicinal products. The plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) use is being studied in cultures of economic importance. In this work four native forest species, no nodulating leguminous had been chosen: *Pterogyne nitens*, *Albizia hasslerii*, *Copaifera langsdorffii*, and *Stryphnodendron adstringens*. The aim of this work was the *in vitro* evaluation of the different isolates from those forest species with beneficial effects in growth and initial development of the plants and characterizes them by 16S rRNA gene sequencing and BOX-A 1R. The bacteria had been isolated from the rhizosphere and from the roots (endophytic) of each species seedlings on NFb growth media. A total of 29 isolates had been cultivated in growth media DYGS enriched with tryptophan. The indolacetic acid (IAA) production was estimated by colorimetric test in the spectrophotometer, using the supernatant of the cells culture and Salkowski's reagent, with positive result for the isolated Pn 6 *Sphingobium chlorophenolicum* with 61,69  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Isolates had been also tested for the efficiency of P- solubilizing that was carried through and measured until the 15<sup>o</sup> day after the inoculation in Petri plates with solid growth media NBRIP, where 27 isolates had presented positive results. The genetic characterization allows us to differentiate by the genus and species from the same genus. The isolates that had positive results for IAA and P-solubilizing had not matched between itself, what suggests nursery tests with combinations between them to evaluate the isolate efficiency as a possible PGPRs.

**Key words:** native forest species, PGPR, 16S rRNA, BOX-A 1R, indolacetic acid (IAA), root growth, molecular characterization, phosphate solubilization.

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o setor florestal brasileiro vem apresentando uma crescente demanda por produtos e subprodutos florestais, proporcionando com isso, grande aumento das áreas reflorestadas com o plantio de espécies arbóreas exóticas de rápido crescimento. Vale ressaltar que os ecossistemas florestais produzem alimentos e madeira para diversas finalidades, além de apresentarem uma série de benefícios ambientais, como a redução nos riscos de erosão do solo, a produção de água de boa qualidade para as bacias hidrográficas e o abrigo de aproximadamente 2/3 da biodiversidade terrestre conhecida (SCARPINELLA, 2002).

A extração constante de espécies florestais nativas e o cultivo exploratório de algumas espécies comerciais em monocultura têm acarretado uma erosão na biodiversidade nos diversos ecossistemas espalhados pelo país. Essa degradação tende a piorar as condições ambientais das áreas ocupadas pelo homem e que delas necessita para a exploração agrícola, como as modificações climáticas, equilíbrio ecológico e diminuição das águas nos rios, entre outros.

Assim a conservação da biodiversidade implica entre outras medidas, em cultivar espécies florestais nativas que possam ser utilizadas em projetos de reflorestamento, recuperação de áreas degradadas e a obtenção de produtos secundários importantes, como por exemplo de uso medicinal, alimentação humana, construção civil, paisagismo, entre outros.

Quatro leguminosas arbóreas nativas do Brasil, duas da subfamília Caesalpinioideae e duas da subfamília Mimosoideae foram selecionadas para este estudo, sendo elas *Pterogyne nitens*, *Albizia hasslerii*, *Copaifera langsdorffii* e *Stryphnodendron adstringens*.

A utilização de plantas associadas a microrganismos para a revegetação de áreas degradadas tem sido confirmada como uma tecnologia ecológica e economicamente viável.

A inoculação de microrganismos benéficos em plantas tem sido empregada para melhorar seu desenvolvimento (CARAVACA et al., 2002) e aumentar a tolerância a

doenças (GREEN et al., 1999), além de favorecer seu estabelecimento frente a condições adversas, como salinidade (RAO & TARAFDAR, 1998; GIRI & MUKERJI, 2004) e estresse hídrico (RUIZ-LOZANO et al., 2001). Esses microrganismos podem beneficiar o desenvolvimento das mudas em viveiro, diminuindo o tempo de produção e maximizando a capacidade de estabelecimento dessas mudas em campo.

Algumas árvores se desenvolvem facilmente, porém outras apresentam dificuldade de crescimento e estabelecimento até que se tornem adultas, tais dificuldades podem ser minimizadas por inoculações com rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCPs) (ZAADY & PREVOLTSKY, 1995).

Neste contexto, este trabalho, teve como objetivo isolar e caracterizar rizobactérias das espécies arbóreas nativas (*Pterogyne nitens*, *Albizia hasslerii*, *Copaifera langsdorffii* e *Stryphnodendron adstringens*) e avaliar *in vitro* seus efeitos como possíveis promotoras de crescimento, por meio da produção de ácido indolacético e solubilização de fosfato.



## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Espécies Arbóreas Nativas utilizadas no estudo

*Pterogyne nitens* Tull. (Fabaceae – Caesalpinioideae) é popularmente conhecida como amendoim-do-campo ou amendoim-bravo. Na América Latina essa espécie arbórea ocorre na Argentina, Bolívia, Paraguai e Brasil. No território brasileiro ocorre com frequência na região de Mata Atlântica e Cerrado compreendida entre o Ceará até o Paraná (CARVALHO, 1994).

No estado de São Paulo, é amplamente empregada na construção civil devido às características da sua madeira moderadamente densa e resistente. É recomendada para arborização de vias urbanas e rodovias, reposição de mata ciliar para locais com inundações periódicas de rápida duração e revegetação em sítios arenosos e degradados (LORENZI, 2000).

A literatura apresenta poucos dados das aplicações medicinais e da constituição química de *P. nitens*. Estudos etnofarmacológicos em comunidades guaranis do nordeste da Argentina revelam o uso das cascas do caule no tratamento de infestações parasitárias, principalmente no combate ao *Ascaris lumbricoides* (CRIVOS et al., 2007).

*Albizia hasslerii* (Chodar) Burkat (Fabaceae – Mimosoideae) conhecida popularmente como farinha-seca, bastante comum em nossas matas; na região da Floresta Atlântica, floresce de janeiro a fevereiro. Suas principais características são o tronco liso e claro, e a floração branca ou creme. Espécie muito usada em projetos de reflorestamento no estado de São Paulo e amplamente empregada na arborização urbana (LORENZI, 2000).

*Copaifera langsdorffii* Desf. (Fabaceae – Caesalpinioideae) também chamada por óleo-de-copaíba ou simplesmente copaíba, é uma árvore que atinge até 35 m de altura, distribui-se desde o nordeste da Argentina até a Venezuela, sendo encontrada em todo território brasileiro (MACHADO, 1990). É uma espécie emergente do dossel das matas ciliares no Distrito Federal (LEITE & SALOMÃO, 1992) e no Triângulo Mineiro (SCHIAVINI, 1997, RESENDE et al., 1997). Aparece comumente em solos bem

drenados e, de maneira geral, cresce melhor em solos de matas ciliares e matas semidecíduas, do que em solo de cerrado (MACHADO, 1990). Fornece o bálsamo ou óleo de copaíba, um líquido transparente e terapêutico, que é a seiva extraída mediante a aplicação de furos no tronco até atingir o cerne (LORENZI, 2000).

A espécie *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae – Mimosoideae), conhecida como barbatimão, tem distribuição geográfica ampla, ocorrendo desde o Pará, passando pelo planalto central, até Minas Gerais e São Paulo. Ocorre em formações savânicas primárias e secundárias, com altas densidades em várias localidades do Brasil central (FELFILI et al., 1993, 1994; FELFILI & SILVA JUNIOR, 1993).

Na medicina caseira, o extrato da casca de *S. adstringens* é amplamente empregado na maioria das regiões do Brasil no tratamento de hemorragias, diarreia, hemorróidas, para limpeza de ferimentos e na forma de gotas contra conjuntivite (NUNES et al., 2003; MACEDO & FERREIRA, 2004). Estas atividades devem-se à riqueza em taninos presentes na casca dessa planta (LORENZI, 2000; LORENZI & MATOS, 2002; SANTOS et al., 2006). Segundo TOLEDO (2002) o extrato obtido das cascas de *S. adstringens* demonstra atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Outra atividade medicinal dessa espécie é a ação cicatrizante e a eficácia de preparações com a planta já foi confirmada por vários estudos. CARVALHO et al. (1991) comprovaram a ação de preparações aquosas da casca da planta na cicatrização cutânea de feridas. O alto teor de tanino presente na casca (MELLO et al., 1999) é, provavelmente, o que explica a atividade cicatrizante.

## **2.2 Rizobactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (RPCPs)**

No solo existe um grande número de bactérias que se localizam na rizosfera, e aproximadamente cerca de 7 a 15% da superfície total das raízes é ocupada por estas células microbianas (GRAY & SMITH, 2005). Recentemente, vários estudos da atividade microbiológica que ocorre na rizosfera, que é a zona de influência das raízes

que vai desde sua superfície até uma distância de 1 a 3 mm (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006), levaram ao descobrimento de diversos grupos de microrganismos importantes para o desenvolvimento vegetal. Dentre eles estão as rizobactérias que são capazes de colonizar as raízes, estimulando-as diretamente ou beneficiando o crescimento e o desenvolvimento de diversas plantas. Essas bactérias são chamadas de “Plant growth-promoting rhizobacteria” (PGPR) (BISWAS et al., 2000; GYANESHWAR et al., 2001; GRAY & SMITH, 2005; BARRIUSO et al., 2005; KOKALIS-BURELLE et al., 2006) ou rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP).

Recentemente GRAY & SMITH (2005) propuseram novos conceitos para se classificar ou dividir as bactérias PGPRs :

iPGPR – bactérias que residem dentro das células das plantas, produzindo nódulos, estruturas especializadas na fixação de nitrogênio em leguminosas. Atualmente, as bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* são as mais estudadas deste grupo, mas existem outros gêneros bacterianos de solos que pertencem a essa categoria, como: *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*.

ePGPR – bactérias que se desenvolvem extracelularmente nos tecidos das raízes de diversas plantas, não produzindo nódulos, mas com capacidade de promover o crescimento vegetal através da produção de sinais ou substâncias específicas. Podem ser incluídas nesta categoria as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Burkholderia*.

As RPCPs representam uma grande variedade de bactérias de solo que, quando associadas com plantas, levam a um aumento substancial da área radicular. Esse aumento na superfície radicular promove uma maior eficiência na retirada de água, macro e micronutrientes pelas plantas. Outro aspecto importante é que as RPCPs apresentam um relativo efeito antagônico sobre muitos microrganismos patogênicos, promovendo, portanto, um eficiente controle biológico na natureza (DA SILVEIRA, 2008).

A maioria das RPCPs estudadas na literatura são gram-negativas, e o principal efeito delas sobre as plantas é o fornecimento de fitormônios de crescimento, como auxinas, várias giberelinas e citocininas (EL-KHAWAS & ADACHI, 1999). Esses

produtos auxiliam o crescimento da raiz e conseqüentemente da parte área do vegetal, aumentando assim, a captação de nutrientes pela planta (ANTOUN et al., 1998; ASGHAR et al., 2002). Além disso, estas estirpes bacterianas também contribuem indiretamente para o desenvolvimento da plantas com a produção de diversos antibióticos ou outros mecanismos de biocontrole, os quais inibem o crescimento de diversos microrganismos considerados fitopatogênicos (DASHTI, 1998; GRAY & SMITH, 2005).

A especificidade de bactérias para a inoculação de espécies florestais parece ser similar à observada em sementes agrícolas (SHISHIDO & CHANWAY, 2000). Ecótipos ou árvores da mesma espécie, de diferentes regiões ou altitudes, também exibem diferentes respostas à inoculação bacteriana (CHANWAY, 1995).

MAFIA et al., 2007 em experimento avaliando a eficiência de isolados bacterianos, obtidos a partir da rizosfera de mudas clonais de eucalipto de diferentes regiões do Brasil, evidenciaram que os incrementos em enraizamento e em biomassa radicular de eucalipto, variaram de acordo com o isolado e o clone da planta.

Recentemente, investigações quanto ao uso de RPCPs em espécies arbóreas têm evidenciado, também, resultados promissores. SHISHIDO & CHANWAY (2000) obtiveram resultados significantes em inoculação de estirpes de *Paenibacillus* sp e *Pseudomonas* sp. na promoção de crescimento em mudas de abeto (*Picea glauca*).

### **2.3 Aplicação da biologia molecular no estudo da diversidade de promotores de crescimento vegetal**

O uso da taxonomia tradicional não supre as necessidades para o conhecimento de uma espécie bacteriana, tendo em vista a necessidade de situá-la, sobretudo, em seu contexto ecológico (CANHOS et al., 1997).

Com a evolução das aplicações das técnicas moleculares para o estudo da microbiota do solo, inúmeros métodos de extração de DNA foram aperfeiçoados. Estes métodos possuem procedimentos que envolvem a quebra ou digestão de paredes e

membranas celulares para possibilitar a liberação do conteúdo genético da célula (VALADARES-INGLIS & MELO, 1998).

A partir da década de 80, um grande número de metodologias moleculares vem sendo desenvolvido para análise da diversidade microbiana dos solos (BORNEMAN et al., 1997; CULLEN & HIRSCH, 1998), tornando-as cada vez mais rotineiras (DROZDOWICZ, 1997). Tais metodologias utilizam o DNA genômico total, extraído diretamente do meio ambiente e, ampliações via PCR, torna possível a identificação dos microrganismos ainda desconhecidos e não cultiváveis presentes na amostra (CANHOS et al., 1997; DROZDOWICZ, 1997; DOJKA et al., 1998; MACRAE, 2000; KENT & TRIPLETT, 2002).

A utilização do gene 16S rRNA revolucionou o campo da ecologia microbiana e, com seu uso, é possível investigar e determinar posições filogenéticas de comunidades bacterianas de meio ambiente (LUDWIG et al., 1997; KUSKE et al., 1997). Os estudos com o gene 16S rRNA foram iniciados por Carl Woese que argumentou que esta molécula era um excelente marcador molecular (ATLAS & BARTHA, 1998).

Os RNAs ribossomais estão entre as macromoléculas mais conservadas evolutivamente em todos os seres vivos. Seu papel funcional no sistema de processamento de informações gênicas, deve ter sido bem estabelecido nos primeiros ancestrais comuns de Bactéria, Arquea e Eucaria. Os genes dos rRNA em todos os organismos contemporâneos partem de um ancestral comum e eles não parecem submeter-se à transferência de genes entre espécies. Por causa das unidades funcionais, grandes porções nos genes de rRNA são bem conservadas e suas sequências podem ser usadas para medir distâncias filogenéticas, mesmo entre os organismos mais distintamente relacionados. Variações nas sequências dos nucleotídeos do gene de rRNA são indícios de mudanças evolucionárias. Resultados de filogenia baseados nas análises do gene 16S rRNA revelaram a separação dos 18 domínios Bactéria, Arquea e Eucaria. Estudos filogenéticos moleculares proporcionam uma idéia de evolução em grande escala; quando vista desta maneira mostram a importância dos microrganismos na história evolutiva da vida na Terra, que não pode ser ignorada (ATLAS e BARTHA, 1998).

