**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Isolamento, seleção e caracterização de rizobactérias com potencial
para promoção do crescimento em *Araucaria angustifolia***

Carlos Marcelo Ribeiro

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

Carlos Marcelo Ribeiro
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

**Isolamento, seleção e caracterização de rizobactérias com potencial para
promoção do crescimento em *Araucaria angustifolia***

Orientadora:
Prof^a. Dra. **ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração:
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba
2010**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Ribeiro, Carlos Marcelo

Isolamento, seleção e caracterização de rizobactérias com potencial para promoção do crescimento em *Araucaria angustifolia* / Carlos Marcelo Ribeiro. - - Piracicaba, 2010.
99 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2010.
Bibliografia.

1. Bactérias 2. Crescimento vegetal 3. Florestas 4. Fungos fitopatogênicos 5. Pinheiro (Rizosfera) I. Título

CDD 634.975
R484i

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

Aos meus pais, Ézio Benedito Ribeiro e Maria Dinah S.R. Ribeiro, por todos os ensinamentos e por me permitirem chegar até aqui, DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido forças necessárias para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Ézio Benedito Ribeiro e Maria Dinah S.R. Ribeiro, e irmãos, César Murilo Ribeiro e Luís Maurício Ribeiro, pelo incentivo e por sempre estarem ao meu lado.

À Prof^a. Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, pela orientação, oportunidade, disponibilidade e preciosos ensinamentos.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do Solo (ESALQ/USP), Denise de L. C. Mescolotti e Luis Fernando Baldesin, pela amizade, companhia e prontidão em sempre colaborar.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo (ESALQ/USP), Alessandra M. de Paula, Aline Figueiredo, Ana Andrade, André Shigueyoshi Nakatani, Daniel Bini, Daniel R. Lammel, Dilmar Baretta, Fabio A. Shiraishi, Gustavo Lanza, Jamil de Moraes Pereira, Joice Bonfim, Júlia C. Wayego, Júlia Lima, Marcos N. Vidotto, Marina Yumi Horta Miyauchi, Mylenne C. P. da Silva, Paulo Roger, Pilar Mariani, Patrícia Sanches, Priscila Trigo Martins, Rafael Borges da Silva Valadares, Rafael Leandro de Figueiredo Vasconcellos, Simone Cristina Braga Bertini e Thiago Gumiere, pelo auxílio e agradáveis momentos de convivência.

Ao Prof. Marcio Rodrigues Lambais e a todos os amigos do Laboratório de Microbiologia Molecular (ESALQ/USP), Adriano Reis Lucheta, Alice Cacetari, Carolina Baretta, Eder da Costa dos Santos, Elisa Matos, Gisele L. Nunes, Giselle G. Monteiro, Joze Correa, Kelly Justin, Marcela Arnaldo, Sandra P.M. Gomes, Rafael Dutra de Armas, Vivian G. Carvalho, Winston F. R. Ruiz e Wladimir J. Rosignolo.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola por todo o apoio proporcionado durante a realização desta dissertação.

À Embrapa Meio Ambiente – Jaguariúna - Laboratório de Microbiologia Ambiental – especialmente ao Prof. Itamar Soares de Melo e a técnica Marcia Parma, pela orientação na realização da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME).

Ao Prof. Acelino Couto Alfenas e Rafael Alfenas da Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela disponibilidade em nos enviar os fungos fitopatogênicos utilizados no presente estudo.

Agradecimentos especiais:

A Rafael L. F. Vasconcellos e Marina Y.H. Miyauchi, pelo companheirismo e por toda a contribuição no desenvolvimento do trabalho.

A Thiago Gumiere, pela amizade, colaboração e importantes discussões.

À Mylenne pela amizade e auxílio na realização dos testes para a seleção dos isolados de bactérias diazotróficas.

A Adriano R. Luchetta pela amizade e supervisão na realização das análises moleculares.

À Fapesp (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio através do projeto temático Biota - Fapesp “Biodiversidade vegetal e de organismos edáficos em ecossistemas de *Araucaria angustifolia* naturais e impactados no Estado de São Paulo” documento nº 01/05146-6.

A todos aqueles que, de qualquer forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, deixo aqui meu muito obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 DESENVOLVIMENTO	17
2.1 Revisão bibliográfica	17
2.1.1 <i>Araucaria angustifolia</i>	17
2.1.2 Estudos microbiológicos na Floresta Ombrófila Mista	19
2.1.3 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP).....	21
2.1.4 Diversidade e potencial biotecnológico de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas.....	23
2.1.5 Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Amostragem das raízes.....	29
3.2 Obtenção dos isolados de rizobactérias.....	31
3.3 Armazenamento dos isolados bacterianos.....	32
3.4 Armazenamento dos isolados fúngicos.....	32
3.5 Seleção de rizobactérias com potencial para a promoção do crescimento de plantas.....	33
3.5.1 Detecção e quantificação da produção de ácido indol-acético (AIA).....	33
3.5.2 Detecção da solubilização de fosfato inorgânico.....	33
3.5.3 Quantificação da solubilização de fosfato inorgânico	34
3.5.4 Detecção da produção de fosfatases	35
3.5.5 Capacidade de crescimento dos isolados em meio de cultura livre de nitrogênio.....	35

3.5.6 Detecção da produção de sideróforos	38
3.5.7 Detecção da produção de quitinases.....	38
3.5.8 Rizobactérias antagonistas a fitopatógenos de espécies arbóreas	38
3.5.8.1 Detecção do potencial de biocontrole a <i>Fusarium oxysporum</i>	38
3.5.8.2 Quantificação do potencial antagônico de rizobactérias a <i>Fusarium oxysporum</i> e <i>Cylindrocladium candelabrum</i>	39
3.5.8.3 Quantificação do potencial antagônico de rizobactérias a <i>C. pteridis</i>	39
3.6 Caracterização fenotípica dos isolados de rizobactérias através da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (Fatty Acid Methyl Ester - FAME)	40
3.7 Caracterização genotípica dos isolados de rizobactérias	42
3.7.1 Extração do DNA genômico.....	42
3.7.2 BOX-PCR	42
3.7.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Obtenção dos isolados de rizobactérias	47
4.2 Seleção de rizobactérias com potencial para a promoção do crescimento de plantas	47
4.2.1 Detecção e quantificação da produção de ácido indol-acético (AIA)	47
4.2.2 Detecção e quantificação da solubilização de fosfato inorgânico	50
4.2.3 Detecção da produção de fosfatases.....	53
4.2.4 Capacidade de crescimento dos isolados em meio de cultura livre de nitrogênio.....	55
4.2.5 Detecção da produção de sideróforos	59
4.2.6 Detecção da produção de quitinases.....	61
4.2.7 Rizobactérias antagonistas a fitopatógenos de espécies arbóreas	62
4.3 Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de rizobactérias.....	67
5 CONCLUSÕES.....	79