Segundo IGUAL et al. (2001), a sequência do gene 16S rRNA é a mais utilizada como marcador filogenético para a ecologia microbiana. A alta conservação presente na sequência do gene 16S rRNA possibilita uma estimativa da distância filogenética. Os amplicons obtidos através da região 16S rDNA são sequenciados e analisados usando um banco de dado onde estão depositadas sequências do gene 16S rRNA e, com softwares apropriados, permitem rápida identificação de bactérias com base na sequência rRNA. Entretanto, a sequência do gene 16S rRNA apresenta baixo nível de resolução taxonômico, o qual se apresenta viável para a classificação das bactérias quanto ao gênero, mas insuficiente para classificá-las quanto às espécies.

Considerando a taxonomia atual, onde a sequência completa do gene 16S rRNA consegue caracterizar as bactérias em nível de gênero e raramente em nível de espécie (GARRITY & HOLL, 2001). Dessa forma, devido à incapacidade das técnicas moleculares analisarem estes genes ribossomais, não conseguem diferenciar estirpes, outras técnicas vêm sendo utilizadas no controle de qualidade de bactérias recomendadas e distribuídas para indústrias de inoculantes.

Três famílias de pequenas sequências intergênicas repetitivas têm sido encontradas em eubactéria, nomeadas de REP (“Repetitive Extragenic Palindromic”) (35-40 pb) (STERN et al., 1984), ERIC (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) (124-127 pb) (HULTON et al., 1991) e BOX-box A (54 pb), box B (43 pb) e box C (50 pb) (MARTIN et al., 1992). Este método apresenta alto fator de discriminação para a diferenciação de espécies muito próximas taxonomicamente. Os elementos repetitivos parecem estar localizados em distintas posições intergênicas no genoma, em ambas as orientações. Em relação ao BOX, apesar da existência de três elementos, somente a subunidade BOXA apresenta-se altamente conservada em bactérias (KOEUTH et al., 1995). Devido a graus elevados de polimorfismo, essas regiões gênicas podem ter uma participação em processos de evolução adaptativa, mediando a interação dos microrganismos com ambientes hostis (VAN BERKUM, 1999). A síntese de *primers* para amplificação desses elementos pode ser realizada a partir de repetições invertidas dos elementos REP, ERIC e da subunidade box A e se as

repetições estiverem distribuídas no genoma em orientação invertida, então um único *primer* pode ser suficiente para gerar polimorfismo de DNA (VERSALOVIC et al., 1994)

## 2.4 Bactérias produtoras de fitormônios

Entre as auxinas, o ácido indolacético (AIA), é o mais estudado e o mais produzido pelas bactérias. Essa substância afeta a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pelos radiculares (BARBIERI et al., 1986). Além disso, outros hormônios que estimulam o desenvolvimento e o crescimento nos vegetais já há muito tempo foram encontrados como metabólitos bacterianos, por exemplo, a citocinina e a giberelina (GRAY & SMITH, 2005).

Existe ampla evidência que numerosos microrganismos do solo estão ativamente envolvidos na síntese de auxinas em meio de cultura e no solo (ANTOUN et al., 1998; VEGA-HERNÁNDEZ et al., 2002). Exsudados de raízes são naturalmente fonte de triptofano (DAKORA & PHILLIPS, 2002) para os microrganismos, aumentando a biossíntese de auxina na rizosfera.

O ácido indolacético ou auxina é um fitormônio requerido em baixas concentrações, sendo conhecido por sua capacidade no desenvolvimento da raiz, divisão celular e multiplicação celular. Este hormônio é comumente produzido por bactérias promotoras de crescimento, como *Aeromonas veronas*, *Agrobacterium* sp., *Azospirillum brasilense*, *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium* sp., *Enterobacter* sp., entre outras (VESSEY, 2003).

ZAHAROVA et al. (1999) verificaram que 80% das bactérias isoladas de rizosfera são capazes de produzir AIA. Apesar disso, existem poucos trabalhos sobre a síntese de auxinas por microrganismos no solo, mas sabe-se que o aminoácido L-triptofano (L-Trp) é um precursor fisiológico para a produção de auxinas em diversas plantas e microrganismos, e que a enzima chamada ipdC (indole-3-pyruvate decarboxylase-EC 4.1.1.74) é a enzima-chave para a biossíntese destes fitormônios (LEBUHN & HARTMANN, 1993).

Processos analíticos de detecção de AIA em laboratório são frequentemente utilizados para identificação e seleção de RPCPs. Desse modo, ONA et al. (2005) realizaram ensaios *in vitro*, nos quais as condições ambientais que beneficiariam a produção de auxinas por *Azospirillum brasilense* foram adequadas. Estes autores sugeriram que o relacionamento entre esta espécie bacteriana e a raiz é um fator favorável para a produção de AIA, pois essas interações apresentam características que beneficiam a formação deste hormônio tais como: baixas concentrações de carbono, nitrogênio, oxigênio e a presença de triptofano.

EL-KHAWAS & ADACHI (1999) demonstraram que as espécies *Azospirillum brasilense* (ATCC 2970) e *Klebsiela pneumoniae* (ATCC 13883) têm potencial para a produção de AIA em condições laboratoriais. Além disso, verificaram que a quantidade deste hormônio produzido pode ser ajustada *in vitro*, o que se torna uma importante característica para a promoção do crescimento vegetal.

Um outro hormônio sintetizado pelos microrganismos é a citocinina, que também auxilia no crescimento de diversas espécies vegetais, atuando nas divisões celulares, na germinação das sementes, na expansão das raízes e folhas e também na senescência do vegetal. Dentre os microrganismos produtores deste composto podemos citar a espécie *Pseudomonas fluorescens* que produz altas concentrações deste fitormônio (GRAY & SMITH, 2005). Algumas bactérias como o *Bacillus* sp. também produzem altos níveis de giberelinas, que induzem efeitos positivos no crescimento de caules e galhos de diversas plantas (GRAY & SMITH, 2005).

## **2.5 Bactérias solubilizadoras de fósforo**

Depois do N, o fósforo (P) é o nutriente que mais limita o crescimento das plantas e microrganismos, apesar de ser abundante em solos em ambas as formas orgânica e inorgânica (FOHSE et al., 1988; PEREIRA & BLISS, 1989). No solo, o fósforo é sujeito a inúmeros processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre esses processos, destaca-se a dissolução de fosfatos por microrganismos, que torna disponível para as plantas (WHITELAW, 2000)



Alguns microrganismos presentes nos solos, como bactérias e fungos, possuem papel importante no ciclo natural de P, sendo responsáveis pela hidrólise de compostos fosfatados para a forma inorgânica, tornando-se disponível para as plantas, sendo estes processos mediados por enzimas fosfatases (RODRIGUÉZ et al., 2000; GYANESHWAR et al., 2002; SOBRAL, 2003). As bactérias solubilizadoras de fósforo atuam sobre o fosfato insolúvel através de enzimas fosfatases, principalmente fosfatases ácidas, tendo a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos e/ou pela redução do pH, tornando então o fosfato disponível para as plantas (NAUTIYAL, 1999; SOBRAL, 2003). Devido ao potencial desses microrganismos, diversos estudos vêm sendo realizados para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico. Entre os gêneros bacterianos que são conhecidos com esta capacidade, estão: as *Pseudomonas*; *Burkholderia*; *Rhizobium*; *Agrobacterium*; *Azotobacter*, e *Erwinia* (VERMA et al., 2001; GARG et al., 2001).

Entre as bactérias que atuam na solubilização do fosfato, as *Burkholderias* estão presentes em um grande número de ambientes de importância ecológica. Muitas bactérias deste gênero vêm sendo isoladas dos solos e têm mostrado uma relação simbiótica com a rizosfera das plantas (COENYE & VANDAME, 2003). As bactérias do gênero *Burkholderia* podem manter interações benéficas como promotoras de crescimento, como agentes biopesticidas, capacitadoras de fixação biológica de nitrogênio (MINERDI et al., 2001), solubilizadoras de fósforo e com a capacidade biorremediadora de catabolizar substâncias consideradas poluentes (GORIS et al., 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Localização dos experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), do Departamento de Tecnologia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, São Paulo.

#### 3.2 Obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos de mudas de quatro espécies florestais nativas do Brasil (*Pterogyne nitens* Tull., *Albizia hasslerii* (Chodar) Burkat, *Copaifera langsdorffii* Desf. e *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville), cedidas pelo Viveiro Camará situado no município de Ibaté, estado de São Paulo. As mudas foram avaliadas após 8 meses de idade, produzidas em tubetes (290 cm<sup>3</sup>) com substrato orgânico Plantmax<sup>®</sup> Florestal. Rizosfera e raízes constituíram os materiais de onde foram isoladas as bactérias deste trabalho.

Para os isolados da rizosfera, as raízes das mudas das quatro espécies foram agitadas de forma cuidadosa para retirada do excesso de substrato, porém o substrato aderido às raízes foi mantido. Em fluxo laminar, uma solução salina 0,85% estéril foi utilizada para lavar as raízes e, dessa forma, obter-se uma suspensão com substrato rizosférico, 1 mL dessa suspensão foi adicionada a 9 mL da solução salina 0,85%, suplementada com 100 µL da solução antifúngica cicloheximida na concentração de 1 mg/mL. Após a adição do antifúngico, deixou-se a suspensão em repouso por 15 min, passado o tempo de repouso as diluições seriadas foram realizadas até 10<sup>-5</sup>, sendo que 100 µL das três últimas diluições (10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup>) foram inoculadas em placas de Petri (14 cm de diâmetro), com meio de cultura NFb (DÖBEREINER et al., 1995), livre de nitrogênio, em triplicata.

Para a desinfecção das raízes e obtenção de microrganismos endofíticos utilizou-se o método descrito por DÖBEREINER et al. (1995), com modificações. Esse processo

consistiu em lavar as raízes das mudas florestais em água corrente, retirou-se 10 g e desinfetou-se as raízes por 10 min com etanol 70% e 5 min em hipoclorito de sódio 0,1%. Em seguida, na câmara de fluxo laminar, 1 g de raízes desinfetadas foram cortadas com um bisturi (estéril), colocadas com 9 mL de solução salina 0,85%, também estéril, maceradas em cadinho com o auxílio de um pistilo, até que as raízes fossem totalmente fragmentadas. Após este processo, retirou-se 1 mL do sobrenadante para a realização das diluições seriadas até  $10^{-5}$  e isolamento bacteriano como descrito anteriormente.

Após os procedimentos de isolamento, diluições e semeadura do inóculo, as placas de Petri foram incubadas em BOD, a 30°C, por um período de 3 a 5 dias, quando foi realizado o procedimento de coleta das colônias. As colônias com colorações e formas diferentes foram coletadas e inoculadas em placas com o meio de origem (NFb) e repicadas por três vezes para purificação desses isolados.

### **3.3 Caracterização de novos isolados**

#### **3.3.1. Extração e purificação do DNA genômico (SAMBROOK et al.,1989).**

As diferentes linhagens foram cultivadas em meio DYGS (RODRIGUEZ NETO et al., 1986) sólido. Para a extração de DNA, os isolados foram crescidos em 50 mL do meio que proporcionou a menor quantidade de goma durante 24h, a 28°C, sob agitação de 180 rpm. Cada suspensão bacteriana foi centrifugada a 12.000 x g por 30 min, a 4°C. O sedimento foi lavado com solução salina (NaCl 0,85%) e coletado após centrifugação de 15600 x g por 5 min. Para lise bacteriana, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de solução salina/1 mM EDTA e pré-incubado a 37°C, por 10 min. Foram adicionados, então, 500 µL de lisozima (5 mg/mL) em Tampão Tris/EDTA/Dextrose, deixando a 56°C, por 20 min.

Após este tempo de incubação, foram adicionados 500 µL de perclorato de sódio 5M, gota a gota, sob suave agitação, e 2 mL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1). As amostras foram deixadas por 1h, a 8°C (banho de gelo), sob agitação

orbital a 220 rpm. Foi efetuada uma centrifugação de 12000 x g por 20 min, a 4°C. A fase superior aquosa foi recolhida e misturada com 2 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), sendo mantida por 20 min, a 8 °C, sob agitação de 220 rpm. Foi feita mais uma centrifugação e, posteriormente, foi coletada a fase superior.

Para a precipitação do DNA genômico foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto (-20°C) com incubação a -20°C, por cerca de 16 horas. O material foi centrifugado a 5860 x g por 20 min, a 4°C. Após descartar o sobrenadante, o precipitado foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 70% (-20°C) e secou à temperatura ambiente. O DNA foi ressuscitado em Tampão TE 10:1(Tris-HCl-10mM; EDTA-1mM; pH 8,0), quantificado em espectrofotômetro em 260 nm e analisado através de eletroforese em gel de agarose 0,8%.

### **3.3.2.Quantificação do DNA genômico**

Para a quantificação do DNA fez-se uma diluição de 10X do DNA em água milli-Q. A leitura da absorbância foi realizada em um espectrofotômetro Beckmann-Du 640-B, onde se utilizou o comprimento de onda 280 nm para se determinarem possíveis contaminações do mesmo com proteína e/ou fenol. Otimizou-se o DNA quando a leitura da absorbância da relação 260/280 nm se apresentou na faixa entre 1,7 e 2,0. Para os cálculos da concentração do DNA, considerou-se o padrão de que uma unidade de absorbância a 260 nm, como equivalente a 50µg de DNA por mL de solução (SAMBROOK et al., 1989).

A relação entre as absorbâncias 260/280 nm estima o grau de pureza do DNA. Essa relação é influenciada pelo pH e pela concentração de sais da solução na qual o DNA foi diluído. DNAs diluídos em água mantêm uma relação na faixa entre 1,5 e 1,9, enquanto DNAs diluídos em tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 mantêm a relação entre 1,8 e 2,1. Contudo, quanto mais próximo de 1,8 for a relação, maior a pureza do DNA extraído. Se a relação não apresentar os valores adequados, pode-se fazer uma purificação do DNA com o objetivo de eliminar proteínas, resíduos de fenol ou outro

composto contaminante e depois de obter uma relação adequada, apenas o valor de absorvância a 260nm é utilizado para o cálculo da concentração de DNA.