REFERÊNCIAS.....	81
APÊNDICE.....	95

RESUMO

Isolamento, seleção e caracterização de rizobactérias com potencial para promoção do crescimento em *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* é uma espécie vegetal de vital importância para a manutenção da Floresta Ombrófila Mista (Floresta de Araucária), ecossistema no qual ocorre naturalmente. A araucária apresenta elevado valor sócio-econômico e ambiental e, devido à intensa exploração predatória a que foi submetida, hoje se encontra criticamente ameaçada de extinção. A destruição dessa preciosa espécie vegetal ocasionaria graves consequências ao ecossistema, que poderiam envolver a redução da diversidade de inúmeros animais, plantas e micro-organismos, os quais estão intimamente associados e apresentam grande dependência de *A. angustifolia*. Pesquisas envolvendo particularmente a caracterização de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), nunca foram realizadas em *A. angustifolia*. Assim, o objetivo do presente estudo foi realizar o isolamento, a seleção e a caracterização de rizobactérias com potencial de promoção do crescimento e biocontrole de fungos fitopatogênicos em *A. angustifolia*. Os isolados obtidos foram selecionados quanto à capacidade para a promoção do crescimento por meio da produção de ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato inorgânico, produção de fosfatases, fixação assimbiótica de N₂, este último através da análise de acúmulo total de nitrogênio em meio de cultura e análise de redução do acetileno (ARA). Também foram selecionadas rizobactérias através da avaliação de mecanismos indiretos de ação, como produção de sideróforos e antagonismo a *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocladium candelabrum* e *C. pteridis*, fitopatógenos de espécies arbóreas. Os isolados mais promissores foram caracterizados através da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME), BOX-PCR e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Foram isoladas 97 rizobactérias, sendo submetidas aos testes fenotípicos. Todos os isolados apresentaram ao menos uma característica positiva para os mecanismos de promoção do crescimento avaliados, excetuando-se a produção de quitinases. Dentre os isolados obtidos, 18 produziram AIA, 27 foram capazes de solubilizar fosfato inorgânico, 37 foram positivos para sideróforos e 83 foram hábeis produtores de fosfatases. Com relação à fixação assimbiótica de N₂, 20 isolados foram positivos para a formação de película em meio de cultura livre de nitrogênio, no entanto, nenhum diferiu significativamente do controle, sem nitrogênio, quando analisado o acúmulo deste elemento em meio de cultura. Por outro lado, 3 isolados foram capazes de reduzir acetileno a etileno. Quarenta e cinco isolados formadores de endósporos apresentaram antagonismo a *F. oxysporum*. Os isolados B4, B15, B27, B35, B36, B42 e RISP2, caracterizados como *Bacillus* spp., destacaram-se como bons antagonistas aos fitopatógenos avaliados. Também foi verificada a presença de estirpes com múltiplos mecanismos de ação. A análise genotípica dos isolados mais promissores através da técnica de BOX-PCR apresentou a formação de dois grandes grupos, expressando nitidamente o agrupamento dos isolados formadores de endósporo. A técnica FAME e o sequenciamento do gene 16s rRNA concordaram em caracterizar os melhores isolados como pertencentes às famílias Bacillaceae (9 isolados), Enterobacteriaceae (11) e Pseudomonadaceae (1). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a relacionar a espécie *Ewingella americana* a diversos mecanismos de promoção do crescimento. Os

resultados obtidos demonstram grande potencial de aplicabilidade dessas rizobactérias como biofertilizantes e no controle biológico de fitopatógenos em *A. angustifolia*.

Palavras-chave: Floresta Ombrófila Mista; Rizosfera; RPCP; Mecanismos de ação; FAME; BOX-PCR; 16S rRNA

ABSTRACT

Isolation, selection and characterization of rhizobacteria with potential for growth promotion in *Araucaria angustifolia*

Araucaria angustifolia is a plant species of vital importance for the maintenance of the Mixed Ombrophylous Forest (*Araucaria* Forest) ecosystem in which it occurs naturally. *Araucaria* has a high socio-economic and environmental value, and due to its intense predatory exploitation, it is critically endangered. The destruction of this precious plant species would cause serious consequences to the ecosystem, which could involve a reduction of the diversity of many animals, plants and microorganisms, which are closely associated and reveal a great dependence on *A. angustifolia*. Studies involving plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and their characterization have never before been performed in *A. angustifolia*. The objective of this study was to isolate, select and characterize rhizobacteria with potential for growth promotion and biocontrol of plant pathogenic fungi in *A. angustifolia*. The isolates were selected by means of their potential to produce indole acetic acid (IAA), to solubilize inorganic phosphate, to produce phosphatase, and for symbiotic N₂ fixation. The latter was estimated by analyzing the accumulation of nitrogen in the culture medium and by the acetylene reduction assay (ARA). Rhizobacteria were also selected through the evaluation of indirect action mechanisms such as siderophore production and antagonism to *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocladium candelabrum* and *C. pteridis*, all pathogens of trees. The most promising isolates were characterized by analyzing the fatty acid methyl ester (FAME), by BOX-PCR and partial sequencing of the 16S rRNA gene. Ninety seven rhizobacteria were isolated and subjected to the phenotypic tests. All isolates presented at least one positive feature, characterizing them as potential PGPR, except for the production of chitinases. Among these isolates, 18 produced IAA, 27 were able to solubilize inorganic phosphate, 37 were positive for siderophores and 83 were phosphatases producers. Regarding the symbiotic N₂ fixation, 20 isolates were effective in the pellicle formation in nitrogen free culture medium, however, none differed significantly from the control, when analyzed for the accumulation of N in the culture medium. Furthermore, three isolates were able to reduce acetylene to ethylene. Forty five isolates were endospore formers and antagonistic to *F. oxysporum*. The isolates B4, B15, B27, B35, B36, B42 and RISP2, characterized as *Bacillus* spp. stood out as good antagonists of the evaluated plant pathogens. We also observed the presence of strains with multiple mechanisms of action. Genotypic analysis of the most promising isolates by the BOX-PCR technique showed the formation of two major groups, expressing clearly the grouping of isolates forming endospores. Both techniques, FAME and PCR, resulted in the same grouping of the most effective isolates as belonging to Bacillaceae (9 isolates), Enterobacteriaceae (11) and Pseudomonadaceae (1). As far as we know, this is the first study to include the bacterium *Ewingella americana* among the PGPR. The results demonstrate a potential application of these rhizobacteria as biofertilizers and for biological control of plant pathogens in *A. angustifolia*.