A quantidade do DNA genômico também foi avaliada por meio da comparação visual com a intensidade das bandas do 1Kb ladder (Fermentas<sup>®</sup>), com concentrações conhecidas, por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8 %.

### **3.3.3. Amplificação do DNA por oligonucleotídeos iniciadores correspondente ao gene 16S rRNA.**

O gene 16S rRNA presente nos isolados foram amplificado pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os *primers* universais fD1 e rD1 (“forward e reverse”) (WEISBURG et al., 1991). A reação contendo 200 mM de deoxinucleotídeos, 5 pmoles de cada *primer*, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, Tampão 10X para PCR e 1,25U de Taq DNA polimerase (Fermentas) e 40 ng de DNA foi realizada em termociclador Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 Applied Biosystem, com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min.; seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 seg. pareamento a 56°C por 40 min.; e extensão a 72°C por 1 min. e 30 seg., um ciclo de extensão final a 72°C por 7 min. e manutenção à 4°C .

### **3.3.4. Amplificação da sequência repetitiva BOX-A 1R**

Regiões dos DNAs cromossômicos dos isolados foram amplificados usando-se o oligonucleotídeo BOX-A 1R (5'- CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G - 3') (MARTIN et al., 1992).

As condições da PCR foram 30 ng de DNA molde, 10 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão 10X, 5 pmoles  $\mu\text{L}^{-1}$  de *primer*.BOX-A 1R 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas<sup>®</sup>) e água milli-Q estéril para completar o volume final de 20  $\mu\text{L}$ .

A amplificação foi realizada no termociclador Gene Amp<sup>®</sup> PCR System 9700 Applied Biosystem. Para Onde foi realizado 1 ciclo a 95°C por 5 min.; seguido de 40

ciclos de desnaturação a 95°C por 1 min.; pareamento a 60°C por 1 min.; e extensão a 72°C por 1 min. e 30 seg.; extensão final a 72°C por 5 min. e um ciclo final de 5°C.

### **3.3.5. Eletroforese em Gel de Agarose contendo Brometo de Etídio e documentação**

A separação dos produtos amplificados pela PCR foi feita em géis de agarose (BioRad), na concentração de 1,5%, 1 hora a 80V para os produtos de PCR da região 16S rDNA e 2%, 9 horas e 60V para o BOXA – 1R em cuba horizontal (Max Cell EC360M), utilizando como peso molecular o marcador 1 kb DNA em tampão TBE (89 mM de Tris – base, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA, pH 8,3).

A agarose foi fundida em tampão TBE 1X, em forno de microondas, na potência máxima, deixando-a esfriar em temperatura ambiente até atingir aproximadamente 60°C, sendo em seguida adicionados brometo de etídio (5 µg/mL) e agarose vertida na cuba da eletroforese. Uma vez a agarose solidificada, foram adicionados 1.800 ml de tampão TBE. Os produtos da amplificação (5 µL) foram misturados com 2 µL de tampão de amostra (glicerol 30%, EDTA 100 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,30%) e aplicados nos poços do gel. Como padrão do peso molecular, foi usado 1 Kb DNA ladder (Fermentas®).

Os géis foram visualizados através da incidência de luz ultravioleta, identificados e registrados através de um sistema de documentação de géis GEL Doc1000 (BioRad), com opção de imagem invertida, a fim de se produzir uma imagem negativa, para facilitar a visualização das bandas.

### **3.3.6. Reação da PCR para sequenciamento do fragmento gênico 16S rDNA**

O produto de PCR foi purificado utilizando-se o Kit GENE CLEAN® (Bio 101). As reações de sequenciamento foram realizadas em microplacas, utilizando cada oligonucleotídeo de forma independente com 80 ng de DNA, 1,0 µL de dye (DYEnamic ET, Amersham Biosciences), Tampão 2,5X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0; 10 mM MgCl<sub>2</sub>),

1,0 µL dos *primers* fD1 ou rD1 (5 pmoles) e 1,0 µL dos *primers* internos (3 pmoles): 362f (região 339 - 362) (5' – CTCCTACGGGAGGCAGCAGT - 3'), 786 f (região 746 - 786) 5' AAGCGTGGGGAGCAAACAGG - 3') e 1203 f (região 1179 - 1203) (5' – AGGTGGGGATGACGTCA - 3'). Para os *primers* internos foi utilizado o seguinte programa: desnaturação a 95°C por 2 min.; seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 seg., pareamento a 50°C por 4 seg.; e extensão a 60°C por 4 min; e manutenção à 4°C (MENNA et al., 2006).

### **3.3.7. Purificação e sequenciamento dos produtos da PCR 16S rDNA**

Após a reação as amostras foram preparadas para o sequenciamento do produto de PCR em microplaca. Foram adicionados 8 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 min em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.220 x g por 45 min, a 20°C. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante, e a placa foi deixada por 5 min em temperatura ambiente, invertida em papel absorvente. Foram adicionados 200 µL de etanol 70%, e a microplaca foi centrifugada a 3.220 x g por 10 min, a 20°C. Após a centrifugação, foi descartado novamente o sobrenadante, e a placa foi invertida novamente sobre papel absorvente para uma breve centrifugação da placa (spin). As amostras foram secas em fluxo laminar por 30 min. Em seguida, as amostras foram ressuspensas com 9 µL Hi-Di Formamide – Catálogo - P/N 4311320 (ABI Prism) e desnaturadas a 95°C por 5 min. O sequenciamento dos isolados foi realizado no sequenciador capilar modelo ABI 3700 (Applied Biosystem).

### **3.3.8 Análises individuais e combinadas dos produtos da PCR**

Para se verificar a qualidade das sequências foi utilizado o programa “Sequencing Analysis 3.4”, gerando os eletroforogramas que foram submetidos à análise pelo pacote de programas “Phred/Phrap/Consed” (GORDON et al. 1998). A seleção das sequências adequadas foram realizadas utilizando os programas Phred/Phrap, os quais analisam a

qualidade das sequências, visualizando graficamente, gerando arquivos no formato “fasta”, na qual o nível de exigência foi de 200 bases com qualidade Prhed maior ou igual a 20 (EWING et al., 1998), auxiliado pelo programa “Contgen.pl”.

Preliminarmente as sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos, com seqüências depositadas no banco de dados GenBank para confirmar o sequenciamento, que foi acessado através do programa BLAST “Basic Local Alignment Search Tools” (ALTSCHUL et al., 1997), em uma “workstation” SUNBLADE 1000 (SUN Microsystems), pelo “site” do Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (<http://lbmp.fcav.unesp.br/blast>).

Essas sequências foram comparadas com outras do Ribossomal Database Project II ([rdp.cme.msu.edu](http://rdp.cme.msu.edu)) utilizando o programa Classifier com 95% de confiança para atribuir as sequências 16S rDNA (WANG et al., 2007). O RDP utiliza como classificador o Naive Bayesian rRNA Classifier (Versão 1.0, Novembro 2003) e a taxonomia hierárquica se baseia no Manual de sistemática bacteriológica Bergey (GARRITY et al., 2004).

Dendrogramas para cada espécie arbórea foram construídas com o auxílio dos programas ClustalX 2.0 (LARKIN et al., 2007) para alinhamento global das seqüências e Mega 4 (TAMURA et al., 2007), para execução dos cálculos e construção das árvores, usando o método de distância “neighbor-joining”.

### 3.3.9. Análises individuais e combinadas dos produtos de PCR da sequência repetitiva BOX-A 1R

Para o cálculo da matriz de similaridade foi utilizado o coeficiente de Jaccard, (LEGENDRE & LEGENDRE, 1983). Coeficiente de Jaccard (i, j) é igual a  $a/(a+b+c)$ , onde a, b e c são coeficientes definidos da seguinte forma:

		j	
		presença	ausência
i	presença	a	b
	ausência	c	-



As letras “i” e “j” referem-se a duas estirpes, sendo indicadas presença e ausência de bandas; a é igual ao número de coincidências; b+c é igual a um número de discrepâncias.

A partir da análise do bandeamento produzido por cada reação de amplificação do marcador, é conferido parâmetro 1 para a presença de banda e zero para ausência, sendo possível a elaboração de uma matriz binária, analisada pelo programa de sistema de análise multivariada (NTSYS-pc). A árvore filogenética foi construída pelo método do Agrupamento Hierárquico *Neighbor-joining*, através do programa *FreeTree* (PAVLICEK et al., 1999).

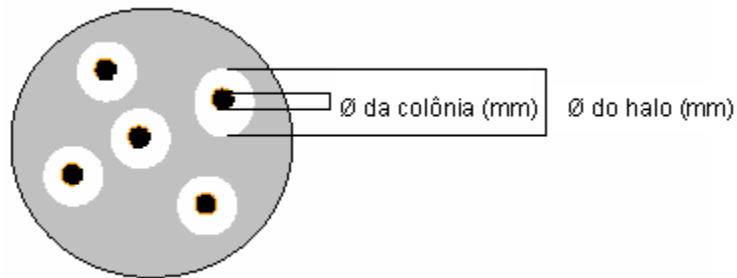
### **3.4 Determinação colorimétrica do Ácido Indolacético (AIA)**

Todos os isolados obtidos, conforme os procedimentos citados anteriormente, das quatro espécies florestais do presente trabalho, foram submetidos à avaliação da produção de AIA conforme o método colorimétrico descrito por GORDON & WEBER (1951), com algumas modificações. Os isolados foram inoculados e cultivados em meio de cultura sólido DYGS; após 24h duas alçadas da cultura desenvolvida foram inoculadas em tubos de vidro vedados contendo 6 mL de meio de cultura DYGS autoclavados com 60 µL de triptofano, na concentração de 100 µg/mL, com 24h de desenvolvimento, a cultura foi centrifugada por 10 min a velocidade de 10.000 x g a 10°C. Em seguida, 1 mL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para o tubo de ensaio (25 mL), sendo adicionados 2 mL da solução de Salkowski (FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 2% + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 37%). Os tubos feitos em triplicata para cada isolado, foram mantidos no escuro por 30 min (HARTMANN et al., 1983) para posterior leitura em espectrofotômetro DU® 640 Beckman, quantificado na absorvância de 530 nm, acusando a presença de AIA em amostras com a coloração avermelhada. Controle negativo foi feito utilizando apenas o meio de cultura DYGS. Uma curva padrão da produção de AIA foi obtida com o hormônio sintetizado (Sigma), 98% de pureza nas seguintes concentrações: 0, 1, 3, 5, 7, 10, 25, 50, 100 e 150 µg.mL<sup>-1</sup>.

### .3.5 Teste de solubilização de fosfato

Para testar a capacidade de solubilização de fosfato dos isolados, estes foram inoculados em placas de Petri com meio de cultura NBRIP (NAUTIYAL, 1999), contendo solução de fosfato de cálcio como fonte de fosfato. O diâmetro do halo (mm) em volta da colônia e da colônia propriamente dita, de cada isolado, foram medidos em três tempos: 5 dias, 10 dias e 15 dias após a inoculação. Os resultados foram expressos como índice de solubilização (IS) calculada segundo BERRAQUEIRO et al., 1976, onde:

$$IS = \text{Diâmetro do halo} / \text{Diâmetro da colônia} \times 100$$



De acordo com SILVA FILHO & VIDOR (2000), a solubilização pode ser classificada como baixa ( $IS < 2$ ), média ( $2 < IS < 3$ ) e alta ( $IS > 3$ ). A partir dos 29 isolados, por meio do software AgroEstat (BARBOSA & MALDONADO JUNIOR, 2008), o teste estatístico “Tukey” foi aplicado aos resultados obtidos em quinze dias de cultura dos isolados, em meio NBRIP, selecionando-se assim os isolados de melhor resultado.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Isolados

O número encontrado de isolados da rizosfera e endofíticos, das espécies arbóreas nativas *Pterogyne nitens*, *Albizia hasslerii*, *Copaifera langsdorffii* e *Stryphnodendron adstringens*, foi 29 (Tabela 1). O meio de cultura utilizado para o isolamento, NFb, livre de nitrogênio, foi escolhido devido a sua especificidade para bactérias de vida livre, como *Azospirillum* e *Herbasprillum*, considerando que esse meio foi desenvolvido para o cultivo de isolados bacterianos diazotróficos de diferentes plantas, principalmente gramíneas (KUSS et al., 2007). A colonização microbiana de raízes de plantas é afetada por vários fatores bióticos e abióticos assim como exsudados, competição, nutrientes inorgânicos, pH, temperatura e uso de agroquímicos (CHIARINI et al., 1998).

Acredita-se que estes isolados sejam específicos de cada planta hospedeira e que estes microrganismos, provavelmente, tenham origem na semente, onde podem sobreviver mesmo por longos períodos de armazenamento (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A ausência de nitrogênio do meio de isolamento (NFb), foi provavelmente, limitante para o baixo número de isolados encontrados, porém, mesmo com este número, foi possível encontrar isolados produtores de hormônio de crescimento (AIA) e solubilizadores de fosfato inorgânico.

DA SILVEIRA (2008) encontrou maior número de isolados rizosféricos e endofíticos em raízes de cultivares de arroz irrigado, isso ocorre devido ao fato das plantas fornecerem um ambiente favorável a proliferação das bactérias e além de fornecerem exsudatos como carboidratos, ácidos orgânicos e vitaminas.

**Tabela 1.** Número de isolados bacterianos das quatro espécies florestais nativas, separados em rizosféricos e endofíticos

Origem	Isolados bacterianos	
	Rizosféricos	Endofíticos
<i>Pterogyne nitens</i>	7	2
<i>Albizia hasslerii</i>	6	2
<i>Copaifera langsdorffii</i>	4	2
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	3	3
<b>TOTAL</b>		29

#### 4.2 Identificação dos isolados por técnica de sequenciamento do gene 16S rRNA.

Os DNAs obtidos foram utilizados para a reação da PCR com oligonucleotídeos específicos para a sequência 16S rDNA e resultaram na amplificação de um fragmento com 1500 pb e rendimento adequado para o sequenciamento deste gene.

A qualidade do sequenciamento foi adequada e produziu sequências de 957 a 1500 pares de bases (Tabela 2). Isso foi possível devido ao sequenciamento do gene com os *primers* internos inclusive, além dos dois externos fD1 e rD1, o que permitiu o sequenciamento quase completo do gene 16S rRNA e proporcionou uma alta porcentagem de identidade (97% a 100%) com os microrganismos depositados nos bancos de dados “NCBI Blast”. Apenas 4 isolados apresentaram o índice de similaridade menor que 97% foram obtidas, indicando confiabilidade para os resultados (Tabela 2). Segundo BORNEMAN et al (1997), a alta diversidade de microrganismos é devido a composição heterogênea do solo.

PEREIRA et al. (2008) encontrou maior diversidade bacteriana, possíveis RPCPs no solo sob *Eucalyptus* sp., comparando com amostras de solo sob mata nativa. Esse resultado está em consonância com observações anteriores de que a diversidade de

bactérias no solo sob *Eucalyptus* sp é maior do que no solo sob mata (SILVEIRA, 2004; SCAQUITO, 2004).

O sequenciamento de isolados desconhecidos ou selvagens deve ser o primeiro passo após o isolamento da bactéria, através de meios de cultura restritivos para cada microrganismo, evitando assim o possível contato com bactérias patogênicas que podem oferecer risco para o meio ambiente e saúde humana.

O solo constitui-se num dos principais reservatórios de carbono orgânico da Terra e um dos mais importantes ambientes para os microrganismos, principalmente os procariotos. A abundância do carbono procariótico e de outros elementos sugere que cerca da metade do protoplasma vivo da Terra seja de origem microbiana (WHITMAN et al., 1998).

Para o classificador do RDPII (“Ribossomal Data Project II”), foi utilizado um limite de confiança de 95%; portanto, sequências com valores abaixo deste limite estabelecido não conseguiram sua classificação a nível de gênero como os isolados Cl2, Sa5e, Sa6e e Sa7e, que se apresentaram como “unclassified Betaproteobacteria”, “unclassified Rhizobiales”, “unclassified Betaproteobacteria” e “unclassified Rhizobiales” respectivamente. Todas as outras bactérias sequenciadas deram resultados parecidos entre o “NCBI Blast” e “RDPII”, com exceção da Pn1 e Cl4 que foram diferentes quanto ao gênero, porém pertencentes a mesma família Sphingomonadaceae no caso da Pn1 e pertencentes a famílias diferentes, no caso da Cl4 que no “NCBI Blast” se mostrou próxima a *Bacillus* sp. EU741095.1 (família Bacillaceae). No “RDPII” a sequência foi classificada próxima ao gênero *Kurthia* (família Planococcaceae), porém são pertencentes à mesma classe Bacilli. O isolado Ah4 não foi sequenciado pois seu DNA não foi amplificado na reação de PCR da sequência 16S rDNA

Dentre os isolados bacterianos estudados, somente os de *Pterogyne nitens* apresentaram produção de AIA e, entre estes, duas da família Sphingomonadaceae que são capazes de degradar pentaclorofenol, um dos piores poluentes ambientais, devido a sua toxicidade e recalcitrância (DAMS et al., 2007; SITTIG, 1981)

Existem trabalhos que relatam a utilização como biofertilizante de outro gênero bacteriano, o *Rhizobium*, que pode suplementar a ausência do fertilizante nitrogenado

através da promoção do crescimento (CHOUDHURY & KENNEDY, 2004). Bactérias deste gênero (*Rhizobium* sp.), normalmente são saprófitas e considerados como simbiontes específicos para leguminosas, entretanto muitos estudos apontam que este gênero bacteriano tem habilidade de colonizar as raízes de espécies não leguminosas, sugerindo outro mecanismo de estimulação para o crescimento e desenvolvimento da planta (CHABOT et al., 1996; ANTOUN et al., 1998).

Os isolados Pn3 e Pn4 foram classificados como *Rhizobium tropici*, com 99% e 100% de similaridade com sequências do banco de dados “NCBI Blast”. Foram isolados da rizosfera de *Pterogyne nitens* da subfamília Caesalpinioideae. Recentemente, DE TOLEDO et al. (2009) que caracterizaram rizóbios indicados para a produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, sugerem que a SEMIA 6168, indicada e isolada de espécies leguminosas florestais das subfamílias Papilionoideae e Mimosoideae, que era classificada como *Bradyrhizobium* sp. seja reclassificada como *Rhizobium tropici*, o que, de certa forma, confirma a indicação destes isolados como possíveis RPCPs, podendo ser fixadores de nitrogênio e produtores de AIA, promovendo o crescimento radicular de espécies florestais.

Os resultados obtidos pelos isolados Pn8e, Pn9e, Ah1, Ah3, Ah6, Ah7e, Ah8e, Cl2, Cl5 e Cl6e, que foram classificadas como bactérias do gênero *Burkholderia*, confirmam os resultados de que este gênero é um dos principais quanto à solubilização de fosfato.

*Dyella* sp pertencente à família *Xanthomonadaceae* isolada pela primeira vez por XIE & YOKOTA, (2005) de solos sob jardim e foi proposto que se tratava de um novo gênero. Outras bactérias da família *Xanthomonadaceae* são conhecidas por serem patogênicas a plantas como por exemplo as *Xanthomonas* sp. Porém, sobre este gênero *Dyella* pouco se tem registro na literatura. Neste trabalho observou-se uma pequena atividade de produção AIA, 2,5  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Tabela 4).

**Tabela 2.** Resultados das classificações taxômicas através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA dos isolados de *Pterogyne nitens*, *Albizia hasslerii*, *Copaifera langsdorffii* e *Stripnodendron adstringens* e busca por similaridade no GenBank com o programa BLAST e RDP.

Isolado	GenBank Nº	NCBI (Blast)	% ID	Código de	RDPII (95%) Descrição
		Descrição		Submissão	
Pn1	AB264174.1	<i>Sphingomonas</i> sp.	97	GQ181132	<i>Novosphingobium</i> sp.
Pn2	DQ387436.1	<i>Azospirillum</i> sp.	97	GQ181133	<i>Azospirillum</i> sp.
Pn3	FJ405381.1	<i>Rhizobium tropici</i>	100	GQ181134	<i>Rhizobium</i> sp.
Pn4	EF054889.1	<i>Rhizobium tropici</i>	99	GQ181135	<i>Rhizobium</i> sp.
Pn5	AB366319.1	<i>Dyella</i> sp.	99	GQ181136	<i>Dyella</i> sp.
Pn6	X87161.1	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	98	GQ181137	<i>Sphingobium</i> sp.
Pn7	EU857423.1	<i>Ralstonia</i> sp.	99	GQ181138	<i>Ralstonia</i> sp.
Pn8e	AF215706.1	<i>Burkholderia</i> sp.	99	GQ181139	<i>Burkholderia</i> sp.
Pn9e	AF215706.1	<i>Burkholderia</i> sp.	99	GQ181140	<i>Burkholderia</i> sp.
Ah1	AF215706.1	<i>Burkholderia</i> sp.	99	GQ181141	<i>Burkholderia</i> sp.
Ah2	AY568512.2	<i>Burkholderia fungorum</i>	97	GQ181142	<i>Burkholderia</i> sp.
Ah3	AY568512.2	<i>Burkholderia fungorum</i>	99	GQ181143	<i>Burkholderia</i> sp.
Ah4		não identificado			não identificado
Ah5	AJ238361.1	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	99	GQ181144	<i>Herbaspirillum</i> sp.
Ah6	AY568512.2	<i>Burkholderia fungorum</i>	99	GQ181145	<i>Burkholderia</i> sp.

Isolado	GenBank Nº	BLAST		Código de	
		Descrição	% ID	Submissão	RDP (95%)
Ah7e	AF215706.1	<i>Burkholderia</i> sp.	99	GQ181146	<i>Burkholderia</i> sp.
Ah8e	AF215706.1	<i>Burkholderia</i> sp.	100	GQ181147	<i>Burkholderia</i> sp.
Cl2	AF215706.1	<i>Burkholderia</i> sp.	86	GQ181148	unclassified Betaproteobacteria
Cl3	AY568512.2	<i>Burkholderia fungorum</i>	99	GQ181149	<i>Burkholderia</i> sp.
Cl4	EU741095.1	<i>Bacillus</i> sp.	99	GQ181150	<i>Kurthia</i> sp.
Cl5	AY568512.2	<i>Burkholderia fungorum</i>	99	GQ181151	<i>Burkholderia</i> sp.
Cl6e	AY568512.2	<i>Burkholderia fungorum</i>	99	GQ181152	<i>Burkholderia</i> sp.
Cl7e	DQ910902.1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	98	GQ181153	<i>Ochrobactrum</i> sp.
Sa2	EF054892.1	<i>Rhizobium tropici</i>	99	GQ181154	<i>Rhizobium</i> sp.
Sa3	AF215706.1	<i>Burkholderia</i> sp.	98	GQ181155	<i>Burkholderia</i> sp.
Sa4	AB093140.1	<i>Asticcacaulis</i> sp.	99	GQ181156	<i>Asticcacaulis</i> sp.
Sa5e	EF054892.1	<i>Rhizobium tropici</i>	92	GQ181157	unclassified Rhizobiales
Sa6e	DQ453689.1	<i>Bordetella</i> sp.	91	GQ181158	unclassified Betaproteobacteria
Sa7e	DQ910902.1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	93	GQ181159	unclassified Rhizobiales



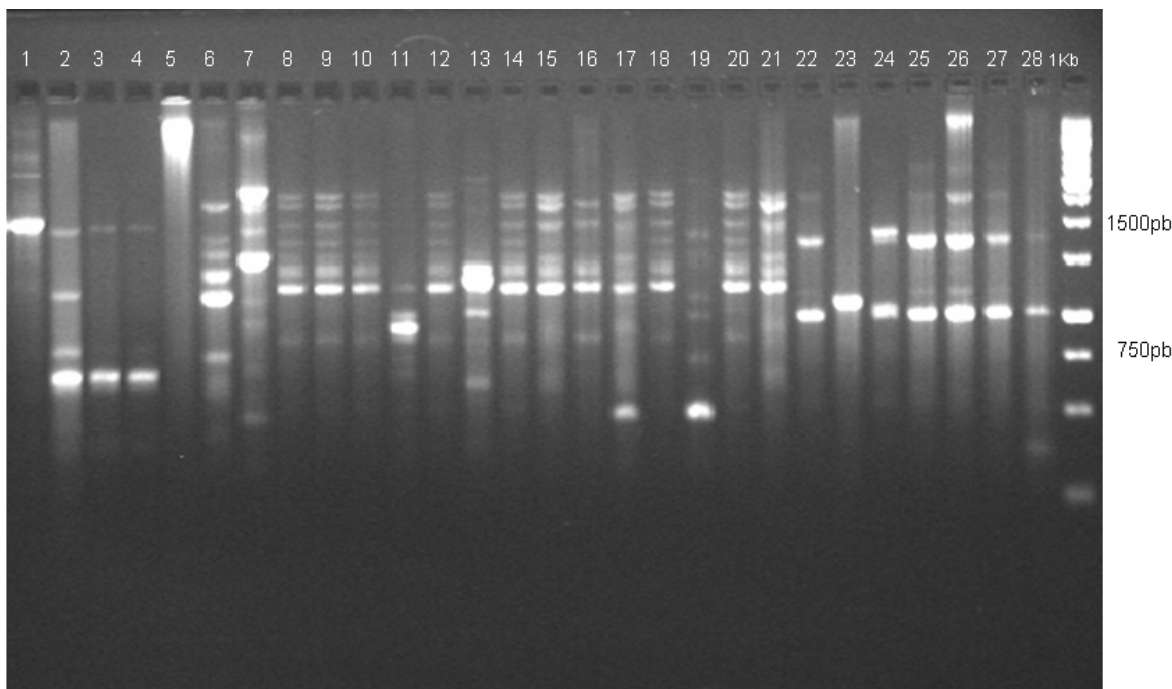
### 4.3 Avaliação da amplificação por PCR utilizando o oligonucleotídeo iniciador BOX-A 1R

Os perfis dos produtos de amplificação do DNA dos isolados bacterianos em estudo, com o oligonucleotídeo iniciador BOX-A 1R, apresentaram bastante eficiência na produção de bandas polimórficas, inclusive dentro do mesmo gênero (Figura 1). Para esta análise, utilizou-se DNA previamente purificado e quantificado e os dados obtidos foram utilizados para a confecção de uma matriz binária, sendo que para a análise do agrupamento foi utilizado o algoritmo *Neighbor-Joining*, através do programa *Free-Tree* (PAVLICEK et al., 1999).

Para efetuar a diferenciação entre os isolados de cada espécie florestal deste estudo, as avaliações foram baseadas na análise da região conservada BOX-A 1R, presentes em vários gêneros bacterianos e foram efetuadas com base no perfil de bandas em gel de agarose 2 %, conforme observado na Figura 1.

O BOX-A 1R se mostrou eficiente na discriminação dos isolados por amplificar diferentes perfis de bandas; entretanto, algumas bactérias do gênero *Burkholderia* se agruparam ou mesmo se mostraram com o mesmo perfil de bandas no gel. HUNGRIA et al. (2008) sugerem que pode-se obter, em caso de necessidade de comprovação de identidade, os perfis de ERIC-PCR ou REP-PCR através dos oligonucleotídeos iniciadores REP 1R – REP 2I e ERIC 1r – ERIC 2, descritos por VERSALOVIC et al. (1994).

Os dendrogramas foram construídos com os isolados de cada espécie arbórea, permitindo assim a comparação com os resultados do sequenciamento do gene 16S rRNA.



**Figura 1.** Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA genômico com o oligonucleotídeo iniciador BOX-A 1R em gel de agarose 2%: 1-Pn1; 2-Pn2; 3-Pn3; 4-Pn4; 5-Pn5; 6-Pn6; 7-Pn7; 8-Pn8e; 9-Pn9e; 10-Ah1; 11-Ah2; 12-Ah3; 13-Ah5; 14-Ah6; 15-Ah7e; 16-Ah8e; 17-CI2; 18-CI3; 19-CI4; 20-CI5; 21-CI6e; 22-Sa2; 23-Sa3; 24-Sa4; 25-Sa5e; 26-Sa6e; 27-Sa7e; 28-CI7e e (P) – padrão 1 Kb DNA *ladder* (Fermentas<sup>®</sup>)

#### 4.4 Filogenia dos isolados baseada nos marcadores 16S rDNA e BOX-A 1R

Os dendrogramas de cada espécie arbórea dos marcadores 16S rDNA e BOX-A 1R foram construídas e comparadas entre si, classificando cada microrganismo a nível de gênero e algumas a nível de espécie.