Keywords: Mixed Ombrophylous Forest; Rhizosphere; PGPR; Mechanisms of action; FAME; BOX-PCR; 16S rRNA

1 INTRODUÇÃO

A busca por tecnologias limpas e que não ofereçam riscos ao ambiente e ao ser humano é cada vez mais intensa. Uma das possibilidades refere-se ao emprego de micro-organismos como uma alternativa à utilização de fertilizantes químicos e agrotóxicos, ao serem aplicados como biofertilizantes e agentes do controle biológico.

Nesse sentido, as rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP) podem favorecer o desenvolvimento vegetal através de múltiplos mecanismos de ação, por meio da produção de substâncias reguladoras do crescimento, pelo aumento na disponibilização de nutrientes na rizosfera, bem como pela supressão de fitopatógenos neste ambiente.

Esses mecanismos de ação desenvolvidos por RPCP são amplamente descritos em culturas agrônômicas, no entanto, estudos conduzidos com espécies arbóreas, sobretudo em coníferas, ainda são incipientes.

Desse modo, torna-se promissor um maior conhecimento sobre rizobactérias com potencial para a promoção do crescimento de plantas em *Araucaria angustifolia*, espécie criticamente ameaçada de extinção e de vital importância para a Floresta Ombrófila Mista.

Assim, o presente estudo teve por objetivos:

- Isolar rizobactérias do solo rizosférico aderido às raízes de *A. angustifolia*;
- Selecionar rizobactérias através da avaliação de mecanismos diretos de promoção do crescimento;
- Selecionar rizobactérias com potencial para o biocontrole de fungos patogênicos de espécies arbóreas;
- Caracterizar fenotipicamente os isolados mais promissores através da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (Fatty Acid Methyl Ester - FAME);
- Caracterizar genotipicamente os isolados selecionados através da técnica de BOX-PCR e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia* (Bertolini) Otto Kuntze, conhecida popularmente como pinheiro-do-Paraná, pinheiro brasileiro ou simplesmente araucária, é a única espécie do gênero de ocorrência natural no Brasil (SHIMIZU; OLIVEIRA, 1981). Essa espécie arbórea de rara beleza, que varia de 20 a 50 m de altura, desempenha um importante papel na manutenção de seu ecossistema e, por possuir grande valor sócio-econômico, encontra-se ameaçada, visto que foi intensamente explorada em suas áreas de origem (SCHUMACHER et al., 2005). A extinção dessa preciosa espécie vegetal ocasionaria graves consequências ao ecossistema, as quais poderiam envolver a perda da diversidade de animais e de outras plantas, bem como dos micro-organismos localizados abaixo da superfície do solo, muitos ainda desconhecidos e, possivelmente, intimamente associados a *A. angustifolia* (CARDOSO, 2004).

A *A. angustifolia*, pertencente à Divisão Gymnospermae, Classe Coniferopsida, Ordem Coniferae e Família Araucariaceae, ocorre naturalmente no Brasil e em pequenas manchas no extremo nordeste da Argentina na província de Misiones, e no leste do Paraguai, no Departamento de Alto Paraná, estendendo-se entre as latitudes 19° 15' S (Serra do Padre Ângelo, em Conselheiro Pena - MG, no alto Rio Doce) e 31° 30' S (Canguçu – RS), e entre as longitudes 41° 30' W até 54° 30' E (GOLFARI, 1971).

No Brasil, *A. angustifolia* ocupava originalmente uma área de aproximadamente 185.000 km² (MACHADO; SIQUEIRA, 1979), distribuindo-se pelos Estados do Paraná (40% de sua superfície), Santa Catarina (31%) e Rio Grande do Sul (25%), bem como em manchas esparsas no sul do Estado de São Paulo (3%), sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro, em áreas de altitudes elevadas (1%) (CARVALHO, 1994). As altitudes onde *A. angustifolia* ocorre variam entre 500 e 2.300 m, concentrando-se principalmente em valores altitudinais de 500 a 1.800 m (FARJON, 2006).

A araucária está inserida no domínio da Mata Atlântica denominado de Floresta Ombrófila Mista, também chamado de Floresta de Araucária, sendo que a primeira

nomenclatura está adequada a um sistema de classificação da floresta intertropical (IBGE, 1992). Esse termo é parcialmente originário da combinação da vegetação tropical afro-brasileira e a temperada austro-brasileira, cada qual apresentando seus elementos característicos (PEA, 2007). Essa combinação é encontrada devido a condições típicas encontradas no planalto meridional brasileiro, região onde ocorria com maior frequência a Floresta de Araucária (IBGE, 1992). Essa última está circunscrita a uma região de clima pluvial subtropical, localizada abaixo do Trópico de Capricórnio e que, associada à latitude e às altitudes planálticas, criam uma situação ímpar na região Neotropical (PEA, 2007).

O pinheiro brasileiro é uma árvore de grande importância para o ecossistema em que ocorre, pois abriga uma ampla diversidade de animais e plantas, muitos dos quais estão ameaçados de extinção. Com o amadurecimento das pinhas, a vida na Floresta de Araucária se altera, pois são diversos os animais da fauna silvestre que se alimentam de suas sementes e contribuem para a dispersão da espécie (BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL - BRDE, 2005). Entre esses animais, destacam-se a gralha-azul (*Cyanocorax caeruleus*), a gralha-picaça (*Cyanocorax chrysops*), o papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), o esquilo-serelepe (*Sciurus aestuans*), os camundongos, as cotias, as pacas, os ouriços e os porcos-do-mato (MATTOS, 1994). Além dos animais, a Floresta de Araucária abriga espécies vegetais importantes, como a erva-mate (*Ilex paraguariensis*), o xaxim (*Dicksonia sellowiana*), a imbuia (*Ocotea porosa*), o cedro (*Cedrela fissilis*), entre muitas outras, que ainda resistem à ação antrópica e sobrevivem em pequenos fragmentos, os quais formam verdadeiras comunidades interativas e diferenciadas em florística, estrutura e organização ecológica (IBGE, 1992; BRDE, 2005; CALDEIRA, 2006).