Os resultados apresentados nas Figuras 2, 4, 6 e 8, mostram que o sequenciamento do gene 16S rRNA possibilitou a separação a nível de gênero e de espécies próximas, entretanto não diferenciou isolados de uma mesma espécie, coincidindo com os resultados obtidos por COENYE et al. (2005). Como pode-se

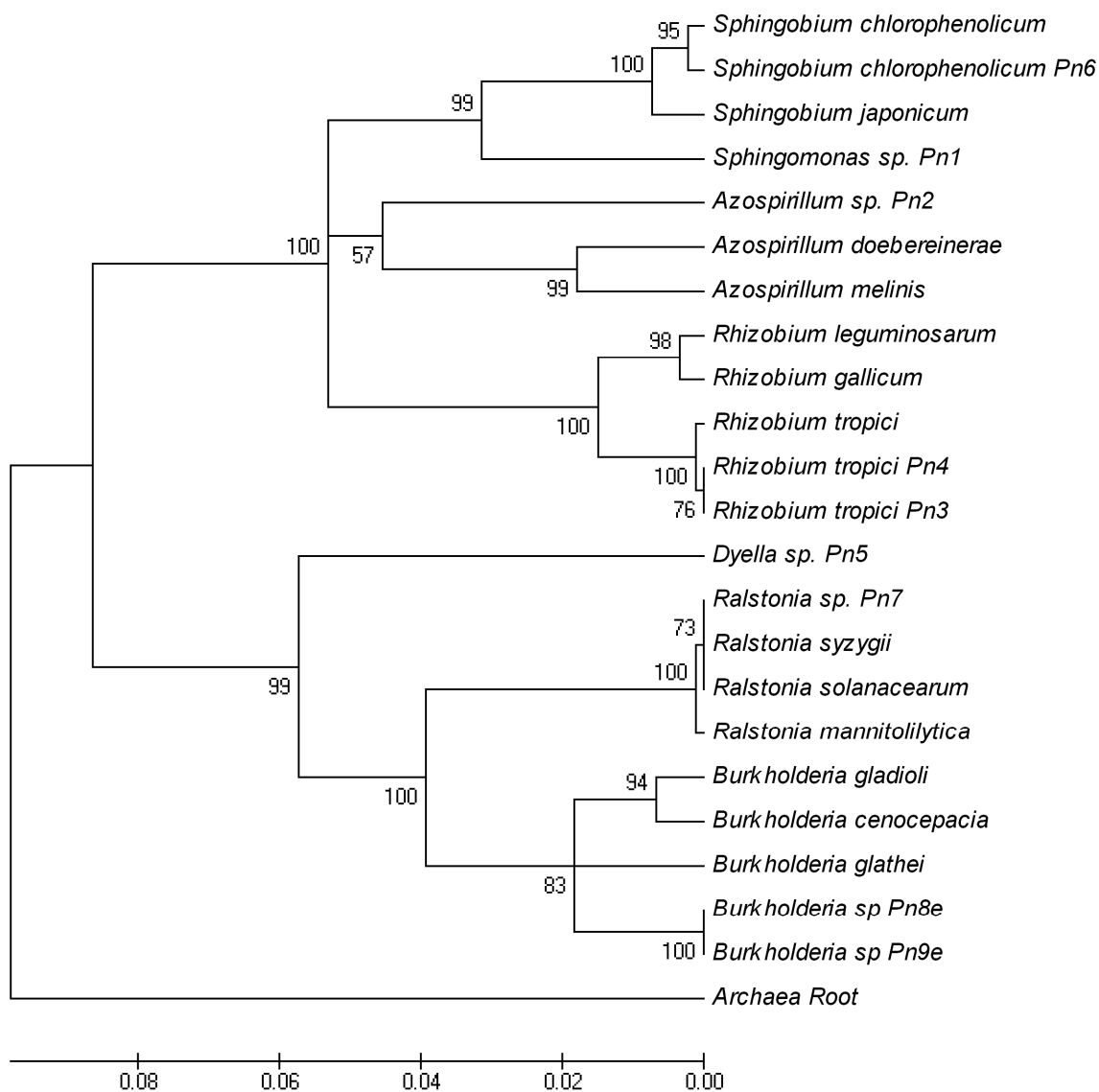
observar, todas as bactérias isoladas das leguminosas florestais estudadas se agruparam em nível de gênero com as bactérias dos bancos de dados NCBI.

Por outro lado as árvores filogenéticas construídas a partir do perfil eletroforético de bandeamento (Figura 1), separam as *Burkholderias* isoladas de *Albizia hasslerii* (Figura 5) e *Copaifera langsdorffii* (Figura 7) e agruparam as duas *Burkholderias* Pn8e e Pn9e (Figura 3), mostrando que provavelmente sejam a mesma bactéria.

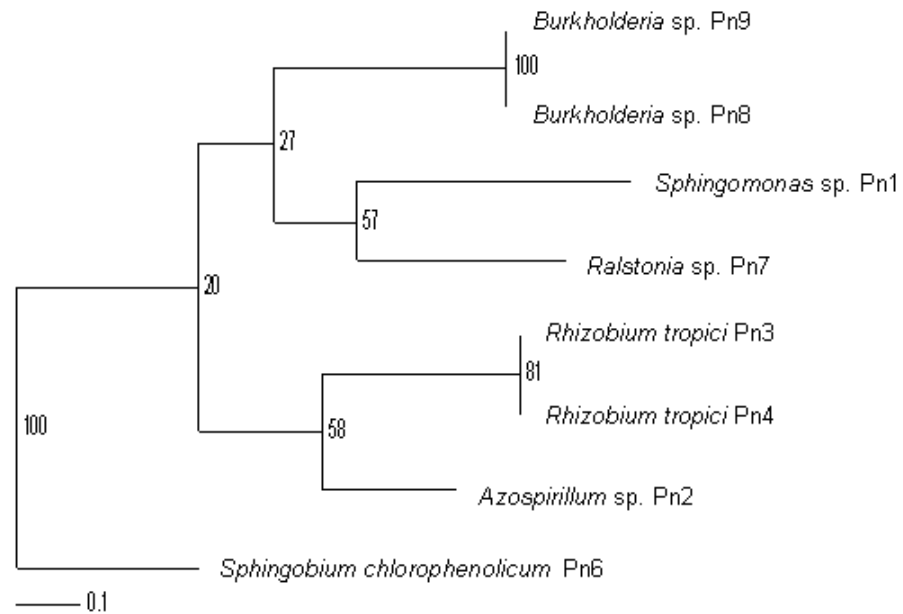
Os isolados Pn3 e Pn4 (Figura 3) classificados como *Rhizobium tropici* podem ser diferentes devido a porcentagem de similaridade de 81%.

GONZÁLEZ (2008) verificou que o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA foi pouco adequado para o agrupamento a nível de espécie, das estirpes *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a utilização de *primers* internos é bastante eficiente, possibilitando para quase todos os isolados o sequenciamento quase completo do gene 16S rRNA.

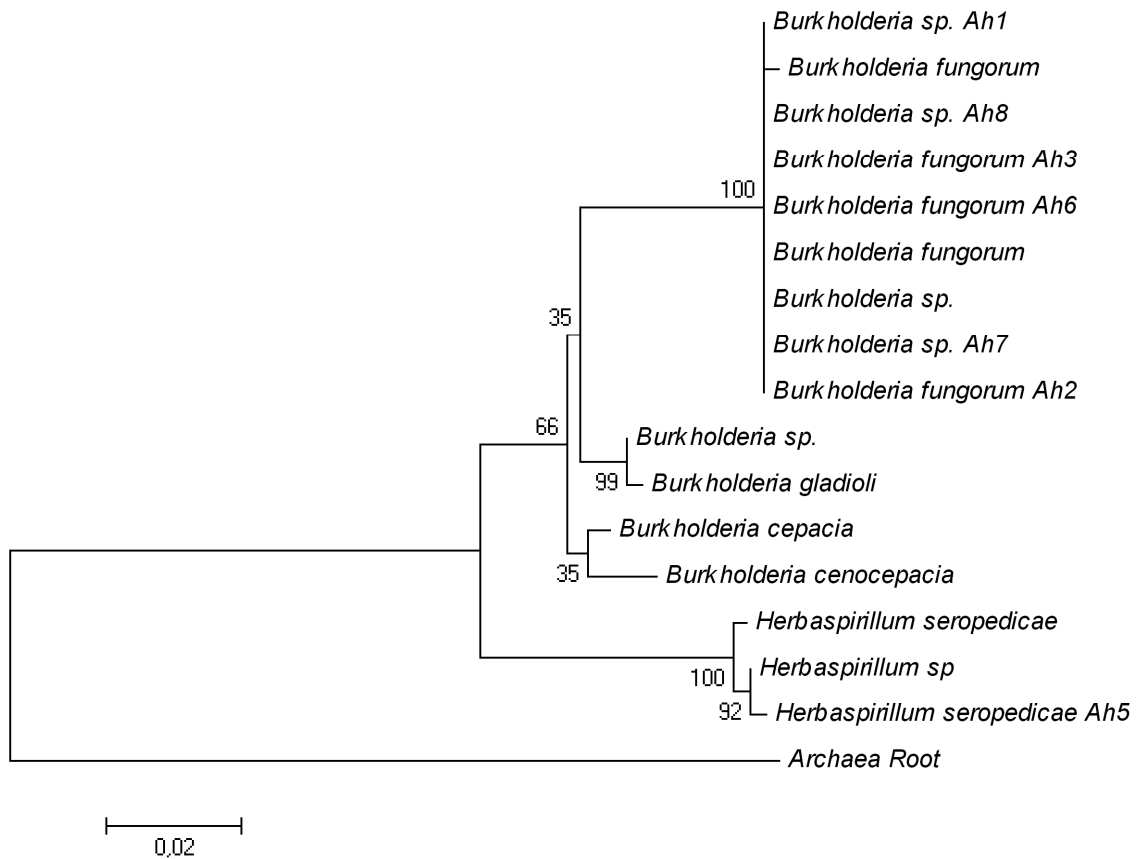
Também deve-se levar em conta que os isolados deste trabalho, eram completamente desconhecidos e por isso recomenda-se sequenciar a maior parte possível do gene 16S rRNA para a comparação com o banco de dados GenBank, devido a possibilidade de encontrar microrganismos pouco estudados e conseqüentemente com poucas sequências depositadas neste banco de dados. Já com os microrganismos estudados por GONZALEZ (2008), MENNA et al. (2006) e DE TOLEDO, et al. (2009), *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* isto não ocorre, já que são amplamente estudados por serem microrganismos fixadores de N<sub>2</sub> e com inúmeras sequências depositadas no banco de dados.



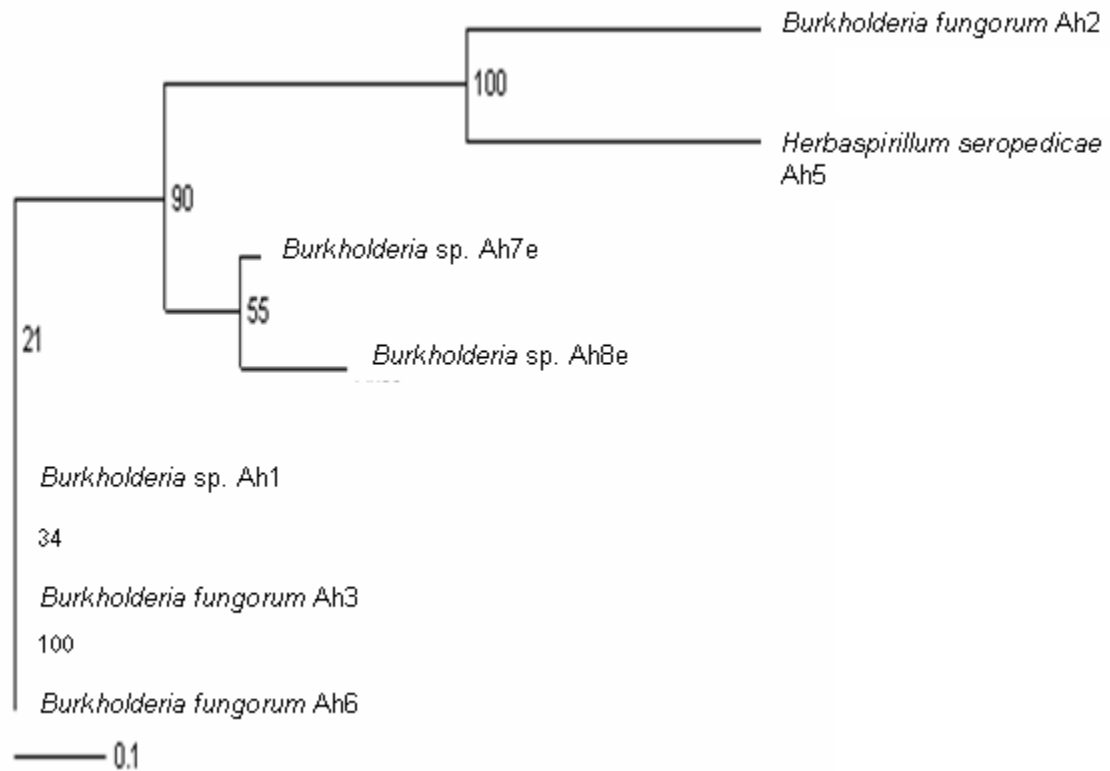
**Figura 2.** Dendrograma baseado na sequência do gene 16S rRNA, mostrando as posições filogenéticas dos isolados da espécie arbórea *Pterogyne nitens* em relação às sequências já depositadas em banco de dados. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.



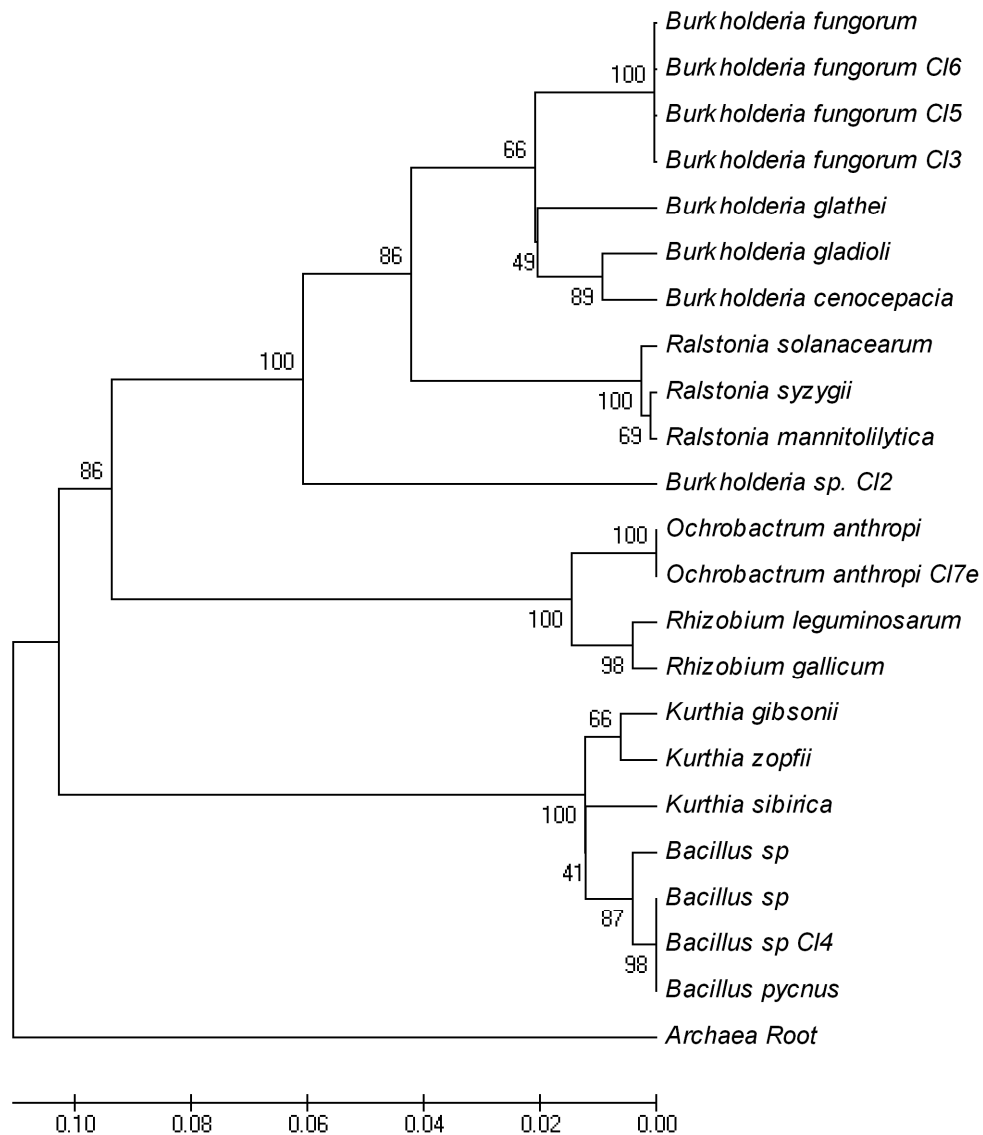
**Figura 3.** Dendrograma do agrupamento hierárquico baseado na sequência repetitiva BOX-A 1R mostrando as posições taxonômicas dos isolados de *Pterogyne nitens*, obtido pelo método *Neighbor-Joining*, com bootstrap de 1.000 vezes. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.



**Figura 4.** Dendrograma baseado na sequência do gene 16S rRNA, mostrando as posições filogenéticas dos isolados da espécie arbórea *Albizia hasslerii* em relação às sequências já depositadas em banco de dados. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

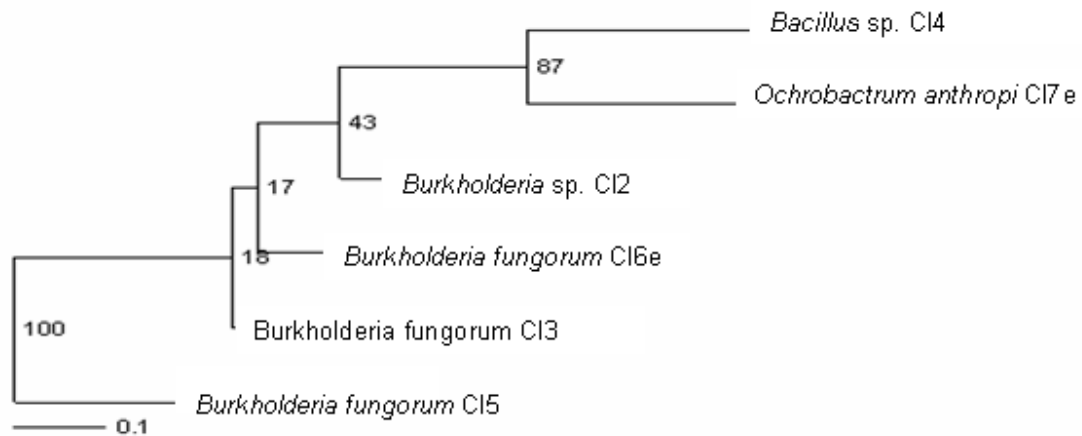


**Figura 5.** Dendrograma do agrupamento hierárquico baseado na sequência repetitiva BOX-A 1R mostrando as posições taxonômica dos isolados de *Albizia hasslerii*, obtido pelo método *Neighbor-Joining*, com bootstrap de 1.000 vezes. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

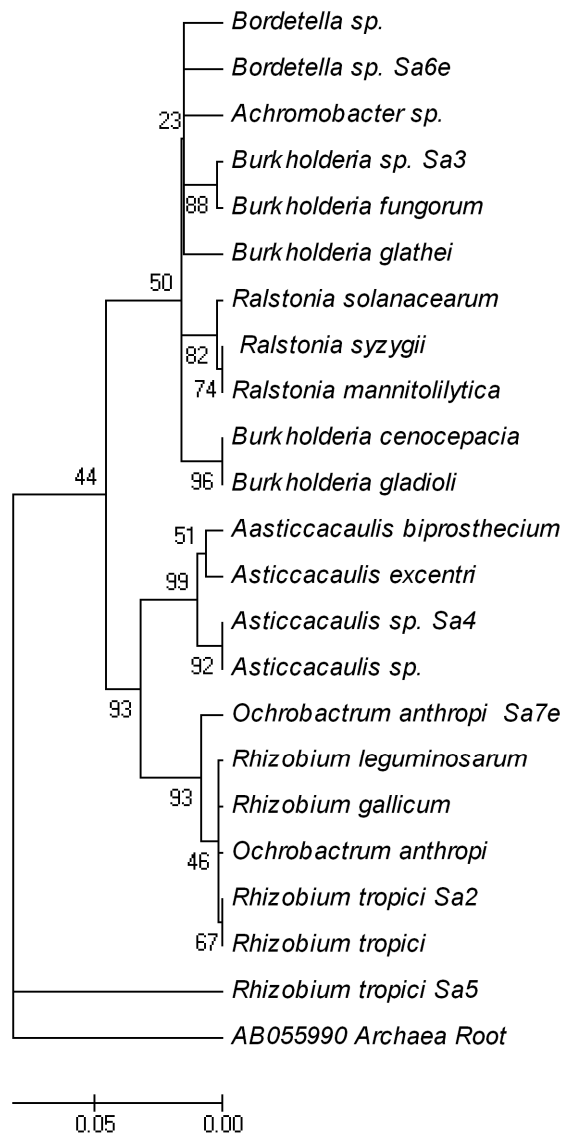


**Figura 6.** Dendrograma baseado na sequência do gene 16S rRNA, mostrando as posições filogenéticas dos isolados da espécie arbórea *Albizia hasslerii* em relação às sequências já depositadas em banco de dados. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

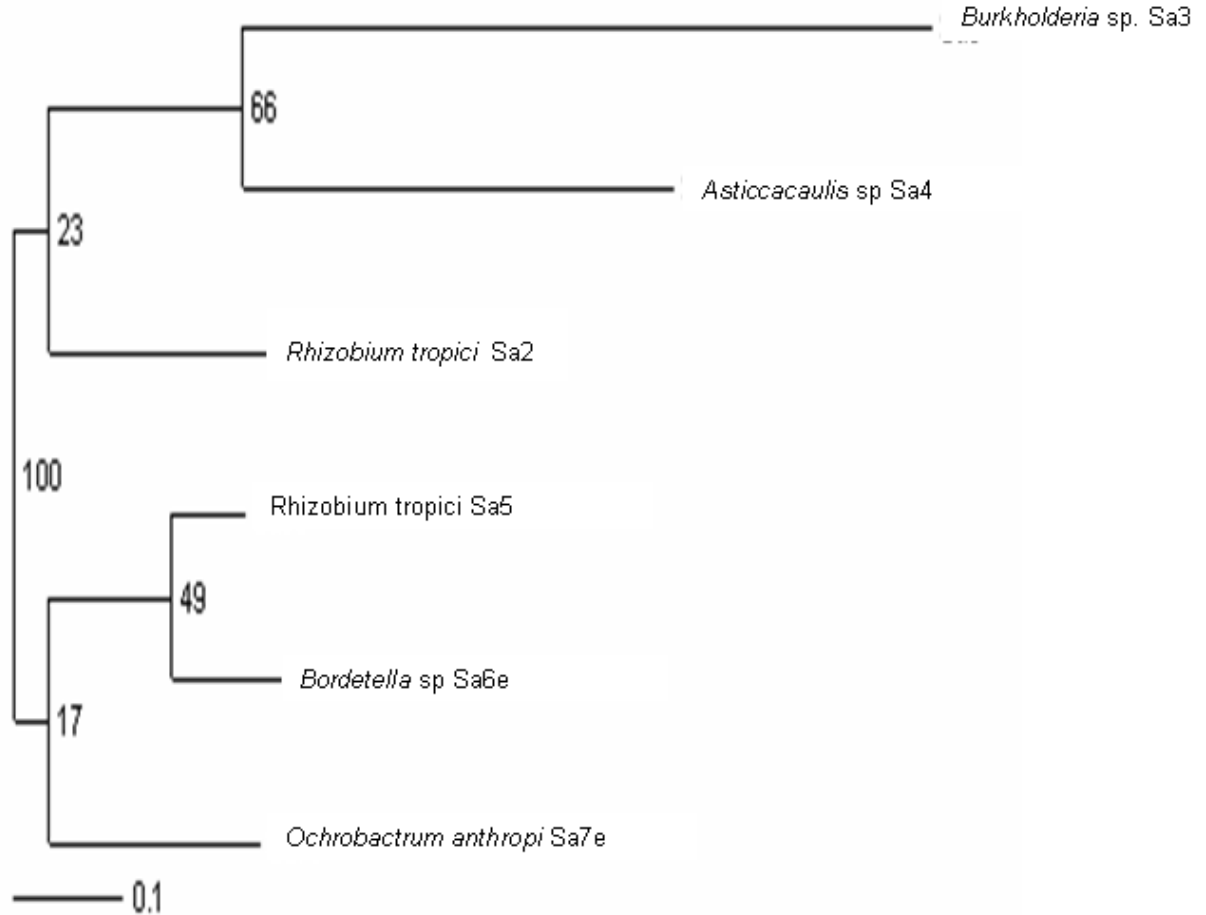




**Figura 7.** Dendrograma do agrupamento hierárquico baseado na sequência repetitiva BOX-A 1R mostrando as posições taxonômicas dos isolados de *Copaifera langsdorffii*, obtido pelo método *Neighbor-Joining*, com bootstrap de 1.000 vezes. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.



**Figura 8** Dendrograma baseado na sequência do gene 16S rRNA, mostrando as posições filogenéticas dos isolados da espécie arbórea *Striphnodendron adstringens* em relação às sequências já depositadas em banco de dados. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.



**Figura 9.** Dendrograma do agrupamento hierárquico baseado na sequência repetitiva BOX-A 1R mostrando as posições taxonômicas dos isolados de *Striphnodendron adstringens*, obtido pelo método *Neighbor-Joining*, com bootstrap de 1.000 vezes. Os números internos representam a porcentagem de vezes em que foi possível reconstruir o agrupamento em questão. A régua é a distância de similaridade do agrupamento em questão.

#### 4.5 Determinação colorimétrica do Ácido Indolacético (AIA)

Dos 29 isolados, das quatro espécies florestais, somente os isolados de *Pterogyne nitens* (Tabela 3) apresentaram resultados satisfatórios para a produção de AIA e destes somente os isolados rizosféricos. O isolado Pn6 *Sphingobium chlorophenolicum* (Tabela 4) foi o que teve melhor resultado, 61,69  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA com o acréscimo de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de triptofano. TSAVKELOVA et al. (2005) obtiveram 50,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA na mesma concentração de triptofano, produzidos por *Sphingomonas* sp. isolada de uma espécie de orquídea.

XIE et al. (1996) obtiveram valores entre 2,0 e 8,28  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA produzido por bactérias isoladas de solo do ártico, VERMA & LADHA (2001) encontraram resultados entre 0,16 e 0,70  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de AIA em isolados endofíticos de sementes de arroz irrigado na Índia, com suplementação de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de triptofano. DA SILVEIRA (2008), obteve valores mais altos para os isolados selvagens de cultivares de arroz, de 9,8 a 29,36  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , suplementando o meio de cultivo DYGS com triptofano na concentração de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Todos os experimentos de obtenção de AIA citados, foram feitos usando o método colorimétrico *in vitro*.

Após o processo de isolamento e armazenamento das bactérias, as mesmas foram crescidas em meio DYGS com suplemento de triptofano. Apesar deste meio de cultura possuir em seu componente o extrato de levedura, que é uma fonte rica de aminoácidos, principalmente o triptofano, a adição deste precursor promove o aumento de síntese do AIA. CHAGAS JUNIOR (2007) concluiu que a melhor dose de triptofano como precursor da produção de AIA, para o cultivo de bactérias do gênero *Rhizobium*, foi de 150  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  enquanto que, TSAVKELOVA et al. (2005), em isolados bacterianos obtidos do rizoplaneo de orquídeas, constataram que maior concentração de triptofano (200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) na cultura bacteriana, produziu maior concentração deste hormônio.

**Tabela 3.** Resultados de produção de AIA (Ácido indol acético) e Índice de Solubilização de fosfato pelos isolados rizobacterianos de *Pterogyne nitens* (Pn), *Albizia hasslerii* (Ah), *Copaifera langsdorffii* (Cl) e *Stryphnodendron adstringens* (Sa).