Além da importância ambiental, *A. angustifolia* possui importantíssimo valor social e econômico, pois quase todas as estruturas da espécie são aproveitáveis. A começar pelas sementes, que possuem elevado valor nutritivo e são apreciadas na culinária típica (MATTOS, 1994). As plantas jovens de araucária são utilizadas na ornamentação de residências (PEA, 2007), a madeira, serrada ou laminada, apresenta boas características, sendo constituído de 58,3% de celulose de fibra longa e 28,5% de lignina, o que possibilita seu emprego na produção de papel de elevada qualidade

(CARVALHO, 1994). Além disso, a resina exsudada pela casca da araucária, após sua destilação, pode ser empregada na produção de uma ampla gama de produtos, como vernizes, acetona, terebentina, ácido pirolenhoso, além de muitas outras aplicações industriais (EMBRAPA, 2003).

Frente ao intenso processo de exploração predatória, a Floresta Ombrófila Mista encontra-se reduzida a fragmentos de vegetação (PEA, 2007). Assim, a araucária está classificada como vulnerável pela Lista Oficial de Espécies da Flora Ameaçada de Extinção (BRASIL, 1992) e como uma espécie criticamente ameaçada pela Lista Vermelha da IUCN (International Union for Conservation of Nature) (FARJON, 2006). Isto se deve, sobretudo, ao avanço da agropecuária e do extrativismo vegetal, os quais dizimaram a araucária, considerada esta o produto madeireiro mais importante do Brasil até a década de 1970 (SEITZ, 1986). Como resultado, as áreas de ocorrência natural da *A. angustifolia* se restringiram a menos de 3% do que ocupava originalmente (BRDE, 2005).

Mesmo assim, a Floresta de Araucária ainda encontra-se preservada no Parque Estadual de Campos do Jordão (SP) e em Monte Verde, Município de Camanducaia (MG) (IBGE, 1992). No dossel da floresta em Campos do Jordão, predomina a *A. angustifolia* em meio a uma composição florística possivelmente semelhante à que ocorria naturalmente nos Estados de Santa Catarina e Paraná (IBGE, 1992).

2.1.2 Estudos microbiológicos na Floresta Ombrófila Mista

Um dos fatores determinantes para o crescimento saudável, e consequente conservação da araucária, refere-se às condições do solo em que esta se encontra (CARVALHO, 1994). A araucária tem preferência por solos de alta fertilidade, com características físico-químicas estáveis, adequadas condições biológicas, especialmente no que se refere à elevada atividade microbiológica, elementos os quais condicionam a alta capacidade de retenção de umidade e nutrientes nesse ambiente (BLUM, 1977; MALUCHE-BARETTA, 2007).

Os micro-organismos presentes no solo, através da decomposição da matéria orgânica, aumentam a taxa de mineralização e auxiliam no aumento da oferta de

nutrientes para a araucária (SILVA, 2001). Associações micorrízicas também possuem grande importância na nutrição e no desenvolvimento da araucária, visto que interferem na decomposição da serapilheira e no fornecimento de N e P à espécie vegetal (MOREIRA et al., 2006).

A diversidade, funcionalidade e estrutura das comunidades microbianas em florestas de *A. angustifolia* situadas no Parque Estadual de Campos do Jordão, SP, foram avaliadas pelo trabalho pioneiro de Maluche-Baretta (2007). Nesse estudo, avaliou-se a estrutura das comunidades de Bacteria e Archaea pela técnica de PCR-DGGE (eletroforese em gel com gradiente desnaturante), sequenciamento parcial do gene 16S rRNA de Bacteria, capacidade de utilização de substratos de carbono (Biolog), perfis de ácidos graxos ligados a ésteres de fosfolipídios (PLFA), além de outras análises químicas e microbiológicas. Através da afiliação taxonômica das sequências de clones do gene 16S rRNA foi possível verificar que o solo de floresta nativa apresenta uma maior diversidade de táxons, quando comparado aos solos de reflorestamento de araucária e reflorestamento de araucária com queima accidental. Além disso, constatou-se que os filos Proteobacteria e Actinobacteria foram os mais frequentes nas três áreas estudadas. A autora também observou uma maior biomassa bacteriana, além de uma maior proporção relativa de PLFA bacterianos, principalmente de bactérias gram-positivas, quando comparados aos PLFA fúngicos.

A biodiversidade e a distribuição de fungos micorrízicos arbusculares (FMA) foi estudada em duas Florestas de Araucária, sendo uma floresta nativa e outra plantada (MOREIRA et al., 2007). Para isso, os autores avaliaram, por meio de duas amostragens (maio e outubro), a colonização radicular, a densidade e a diversidade de esporos de FMA. Na amostragem realizada em outubro, houve maior colonização radicular na floresta nativa do que na floresta plantada. Não obstante, a colonização radicular foi mais intensa em comparação à coleta realizada em maio. Além disso, foram identificadas 27 espécies de FMA no total, sendo maior o número de esporos encontrados na Floresta Ombrófila Mista nativa em relação à área reflorestada. Assim, os autores puderam concluir que mesmo decorridos mais de 18 anos após a data do reflorestamento, a diversidade de FMA na área estudada não foi totalmente recuperada.

A associação de bactérias diazotróficas com *A. angustifolia* foi relatada pela primeira vez por Neroni (2007) e confirmada através da análise de redução do acetileno (ARA). Nesse mesmo estudo, através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, a autora constatou que grande parte dos isolados pertenciam aos gêneros *Burkholderia* e *Pseudomonas*. Esses micro-organismos desempenham um importante papel na manutenção de diferentes ecossistemas, pois são capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio e produzir substâncias que regulam o crescimento de plantas, como auxinas e citocininas (BAZZICALUPO; OKON, 2000).

Lammel et al. (2007), observaram uma elevada riqueza fenotípica nas formas dos nódulos em leguminosas, bem como nas cepas de bactérias isoladas de plantas presentes no sub-bosque da Floresta de Araucária em Campos do Jordão. Além disso, os pesquisadores constataram a fragilidade de uma análise meramente fenotípica, visto que grupos genotípicos taxonomicamente distintos, como os gêneros *Burkholderia* e *Rhizobium*, poderiam ter sido considerados idênticos.

O potencial para a promoção de crescimento de plantas e biocontrole de fitopatógenos por actinobactérias, obtidas da rizosfera de *A. angustifolia*, foi avaliado e confirmado por Vasconcellos e Cardoso (2009). Alguns dos isolados testados foram capazes de produzir enzimas de interesse biotecnológico, como proteases, quitinases e amilases, além de inibir o crescimento de *Fusarium* sp. e *Armillaria* sp., ambos causadores de podridão radicular em *A. angustifolia* e *Pinus* sp.. O isolado *Streptomyces* sp. A43 quando inoculado em *Pinus taeda*, ocasionou um incremento de até 100% da biomassa, tanto na parte aérea como no sistema radicular.

Esses resultados evidenciam a grande diversidade de micro-organismos edáficos em florestas de *A. angustifolia* e confirmam o potencial destes para a promoção do crescimento de plantas.

2.1.3 Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP)

A rizosfera, região do solo que sofre influência direta dos exsudatos radiculares, constitui um ambiente físico, bioquímico e ecológico único. Esses exsudatos são capazes de regular a comunidade microbiana do solo em suas proximidades, estimular

interações benéficas, alterar as propriedades químicas e físicas do solo e até mesmo inibir espécies competidoras (FLORES et al., 1996). Dentre os principais grupos de exsudatos, podem-se destacar os de baixo peso molecular, tais como açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos, e os de alta massa molecular, como mucilagem e proteínas (BAIS, 2006). Desse modo, a rizosfera fornece um ambiente extremamente favorável ao desenvolvimento de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCP), quando comparado ao solo não rizosférico.

O termo RPCP foi introduzido inicialmente por Kloepper e Schroth (1978) para designar bactérias não simbióticas que ocorrem naturalmente no solo, possuem a capacidade de colonizar raízes e estimular o crescimento de plantas.

Os processos pelos quais as RPCP promovem o crescimento das plantas envolvem um ou mais mecanismos de ação, exercidos de forma direta, por meio da produção de substâncias promotoras do crescimento e do aumento na disponibilização de nutrientes à espécie vegetal, ou indiretamente, através da supressão de fitopatógenos na rizosfera (FREITAS, 1994; BRINGHURST, 2001).

Os mecanismos de ação direta das RPCP incluem o estímulo da nodulação de plantas leguminosas por outras bactérias (GRIMES; MOUNT, 1984), a fixação assimbiótica de nitrogênio (BENEDUZI et al., 2008), a produção de hormônios capazes de induzir o alongamento do sistema radicular (MELO, 1998), a solubilização de fosfatos e a produção de fosfatases (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999), aumentando assim a oferta de nutrientes na rizosfera (VESSEY, 2003).

Em contrapartida, a liberação de sideróforos para o solo (KLOEPPER et al., 1980), a atividade antibiótica e a produção de ácido hidrocianico (HCN) pelas RPCP, favorecem-nas na competição com micro-organismos deletérios, como fungos e outras rizobactérias (ZAGO, 2000). Estas substâncias possibilitam a criação de solos supressivos, contribuem para a colonização e o estabelecimento desse grupo bacteriano na rizosfera e, conseqüentemente, promovem o crescimento vegetal (KLOEPPER; SCHROTH, 1978; MELO, 1998; SHARIFI-TEHRANI et al., 1998).

Os efeitos benéficos ocasionados pelo emprego das RPCP têm sido amplamente descritos, principalmente em culturas agrônômicas, como batata (BURR et al., 1978), feijão (GRIMES; MOUNT, 1984), pepino (WEI et al., 1996), tomate (SHARIFI-TEHRANI

et al., 1998; KAMILOVA et al., 2006), ervilha (ANDRADE et al., 1998), rabanete (KAMILOVA et al., 2005), alface (FREITAS et al., 2003; GOMES et al., 2003; SOTTERO et al., 2006), arroz (BENEDUZI et al., 2008), entre outras.

Apesar dos estudos com RPCP estarem relativamente avançados em sistemas agrícolas, as pesquisas com esse grupo de bactérias em ambientes florestais ainda carecem de estudos mais aprofundados (TEIXEIRA et al., 2007).

Os efeitos proporcionados pelas RPCP foram estudados em espécies arbóreas pertencentes ao gênero *Pinus*, *Tsuga* e *Pseudotsuga* (CHANWAY, 1997) e *Eucalyptus* (MAFIA et al., 2007), e apresentaram resultados promissores, como aumentos expressivos na germinação de sementes e na biomassa de plântulas que receberam inóculos de rizobactérias.

Nos sistemas florestais, devido ao longo tempo de rotação, a utilização de RPCP como inoculantes não objetiva o aumento direto na produção de madeira, e sim visa proporcionar às plantas uma maior taxa de sobrevivência, através de um melhor desenvolvimento do sistema radicular e proteção às plântulas contra patógenos (MAFIA et al., 2007).

Teixeira et al. (2007) verificaram que dos 107 isolados obtidos da rizosfera de mudas de clones de eucalipto, 10 proporcionaram ganhos de até 110% e 250% no enraizamento e crescimento, respectivamente. A classificação filogenética utilizando-se o sequenciamento do gene 16S rRNA indicou que desses 10 isolados, quatro pertenciam ao gênero *Pseudomonas* e três como integrantes da espécie *Bacillus subtilis*, ambos comumente relatados como RPCP.

2.1.4 Diversidade e potencial biotecnológico de rizobactérias promotoras do crescimento de plantas

O interesse pelo estudo da comunidade microbiana da rizosfera e de seus efeitos sobre a qualidade do solo, aliado ao advento das técnicas moleculares para a caracterização das rizobactérias, contribuíram significativamente para o aumento do número de gêneros descritos como RPCP. Assim, atualmente são muitos os grupos bacterianos relatados como rizobactérias promotoras do crescimento, a saber, o filo Proteobacteria, destacando-se as classes Alpha, Beta e Gammaproteobacteria, esta

última com inúmeros representantes das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae, além dos filos Actinobacteria e Firmicutes (RODRÍGUEZ-DÍAZ et al., 2008). Já as principais RPCP estudadas em coníferas compreendem os gêneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* e *Streptomyces* (CHANWAY, 1997; ENEBAK, et al., 1998; BARRIUSO, et al., 2005).