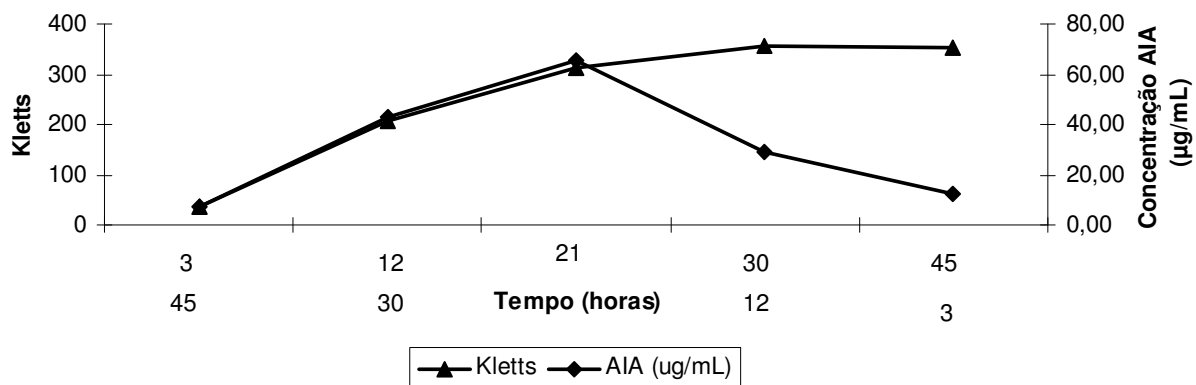
Isolado	BLAST	Produção de	Índice de
	Descrição	AIA	solubilização de fosfato
Pn1	<i>Sphingomonas</i> sp.	+	+
Pn2	<i>Azospirillum</i> sp.	-	+
Pn3	<i>Rhizobium tropici</i>	+	+
Pn4	<i>Rhizobium tropici</i>	+	+
Pn5	<i>Dyella</i> sp.	+	-
Pn6	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	+	+
Pn7	<i>Ralstonia</i> sp.	-	+
Pn8e	<i>Burkholderia</i> sp.	-	+
Pn9e	<i>Burkholderia</i> sp.	-	+
Ah1	<i>Burkholderia</i> sp.	-	+
Ah2	<i>Burkholderia fungorum</i>	-	+
Ah3	<i>Burkholderia fungorum</i>	-	+
Ah4	não identificado	-	+
Ah5	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	-	+
Ah6	<i>Burkholderia fungorum</i>	-	+
Ah7e	<i>Burkholderia</i> sp.	-	+
Ah8e	<i>Burkholderia</i> sp.	-	+
Cl2	<i>Burkholderia</i> sp.	-	+
Cl3	<i>Burkholderia fungorum</i>	-	+
Cl4	<i>Bacillus</i> sp.	-	+
Cl5	<i>Burkholderia fungorum</i>	-	+
Cl6e	<i>Burkholderia fungorum</i>	-	+
Cl7e	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	-
Sa2	<i>Rhizobium tropici</i>	-	+
Sa3	<i>Burkholderia</i> sp.	-	+
Sa4	<i>Asticcacaulis</i> sp.	-	+
Sa5e	<i>Rhizobium tropici</i>	-	+
Sa6e	<i>Bordetella</i> sp.	-	+
Sa7e	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	-	+

(-) resultado negativo e (+) resultado positivo

**Tabela 4.** Isolados de *Pterogyne nitens* com maior quantidade de AIA no cultivo de 24h e suplementação de triptofano com concentração de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Isolado	Classificação	AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
Pn 1	<i>Sphingomonas</i> sp.	5,33
Pn 3	<i>Rhizobium tropici</i>	7,47
Pn 4	<i>Rhizobium tropici</i>	0,38
Pn 5	<i>Dyella</i> sp.	2,05
Pn 6	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	61,69

O isolado Pn 6 (*Sphingobium chlorophenolicum*) produziu maior quantidade de AIA na fase exponencial (Figura 10) e quando atingiu a fase estacionária de crescimento, houve uma queda acentuada. CERIGIOLI (2005), constatou que o AIA bacteriano é obtido na fase estacionária do desenvolvimento desse microrganismo, pois é um metabólito secundário, entretanto, a duração de cada fase depende da espécie estudada.



**Figura 10.** Curva de crescimento e concentração do AIA do isolado Pn 6 *Sphingobium chlorophenolicum*, nos tempos 3h, 12h, 21h, 30h e 45h

Bactérias diazotróficas produtoras de AIA podem desempenhar um papel fundamental na promoção de crescimento das plantas, principalmente nos primeiros

estágios de desenvolvimento, e no processo de enraizamento. Sabe-se que esse estímulo é dependente da dosagem do hormônio, pois o excesso dele pode retardar ou até inibir o crescimento do vegetal (VANDE BROEK et al., 1999).

#### 4.6 Seleção de isolados solubilizadores de fosfato

Diferentemente do que ocorreu com os isolados produtores de AIA, onde somente isolados rizosféricos de *Pterogyne nitens* apresentaram resultados positivos, com o teste de solubilização de fosfato inorgânico em Placas de Petri, os resultados foram positivos nos isolados rizosféricos e endofíticos de *Pterogyne nitens*, *Albizia hasslerii* e *Copaifera langsdorffii*, apresentando o halo de solubilização em volta da colônia bacteriana.

O sequenciamento do gene 16S rRNA destes isolados, constatou-se que os solubilizadores de fosfato com índice de solubilização (IS) alto, maior que 3, são do gênero *Burkholderia*, que são citados na literatura como eficientes solubilizadores de fosfato (SONG et al., 2008).

Dos 29 isolados, apenas 2 não apresentaram o halo de solubilização em volta da colônia bacteriana (Tabela 2 e Tabela 5).

**Tabela 5.** Avaliação da capacidade de solubilização em meio NBRIP sólido

Isolado	NCBI (Blast) Descrição	IS=( $\varnothing$ halo/ $\varnothing$ colônia).100 (mm) em 15 dias
Pn1	<i>Sphingomonas</i> sp.	0,89 def
Pn2	<i>Azospirillum</i> sp.	0,56 ef
Pn3	<i>Rhizobium tropici</i>	1,68 abcdef
Pn4	<i>Rhizobium tropici</i>	1,72 abcdef
Pn5	<i>Dyella</i> sp.	0,00 f
Pn6	<i>Sphingobium chlorophenolicum</i>	1,20 cdef
Pn7	<i>Ralstonia</i> sp.	1,79 abcdef
Pn8e	<i>Burkholderia</i> sp.	3,83 ab

Isolado	NCBI (Blast) Descrição	IS=(Øhalo/Ø colônia).100 (mm) em 15 dias
Pn9e	<i>Burkholderia</i> sp.	3,58 abc
Ah1	<i>Burkholderia</i> sp.	3,30 abcd
Ah2	<i>Burkholderia fungorum</i>	2,42 abcdef
Ah3	<i>Burkholderia fungorum</i>	3,11 abcde
Ah4	não identificado	2,11 abcdef
Ah5	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	1,46 abcdef
Ah6	<i>Burkholderia fungorum</i>	3,37 abcd
Ah7e	<i>Burkholderia</i> sp.	3,23 abcd
Ah8e	<i>Burkholderia</i> sp.	3,06 abcde
Cl2	<i>Burkholderia</i> sp.	3,54 abc
Cl3	<i>Burkholderia fungorum</i>	2,85 abcde
Cl4	<i>Bacillus</i> sp.	2,57 abcdef
Cl5	<i>Burkholderia fungorum</i>	3,86 a
Cl6e	<i>Burkholderia fungorum</i>	3,32 abcd
Cl7e	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,00 f
Sa2	<i>Rhizobium tropici</i>	1,22 bcdef
Sa3	<i>Burkholderia</i> sp.	0,56 ef
Sa4	<i>Asticcacaulis</i> sp.	2,11 abcdef
Sa5e	<i>Rhizobium tropici</i>	1,26 abcdef
Sa6e	<i>Bordetella</i> sp.	2,19 abcdef
Sa7e	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	0,50 ef

Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si a 5% a de probabilidade pelo teste de Tukey

SOUCHIE et al. 2005, avaliaram o efeito de bactérias solubilizadoras de fosfato (BSF) na formação de mudas de arbóreas nativas em viveiro. A população inoculada de bactérias solubilizadoras decresceu durante a formação de mudas. Por outro lado, a inoculação dessas bactérias foi benéfica para formação de mudas de *Anadenanthera macrocarpa*, *Mimosa caesalpiniiifolia* e *Acacia holosericea*.

Deve-se ressaltar que os experimentos desse trabalho foram realizados em condições que não ocorreram qualquer interferência ambiental, ou seja, os microrganismos não ficaram expostos a diversos fatores existentes no solo ou competições com outros organismos, entretanto os isolados Pn1, Pn3, Pn4, Pn5, Pn6,



Pn8, Pn9, Ah1, Ah3, Ah6, Ah7e, Ah8e, Cl2, Cl5 e Cl6e podem ser consideradas bactérias candidatas a RPCPs e serem usadas futuramente em combinações entre elas, como inoculantes para produção de mudas florestais. Outras investigações devem ser realizadas, observando o comportamento dessas bactérias aplicadas diretamente nas mudas de arbóreas e posteriormente no campo.

## 5 CONCLUSÕES

- 28 isolados foram caracterizados em nível de gênero e 14 em nível de espécie pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, confirmando a eficácia do uso dos *primers* internos e externos sequenciando quase que completamente o gene.

- O uso do marcador BOX-A 1R apresentou perfil de bandejamento bastante distinto, permitindo a diferenciação entre espécies de um mesmo gênero.

- A avaliação *in vitro* dos isolados das quatro espécies florestais nativas, mostrou que os isolados de *Pterogyne nitens* apresentaram melhores resultados para produção de AIA, principalmente o isolado Pn 6 que foi classificado como *Sphingobium chlorophenolicum*

- 93% dos isolados de *Pterogyne nitens*, *Albizia hasslerii*, *Copaifera langsdorffii* e *Stryphnodendron adstringens*, foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico em meio sólido NBRIP e 34% dos isolados apresentaram IS>3 (alta), sendo que estes foram classificados dentro do gênero *Burkholderia*.

## 6 REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMAN, D.J. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.

ANTOUN, H., BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.) **Plant and soil**. 204: 57-67, 1998.

ASGHAR H. N. et al. Relationship in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. **Biology and Fertility of Soils**. 35: 231-237, 2002.

ATLAS, M.; BARTHA, R. Microbial evolution and biodiversity. In: ATLAS, M.; BARTHA, R. **Microbial ecology**. Menlo Park: Benjamin/Cummings Science, P.27-57, 1998.

BARBIERI, P., ZANELLI, T., GALLI, E. & ZANELLI, G. Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense* Sp6 and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, 36: .87-90, 1986.

BARBOSA, J.C., MALDONADO JUNIOR, W. **AgroEstat** - Sistema para Análises Estatística de Ensaio Agronômicos, versão 1.0.,2008.

BARRIUSO, J, PEREYRA, M.T., LUCAS GARCÍA, J.A., MEGÍAS, M., GUTIERREZ MAÑERO, F.J.& RAMOS, B. Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus-Pinus* sp. **Microbial Ecology**. 50:82-89, 2005.

BERRAQUEIRO, F.R.; BAYA, A.M. & CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **ARS Farmacéutica**, Granada, v.17, p.399-406,1976.

BISWAS et al. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of Lowland rice. **Soil Scientific Society American**. 64: 1644-1650, 2000.

BORNEMAN, J. et al. Molecular microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n. 7, p. 2647-53, 1997.

CANHOS, V.P. et al. Diversidade no domínio bactéria. In: CANHOS, V.P. et al. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX**. São Paulo: FAPESP, 1997. P.1-13.

CARAVACA, F.; BAREA, J. M.; FIGUEROA, D.& ROLDAN, A. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing reforestation with *Olea europaea* subs *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. **Applied Soil Ecology**, 20: 107-118, 2002.

CARVALHO, P.S.P.; TAGLIAVINI, D.G. & TAGLIAVINI, R.L. Cicatrização cutânea após a aplicação tópica de creme de calêndula e de associação de confrei, própolis e mel em feridas infectadas: Um estudo clínico e histológico em ratos. **Revista de Ciências Biomédicas**, v.12, p.39-50, 1991.

CARVALHO, P.E.R., **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo: EMBRAPA - CNPF, 1994. 640p.

CERIGIOLI, M. M. Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. São Carlos, SP, Universidade Federal de São Carlos, 2005, 132p. (Tese de Doutorado)

CHABOT, R. et al. Root colonization of Maize and Lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2767-2772, 1996.

CHAGAS JUNIOR, A. F. Características agronômicas e ecológicas de rizóbios isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. Manaus, AM, Universidade Federal do Amazonas, 2007, 158p. (Tese de Doutorado)

CHANWAY, C.P. Differential response of western hemlock from low and high elevations to inoculation with plant growthpromoting *Bacillus polymyxa*. **Soil Biol. Biochem.**, 27:767-775, 1995.

CHIARINI, L., BEVIVINO, A., DALMASTRI, C., NACAMULLI, C. & TABACCHIONE, C. Influence of plant development cultivar and soil type on microbial colonization of maize roots. **Applied Soil Ecology**, 8: 11-18, 1998.

CHOUDHURY, A.T.M.A. & KENNEDY I.R. Prospects and potentials for systems of biological nitrogen fixation in sustainable rice production. **Biology and Fertility of Soils**, 39: 219-227, 2004.

COENYE, T., GEVERS, D., VAN DE PEER, Y., VANDAME, P., SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.29, p.147-167, 2005.

COENYE, T., VANDAMME, P. Diversity and significance of Burkholderia species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**. v.5, p.719-729. 2003.

CRIVOS, M.; MARTINEZ, M. R.; POCHETTINO, M. L.; REMORINI, C.; SY, A.; TEVES, L.; **J. Ethnobiology Ethnomedicine** 2007, 2, 1.

CULLEN, D.W.; HIRSCH, P.R. Simple and rapid method for direct extration of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology and Biochemistry**, Exeter, v. 30, nº 8/9, p. 983-993, 1998.

DAKORA, F. D. & PHILLIPS, D. A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environments. **Plant and Soil**, 245 :35-47, 2002.

DAMS, R.I.; PATON,G.I. & KILLHAM, K. Rhizoremediation of pentachlorophenol by *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC39723. **Chemosphere** v.68 p. 864-870, 2007.

DA SILVEIRA, E.L. Identificação de comunidades bacterianas de solo por sequenciamento do gene 16S rDNA. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 2004. 75p (Dissertação de mestrado)

DA SILVEIRA, E. L. Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva. (Tese de Doutorado em Microbiologia Agropecuária). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2008.

DASHTI N. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean (*Glycine max* L. Merr) under short season conditions. **Plant and Soil**, 200: 205-213, 1998.

DE TOLEDO, B.F.B., MARCONDES, J.& LEMOS, E.G.M. Caracterização de rizóbios indicados para produção de inoculantes por meio de sequenciamento parcial do 16S rRNA. **Pesq. agropecuária bras.**, Brasília, v.44, n.4, p.384-391, 2009.

DÖBEREINER J.; BALDANI, V.L.D; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CNPAB, 1995, 60p.

DOJKA, M.A. Microbial diversity in a Hydrocarbon-and chlorinated-solvent contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, n.10, p. 3869-3877, 1998.

DROZDOWICZ, A. Bactérias de solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados** .Planaltina: Embrapa/CPAC, 1997. p. 17-66.