Um amplo estudo buscou selecionar bactérias com características de RPCP na rizosfera de *Pinus pinea* e *Pinus pinaster* colonizadas por fungos micorrízicos, bem como na micosfera de *Lactarius deliciosus* (BARRIUSO et al., 2005). Inicialmente foram selecionadas morfologicamente 720 colônias de rizobactérias. Dessas, 389 foram submetidas a testes para a detecção da degradação de ácido-1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC), produção de auxinas, síntese de sideróforos e solubilização de fosfato. Dos isolados analisados, 38% apresentaram ao menos uma característica positiva, sendo que a maior parte dos isolados que mobilizavam nutrientes estavam mais relacionados à micorrizosfera de *P. pinaster*, ao passo que *P. pinea* estava mais associada a bactérias que sintetizavam reguladores do crescimento. Os 147 isolados foram então analisados por PCR-RAPD (random amplified polymorphic DNA), os quais foram reunidos em 10 grupos com 85% de similaridade, sugerindo baixa diversidade no sistema estudado. Finalmente, um isolado de cada grupo foi caracterizado pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, os quais mostraram similaridade com os gêneros *Arthrobacter* (1 isolado), *Bacillus* (4), *Burkholderia* (2), *Curtobacterium* (1) e *Staphylococcus* (2).

Uma característica desejável para uma RPCP é a capacidade de produzir ácido indol-acético (AIA) e solubilizar fosfato. Essas habilidades foram detectadas em isolados do gênero *Pseudomonas* obtidos da rizosfera de *Pinus roxburghii* (Chir-pine). O isolado selecionado *P. aeruginosa* PN1 promoveu o crescimento em *P. roxburghii*, o que poderia estar relacionado aos mecanismos de ação avaliados, além da intensa quimiotaxia pelos exsudatos na rizosfera e consequente colonização radicular da planta hospedeira (SING et al., 2010).

O efeito de rizobactérias produtoras de hormônios reguladores do crescimento, como auxinas e citocininas, foi observado por Bent et al. (2001) ao serem aplicadas em

sementes de *Pinus contorta* (Lodgepole). Os autores observaram que o isolado *Paenibacillus polymyxa* Pw2, previamente obtidos das raízes de *P. contorta*, demonstrou os melhores resultados, como maior número de raízes laterais e maior biomassa, o que não foi observado ao ser inoculado juntamente com outros isolados de rizobactérias. Esses hormônios foram posteriormente avaliados nas raízes das plantas, sendo que os isolados *P. polymyxa* L6 e Pw-2 apresentaram os maiores níveis de ácido indol-acético (AIA) nas raízes de *P. contorta*, 12 semanas após a inoculação. Não obstante, a aplicação do isolado *Pseudomonas fluorescens* M20 resultou em elevados níveis de citocinina dihidrozeatina ribosídeo (DHZR) presente nas raízes.

Inúmeros integrantes dos gêneros supracitados são utilizados para a síntese de uma ampla variedade de produtos agrícolas, médicos, farmacêuticos e industriais. Esses incluem uma extensa lista de antibióticos, enzimas e aminoácidos de grande potencial biotecnológico (SCHALLMEY et al., 2004; SIDDIQUI, 2005). Esporos formados por bactérias, como pelo gênero *Bacillus*, podem ser armazenados por longos períodos, o que vem a ser uma vantagem para a formulação de produtos comerciais. Além disso, esse grupo de bactérias pode fornecer proteção às culturas agrônômicas por antibiose e pela indução de resistência sistêmica (HAAS, DÉFAGO, 2005).

Desse modo, torna-se relevante o estudo da diversidade, dos mecanismos de ação e da ecologia desse grupo de micro-organismos da rizosfera. Através do emprego de rizobactérias como biofertilizantes e agentes do controle biológico, busca-se a redução do uso de fertilizantes químicos e a diminuição do uso de pesticidas, contribuindo assim para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável.

2.1.5 Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias

Sabe-se que um único método, seja ele fenotípico ou genotípico, não é robusto o suficiente para a caracterização precisa de um organismo, mas que técnicas clássicas e moleculares se complementam e desempenham um papel fundamental na identificação de espécies. Nesse sentido, procura-se utilizar a taxonomia polifásica, que estabelece parâmetros mais confiáveis sobre a caracterização do organismo estudado (RODRÍGUEZ-DÍAZ et al., 2008).

A taxonomia polifásica compreende a análise conjunta de diferentes métodos, como bioquímicos e fisiológicos, através de protocolos clássicos ou kits comerciais, pela análise de ácidos graxos da membrana e por técnicas moleculares, como a caracterização de genes ribossomais e até mesmo pela comparação total do genoma entre estirpes (hibridização DNA-DNA). Essa última técnica, conforme definido pelo Comitê Internacional de Sistemática Bacteriana, considera como isolados bacterianos da mesma espécie aqueles que apresentarem hibridização de seus genomas acima de 70% (WAYNE et al., 1987; RODRÍGUEZ-DÍAZ et al., 2008).

Além de testes bioquímicos, uma das técnicas mais utilizadas para caracterizar isolados bacterianos refere-se à análise de ácidos graxos da membrana celular (Fatty Acid Methyl Ester - FAME). Com base na análise dos mais de 300 ácidos graxos e compostos relacionados encontrados no domínio Bacteria, pode-se inferir sobre as diferenças qualitativas, geralmente relacionadas aos gêneros, e quantitativas, utilizadas para discriminação das espécies. Verificou-se também que os perfis de ácidos graxos não apresentam alterações significativas originadas por remoções e inserções de plasmídeos, ou mesmo por mutações ocasionadas através de luz ultravioleta (UV) ou agentes químicos (KUNITSKY et al., 2006).

Essas características contribuem para a confiabilidade da técnica, pois sugerem que a composição dos ácidos graxos é altamente conservada geneticamente e que mudanças no perfil ocorrem somente em consideráveis períodos de tempo. Assim, estirpes da mesma espécie bacteriana, situadas em qualquer lugar do mundo, podem apresentar um perfil próprio de ácidos graxos, quando submetidas a condições relativamente semelhantes (KUNITSKY et al., 2006).

Uma técnica amplamente utilizada para caracterizar isolados bacterianos consiste na utilização de *primers* complementares a sequências repetitivas de DNA que ocorrem naturalmente e são altamente conservadas. Essa metodologia, denominada de rep-PCR (repetitive-sequence-based-PCR), analisa essas regiões repetitivas, que geralmente estão localizadas no espaço intergênico, e em ambas orientações, estando presentes em grande parte dos genomas bacterianos. Além disso, foram identificadas três famílias de regiões repetitivas, dentre elas a REP (Repetitive Extragenic Palindromic) de 35-40 pb (pares de bases) (STERN et al., 1984), ERIC (Enterobacterial

Repetitive Intergenic Consensus) de 124-127 pb (HULTON et al., 1991) e BOX de 154 pb. Essa última é formada por três subunidades: box A de 54 pb, box B de 43 pb e box C de 50 pb (MARTIN et al., 1992), no entanto, somente a subunidade box A parece apresentar regiões altamente conservadas em bactérias (KOEUTH et al., 1995). Utilizando-se o *primer* BOX, são obtidas impressões digitais mais robustas e um padrão de segmentos mais complexo. Essas impressões digitais do DNA geradas pela rep-PCR permitem a diferenciação de espécies, subespécies e, em alguns casos, até mesmo distinguir estirpes (VERSALOVIC et al., 1994).

Os ácidos ribonucleicos ribossomais (rRNA) são os mais úteis e mais utilizados cronômetros moleculares. Isso se deve, sobretudo, a sua ocorrência em todos os organismos e, diferentes posições em suas sequências, permitem inferir relações filogenéticas entre eles. Não obstante, os rRNA são pouco afetados pela transferência horizontal de genes. Isso possibilita desenhar *primers* e sondas de hibridização a fim de explorar taxonomicamente em diferentes níveis de especificidade e descrever a filogenia da comunidade microbiana em diferentes habitats (WOESE, 1987; ACINAS et al., 2004).

Desse modo, o gene 16S rRNA é amplamente utilizado como marcador filogenético universal, pois apresenta sequências altamente conservadas entre regiões variáveis, está presente e desempenha a mesma função em todos os organismos, apresenta uma ampla base de dados disponível on-line, não é afetado por mudanças ambientais, é de fácil manipulação e é grande o bastante para que possa ser utilizado para realizar inferências taxonômicas (WOESE, 1987; ACINAS et al., 2004). Comumente emprega-se o índice de similaridade superior a 97% em comparação com as sequências depositadas nos bancos de dados para identificar como organismos da mesma espécie, no entanto, outros autores sugerem que apenas o sequenciamento do 16S rRNA não é capaz de definir espécies de procariotos, indicando o sequenciamento de outros genes, como o *gyrB*, que codifica uma topoisomerase tipo II, enzima que participa da helicoidização do DNA (YAMADA et al., 1999).

Por outro lado, muitos autores sugerem que mesmo o sequenciamento parcial do gene 16S rRNA é efetivo para a classificação e identificação de diversos grupos bacterianos, como *Alicyclobacillus* (GOTO et al., 2002), *Bacillus* (GOTO, et al, 2000)

Paenibacillus (GOTO, 2002) e *Streptomyces* (KATAOKA et al., 1997). Para o gênero *Bacillus*, por exemplo, identificou-se a região hipervariável (HV) localizada entre os nucleotídeos 70-344, revelando ser altamente específica. Ao se comparar a árvore filogenética gerada pelo sequenciamento completo do 16s rRNA e a obtida pela HV, esta última apresentou clusters estritamente conservados e distância genética mais acentuada. Assim, apenas o sequenciamento da HV foi o suficiente para discriminar e caracterizar em nível de espécie os isolados pertencentes ao gênero *Bacillus* avaliados no estudo (GOTO et al., 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem das raízes

A coleta de raízes e de solo rizosférico de *A. angustifolia* foi realizada em uma floresta de mata nativa no Parque Estadual de Campos do Jordão, localizado na Serra da Mantiqueira (22°44' S e 45°30' W; altitude média de 1450 m), na cidade de Campos do Jordão, Estado de São Paulo, Brasil (Figura 1). O clima local é classificado como Cfb, seguindo a categorização de Köppen (SEIBERT et al., 1975), que é caracterizado como subtropical de altitude, mesotérmico e úmido, inexistindo o período seco. A precipitação é relativamente bem distribuída ao longo do ano, consistindo a média anual de 2000 mm. O mês mais quente da região é fevereiro (17,5°C) e junho o mais frio (11,5°C) (MOREIRA et al., 2006).

Para o isolamento de rizobactérias em *A. angustifolia*, foram coletadas três subamostras de raízes, contendo um pouco de solo a elas aderido, ao redor de nove diferentes árvores adultas distribuídas em três blocos. As amostras de raízes foram conservadas em sacos plásticos e acondicionadas a 4°C em caixas de isopor com gelo para o transporte até o Laboratório de Microbiologia de Solo (ESALQ/USP), em Piracicaba, SP, onde permaneceram em câmara fria a 4°C.

Amostras de solo (até 20 cm de profundidade) da área de coleta foram submetidas à análise química no Laboratório de Fertilidade do Solo do Departamento de Ciência do Solo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) (Tabela 1).

Tabela 1 - Atributos químicos do solo na profundidade 0-20 cm da área do local de coleta na Floresta Nativa do Parque Estadual Campos do Jordão

pH	M.O	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	SB	T	B	Cu	Fe	Mn	Zn
(CaCl)	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	mmolc dm ⁻³					mg dm ⁻³							
3,2	113	11	12	1,9	4	4	33	313	9,9	322,9	0,8	0,6	398	1,4	1,1

M.O: Matéria orgânica; H+Al: acidez potencial; SB: soma de bases; T = SB + (H + Al).

Figura 1 – A: Parque Estadual Campos do Jordão; B e C: Floresta Ombrófila Mista nativa onde foram amostradas as raízes de *Araucaria angustifolia* (detalhe)

3.2 Obtenção dos isolados de rizobactérias

As três subamostras de raízes coletadas em cada árvore foram então misturadas, originando um total de 9 amostras compostas. Para o isolamento das rizobactérias, 10 g de segmentos de raízes de cada amostra composta foram adicionados em 90 mL de solução salina esterilizada (NaCl, 0,85%) em erlenmeyers tampados, os quais foram agitados durante 30 min. O conjunto formado pelas raízes de araucária mais o solo a elas aderido foi considerado como ambiente rizosférico. Procedeu-se então as diluições seriadas de fator 10, das suspensões de solo obtidas, em solução salina (NaCl, 0,85%). Foram adicionadas alíquotas de 0,1 mL das diluições seriadas utilizadas e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski em placas de Petri, em duplicata, contendo o meio de cultura King B (KB: proteose peptona n°3, 20 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,5 g; K_2HPO_4 , 1,5 g; ágar, 15 g; glicerina, 10 mL; completar para 1000 mL com H_2O destilada; pH 7,2) (KING et al., 1954). As placas foram mantidas à temperatura de 28°C por 48 horas. As colônias obtidas foram selecionadas aleatoriamente e estriadas em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura para a sua purificação, sendo então incubadas por mais 48 h.