EL-KHAWAS, H. & ADACHI, K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiela* and their effect on rice roots. **Biology and Fertility of Soils** . 28: 377-381, 1999.

EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185. 1998.

FELFILI, J.M., FILGUEIRAS, T.S., HARIDASAN, M., SILVA JÚNIOR, M.C., MENDONÇA, R. & REZENDE, A.V. Projeto biogeografia do bioma cerrado: Vegetação e solos. **Cad. Geo. IBGE** 12: 75-166, 1994.

FELFILI, J.M. & SILVA JÚNIOR, M.C. A comparative study of cerrado (*sensu stricto*) vegetation in central Brazil. **J. Trop. Ecol.** 9: 277-289, 1993.

FELFILI, J.M., SILVA JÚNIOR, M.C., REZENDE, A.V., MACHADO, J.W.B., WALTER, B.M.T., SILVA, P.E.N. & HAY, J.D. Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação arbórea do cerrado *sensu stricto* da Chapada Pratinha, Brasil. **Acta bot. bras.** 6: 27-46, 1993.

FOHSE, D.; CLAASSEN, N.& JUNGK, A. Phosphorus efficiency of plants. I. External and internal P requirement and P uptake efficiency of different plant species. **Plant and Soil**, The Hague, v.110, p.101-109, 1988.

GARG,S.K.; BHATNAGAR, A.; KALLA, A.; NARULA, N. In vitro fixation, phosphate solubilization, survival and nutrient release by *Azotobacter* strains in aquatic system. **Bioresource Technology**, Fayettevill, v.80, p.101-109, 2001.

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the Manual. In: GARRITY, G.M.; BOONE, D.R.;CASTENHOLZ, R.W. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2.ed. New York: The Williams & Wilkins/Springer-Verlag, p.119-154, 2001.

GARRITY, G.M.; BELL, J.A.; LILBURN, T.G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Second Edition. New York, Springer-Verlag, 2004.

GIRI, B. & MUKERJI, K. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress In: *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. **Mycorrhiza**, New York, 14: 307-312, 2004.

GONZÁLEZ, T.O. Caracterização, diversidade genética e nodulação em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) de isolados de rizóbios do Brasil e da Venezuela. 2008.72f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

GORDON, D.;ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, v.8, p. 195-202, 1998.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, Rockville Pike, 26: 192-195, 1951.

GORIS, J.; VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E.; QUENSEN, J. F.; TIEDJE, J.M. & VANDAMME, P. Classification of the PCB-and biphenil-degrading strain LB400 and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.1677-1681, 2004.

GRAY, E.J. & SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry** 37: 395-412, 2005.

GREEN, H.; LARSEN, J.; OLSSON, P. A.; JENSEN, D. F. & JACOBSEN, I. Suppression of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* by mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in toot-free soil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington , 65: 1428-1434, 1999.

GYANESHWAR et al. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**. 183: 2634-2645, 2001.

GYANESHWAR, P.; KUMAR, G.N., PAREKH, L.J., POODEL, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 245, p.83-93, 2002.

HARTMANN, A., SINGH, M & KLINGMÜLLER, M. Isolation and characterization of Azospirillum mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. **Canadian Journal of Microbiology** 29: 916-923, 1983.

HULTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, p.825-762, 1991.

HUNGRIA, M.; MENNA, P.; BANGEL E.V.; BARCELLOS, F.G.; GRANGE, L.; PINTO, F.G.S.; RIBEIRO, R.A.; BATISTA, J.S.S.; BINDE, D.R.; PLOTTEGHER, F.; KASCHUK, G.; ALBERTON, A.; LOUREIRO, M.F.; CAMPO, R.J.; CHUEIRE, L.M.O. Identificação das metodologias mais adequadas para a análise da diversidade genética intra e interespecífica em rizóbios. In: RELARE, 14, 2008, Bonito: **Embrapa Agropecuária Oeste**, 2008. p.12.



IGUAL, J.M.; VALVERDE, A.; CERVANTES, E.; VELÁSQUEZ, E. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of update molecular techniques in their study, **Agonomie**, Montpellier, v.21, p.561-568, 2001.

KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. **Annual Review Microbiology**, Palo Alto, v.56, p. 211- 36, 2002.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v.5, .p.408-418, 1995.

KOKALIS-BURELLE et al. Plant growth promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous microorganisms. **Applied Soil Ecology**. 31: 91-100, 2006.

KUSKE, C. R. et al. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, n.09, p. 3614-3621, 1997.

KUSS, A.V. et al. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42: 1459-1465, 2007.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; McGETTIGAN, P. A.; McWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J. & HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007

LEBUHN, M; HARTMANN, A. Method for the determination of indole-3-acetic acid and related compounds of L-tryptohan catabolism in soils. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.629, p.255-266, 1993.

LEGENDRE, L.; LEGENDRE, P. Numerical ecology. New York: **Elsevier**, 1983. 419 p

LEITE, A.M.C., SALOMÃO, A.N. Estrutura populacional de copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) em mata ciliar do Distrito Federal. **Acta Botanica Brasílica**, 6: 123-134,1992.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa, Editora Plantarum, 2000, 352 p.

LORENZI H.& MATOS F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil:nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum, 2002.

LUDWIG, W. et al. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. **FEMS Microbiology Lettles**, Amsterdam, v.153, n.1, p. 181-90, 1997.

MACEDO M. & FERREIRA A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Rev Bras Farmacogn** 14 (Supl. 1): 40-44, 2004.

MACHADO, J.W.B. Relação origem/solo e tolerância à saturação hídrica de *Copaifera langsdorffii* Desf.. Campinas, SP, Universidade Estadual de Campinas, 1990, 96p. (Tese de doutorado)

MACRAE, A. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, p. 77-82, 2000.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., FERREIRA, E.M. & SIQUEIRA, L Efeito de rizobactérias sobre o enraizamento e crescimento de clones de eucalipto em diferentes condições de propagação clonal. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v.31, n.5, p.813-821, 2007.

MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZIE.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.;MORRISON D.A.; BOULNOIS G.J.; CLAVERYYS J.P.A highly conserved repeated DNA elementlocated in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3479–3483, 1992.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v.5,p.1105-1107, 1999.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL. E.V.; HESS. P.N., MARTINES-ROMERO, E. Molecular phylogeny base don the 16S rRNA gene of eleite rhizobial starins used in Brazilian comercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, Munich, v.29, p. 315-322, 2006.

MINERDI, D., FANI, R., GALLO, R., BOARINO, A. & BONFANTE, P. Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic Burkholderia strain. **Applied and Environmental Microbiology** v.67, p. 725–732, 2001.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. Rizosfera In: MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2ª edição atualizada e ampliada. Lavras, Editora UFLA, 2006. p 407-447.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, 170: 265-270, 1999.

NUNES, G. P., SILVA M. F., RESENDE, U.M., SIQUEIRA, J. M. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Rev Brás Farmacogn** 13: 83-92, 2003.

ONA, O. et al. Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. **FEMS Microbiology Letters** 246: 125-132, 2005.

PAVLICEK A., HRDA S, FLEGR J.: FreeTree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. **Folia Biologica** (Praga) 45, 97-99, 1999.

PEREIRA, P.A.A. & BLISS, F.A. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N<sub>2</sub> fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally-controlled conditions. **Plant and Soil** v.115, p. 75–82. 1989

PEREIRA, R.M.; DA SILVEIRA, E.L.; CARARETO-ALVES, L.M. & LEMOS, E.G.M. Avaliação de populações de possíveis rizobactérias em solos sob espécies florestais. **R. Bras. Ci. Solo**, Viçosa – MG. v.32, p.1921-1927, 2008.

RAO, A. V. & TARAFDAR, J. C. Significance of microorganisms in afforestation programmes in arid zone. **Annals of Arid Zone**, Jodhpur, 37: 337-346, 1998.

RESENDE, J.C., SCHIAVINI, I. & KLINK, C.A. Ecological aspects of a *Copaifera langsdorffii* population in a gallery forest of central Brazil. In: **Proceedings of the International Symposium on Assessment and Monitoring of Forest in Tropical Dry Regions with Special Reference to Gallery Forest** (J.I. Encinas & C. Kleinn, eds.). Universidade de Brasília, Brasília, 1997. p.147-156.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T., SELMAN, G. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbícola* in two rhizobacterial strains. **Journal of Biotechnology**, 84:155-161, 2000.

RODRIGUES NETO, J., MALAVOLTA JUNIOR, V. A. & VICTOR, O. meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, 12: 16, 1986.

RUIZ-LOZANO, J. M.; COLLADOS, C.; BAREA, J. M. & AZCÓN, R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can alleviate drought-induced nodule senescence in soybean plants. **New Phytologist**, Cambridge, 151: 493-502, 2001.

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.,FRITSCH, E.F. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory,1989 . 545p.

SANTOS, S. C., COSTA, W. F., BATISTA, F., SANTOS, L. R., FERRI, P. H., FERREIRA, H. D., SERAPHIN, J. C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Rev Bras Farmacogn** 16: 552-556, 2006.

SCAQUITO, D.C. Diversidade bacteriana em solos sob mata nativa e Eucalyptus sp. Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 2004. 80p. (Dissertação de Mestrado)

SCARPINELLA, G. D. A. Reflorestamento no Brasil e protocolo de Quioto. 78 f. Dissertação (Mestrado em Interunidades em Energia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SCHIAVINI, I. Environmental characterization and groups of species in gallery forest. In: **Proceedings of the International Symposium on Assessment and Monitoring of Forest in Tropical Dry Regions with Special Reference to Gallery Forest** (J.I. Encinas & C. Kleinn, eds.). Universidade de Brasília, Brasília, 1997. p.107-113.

SHISHIDO, M. & CHANWAY, C. P. Colonization and growth promotion of outplanted spruce seedlings pre-inoculated with plant growth promoting rhizobacteria in the greenhouse. **Canadian Journal of Forest Research** 30: 845-854, 2000.

SILVA FILHO, G.N. , VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.24, p.311-319, 2000.

SITTIG, M. Pentachlorophenol. In: Sittig, M. (Ed.), **Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals. Noyes Publications**, Park Ridge, NJ, pp. 525–526, 1981.

SOBRAL, J.K. A comunidade bacteriana endofítica e epifítica de soja (*Glycine max*) e estudo da interação endófitos-planta. 108p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

SONG, O.R., LEE, S.J., LEE, Y.S., LEE, S.C., KIM, K.K., CHOIN, Y.L. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by *Burkholderia cepacia* da23 isolated from cultivated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p.151-156, 2008.

SOUCHIE, E. L. ,CAMPELLO, E. F. C. ,SAGGIN-JUNIOR, O. J.& SILVA, E. M. R.,. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, 35: 329-334, 2005.

STERN, M.J.; AMES, G.F.L.; SMITH, N.H.; ROBINSON, E.C. & HIGGINS, C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v.37, p.1015-1026, 1984.

- TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M. & KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molec. Biol. Evol.*, 24:1596-1599, 2007.
- TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, *Leguminosae*). Araraquara, 115p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. 2002.
- TSAVKELOVA, E. A., CHERDYNTSEVA, T. A. & NETRUSOV, A. I. Auxin production by bacteria associated with orchid roots. **Microbiology** 74: 46-53, 2005.
- VALADARES-INGLIS, M.C.; MELO, I. S. Métodos de extração de DNA e sua aplicação em estudos genéticos e ecológicos. In: MELO, I. S; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. Jaguariúna: Embrapa/CNPMA, 1998. p. 187-204.
- VAN BERKUM, P. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Birkhäuser, v.56, p.729-734, 1999.
- VANDE BROEK, A. Auxins upregulate expression of the indole-3- Pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, Washington, 181: 1338-1342, 1999.
- VEGA-HERNÁNDEZ, M. C., LEON-BARRIOS, M., PÉREZ-GALDONA, R. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*. **Soil Biol. Biochem.**, 34: 665-668, 2002.
- VERMA, S. C.& LADHA, J. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, 91: 127-141, 2001.
- VERSALOVIC J., SCHNEIDER M., DE BRUIJN F.J., LUPSKI J.R., Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequences based on PCR (rep-PCR), **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York,v.5 p.25–40,1994.
- VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v.255, p.571-586., 2003.

WANG, Q.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M., Cole J. R. Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 7, p.5261-7. 2007.

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

WHITELAW, M. A. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, 69: 99-151, 2000.

WHITMAN, W.B.; COLEMAN, D.C. & WIEBE, W.J. Prokaryotes: The unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V.95, p.6578-6583, 1998.

XIE, C. H. & YOKOTA, A.. *Dyella japonica* gen. nov., sp. nov., a  $\gamma$  proteobacterium isolated from soil. **Int J Syst Evol Microbiol** 55, 753– 756, 2005.

XIE, H., PASTERNAK, J. J. & GLICK, B.R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indolacetic acid. **Current Microbiology**, 32: 67-71, 1996.

ZAADY, E. & PEREVOLTSKY, A. Enhancement of growth and establishment of oak seedlings *Quercus ithaburensis* Decaisne by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **For. Ecol. Manag.**, 72:81-83, 1995.

ZAKHAROVA E.A., SCHERBAKOV, A.A., BRUDNIK, A.V., SKRIPKO, N.G., BULKHIN, N.S., IGNATOY, V.V. Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 259, p. 572- 576, 1999.

## 7 APÊNDICE

### A- Meio de cultura NFB

Ácido Málico	5 g
Azul de bromotimol 0,5% em 0,2 N de KOH	2 mL
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,02g
FeEDTA	0,61g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5g
KOH	4,5g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2g
NaCl	0,1g
Solução de Micronutrientes	2mL
Solução de Vitaminas	1mL

Completar para 1000 mL com água destilada

Ajustar o pH 6,5 – 6,8

Meio sólido            9 g/L de ágar bacteriano

### Micronutrientes para meio de cultura (NFB)

Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,200g
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0,235g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,280g
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,008g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,024g

Completar o volume para 200 mL com água destilada.



**Vitamina para o meio de cultura (NFB)**

Biotina	10mg
Pyroridoxol	20mg
H <sub>2</sub> O	100mL
Dissolver a banho-maria (40° C)	

**B. Meio DYG'S**

Glicose	2g
Peptona	1,5g
Extrato de Levedura	2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
Acido Glutâmico	1,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5g

Completar para 1000 mL com água destilada

Ajustar o pH 6.8

Meio sólido            9 g/L de ágar bacteriano

**C. NBRIP**

Glicose	20 g
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> )	5 g
MgCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	10 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
KCl	0,2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1 g

Completar para 1000 mL com água destilada

Ajustar pH 7.0

Meio sólido            9 g/L de ágar bacteriano

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)