Para o isolamento seletivo de bactérias formadoras de endósporos, procedeu-se de modo semelhante ao descrito acima, diferenciando-se em razão de que os tubos contendo as diluições seriadas foram aquecidos em banho-maria a 80°C durante 20 minutos (BETTIOL, 1995). Alíquotas de 0,1 mL das diluições seriadas foram adicionadas em placas de Petri, em duplicata, contendo o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar: caldo de batata, 200 mL; dextrose, 20 g; ágar, 15 g; completar para 1000 mL com H_2O destilada; pH 6). As placas foram mantidas à temperatura de 28°C durante 48 h. Após esse período, as colônias que apresentaram crescimento foram selecionadas aleatoriamente e estriadas em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura para a sua purificação, sendo então incubadas por mais 48 h.

3.3 Armazenamento dos isolados bacterianos

Depois de confirmada a pureza das culturas, os isolados bacterianos foram repicados em tubos de ensaio contendo 8 mL de meio de cultura sólido KB ou BDA inclinado. As estirpes foram preservadas através de 3 métodos diferentes: 1 – preservação em óleo mineral (Nujol): Os isolados foram repicados para tubos com os mesmos meios de cultura (KB ou BDA), incubados por 48 h a 28°C e posteriormente cobertos por 2 mL de óleo mineral esterilizado, sendo mantidos em geladeira a 4°C; 2 – criopreservação: as culturas, previamente crescidas em placas de Petri contendo os meios descritos, foram inoculadas em microtubos de 1,5 mL contendo glicerol 40% e armazenadas em freezer a -20°C; 3 – armazenamento por liofilização: os isolados foram cultivados em 3 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB) e incubados durante 48 h a 28°C. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para frascos de penicilina, previamente esterilizados em autoclave, contendo 10 tiras de papel de filtro (2 cm x 0,5 cm) cada. Os frascos foram vedados com rolha de borracha contendo um furo central preenchido com algodão, sendo então liofilizados durante 24 h.

3.4 Armazenamento dos isolados fúngicos

Os isolados fúngicos utilizados nos experimentos foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA, sendo incubados a 28 °C. As culturas também foram armazenadas pelo método descrito por Castellani (1963). Essa técnica consiste na estocagem de pedaços do meio de cultura contendo os isolados fúngicos em tubos de ensaio com água esterilizada, vedados e mantidos à temperatura ambiente.

3.5 Seleção de rizobactérias com potencial para a promoção do crescimento de plantas

3.5.1 Detecção e quantificação da produção de ácido indol-acético (AIA)

Para a determinação da produção de auxinas, utilizou-se como referência o método originalmente proposto por Bric et al. (1991), adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2003), com algumas modificações em relação ao meio de cultura utilizado, bem como as leituras dos valores das absorbâncias feitas em microplacas. Os isolados foram cultivados em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura Luria Bertani (LB: bacto-triptona, 10 g; extrato de levedura, 5 g; NaCl, 5 g e água destilada, 1000 mL; pH 7,5) suplementado com 1 g L^{-1} de L-triptofano. As rizobactérias foram incubadas a 28°C durante 24 h sob agitação constante. Adicionaram-se 1,5 mL dos isolados crescidos em meio LB mais L-triptofano a microtubos, os quais foram centrifugados a $9500 \times g$ durante 2 minutos. Foram depositados 100 μL do sobrenadante a poços de microplaca plástica de 96 poços, seguindo a adição de 100 μL do reagente de Salkowski, composto por 1 mL de FeCl_3 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e 49 mL de HClO_4 (35%). A leitura foi realizada em 530 nm, utilizando-se o leitor de microplacas Cary® 50 (Varian, Walnut Creek, CA, USA), 30 minutos após a adição do reagente de Salkowski. Para a obtenção da equação da curva padrão, utilizou-se AIA comercial. A coloração rosa-avermelhada das amostras indica a produção de auxinas. Os testes foram repetidos em triplicata para aqueles isolados que produziram AIA no ensaio inicial.

3.5.2 Detecção da solubilização de fosfato inorgânico

Para avaliar a capacidade das rizobactérias em solubilizar fosfato inorgânico, utilizou-se o método descrito por Katznelson e Bose (1959). O meio de cultura composto por glicose, 10 g; ágar, 20 g; asparagina, 2 g; MgSO_4 , 0,5 g; NaCl, 0,1 g; KCl, 0,1 g; extrato de levedura, 0,5 g; água destilada, 1000 mL e pH ajustado para 7,0 com NaOH 1N, foi esterilizado em autoclave e, após atingir 50°C, adicionaram-se

asépticamente mais 50 mL de solução esterilizada de K_2HPO_4 (10%) e 100 mL de solução esterilizada de $CaCl_2$ (10%). A reação entre as soluções produz um fino precipitado de $CaHPO_4$, que foi adicionado logo em seguida para placas de Petri. Transferiram-se até 12 isolados, em duplicata, para cada uma das placas de Petri, sendo cada uma delas considerada como uma unidade experimental. As estirpes foram incubadas a 28°C durante 15 dias. As colônias que formaram um halo claro ao seu redor foram consideradas solubilizadoras de fosfato inorgânico.

3.5.3 Quantificação da solubilização de fosfato inorgânico

Os isolados que apresentaram resultado positivo para a solubilização de fosfato inorgânico no teste anterior foram avaliados quantitativamente para esta característica, em meio de cultura líquido.

Para a quantificação da solubilização de fosfato de cálcio, empregou-se o meio de cultura líquido NBRIP (NAUTIYAL, 1999), composto por glicose, 10 g; $Ca_3(PO_4)_2$, 5 g; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 5 g; KCl, 0,2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25 g; $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 g; água deionizada, 1000 mL. O pH do meio foi ajustado para 7,0. Adicionaram-se 10 mL de meio NBRIP em erlenmeyers de 250 mL, procedendo-se a esterilização em autoclave. Os isolados bacterianos foram cultivados em 3 mL de meio de cultura KB por 24 h. Decorrido este período, os tubos foram agitados e, uma alíquota de 100 µL da suspensão bacteriana (aproximadamente 10^8 UFC mL⁻¹) foi inoculada em cada erlenmeyer. O controle consistiu em erlenmeyers contendo 10 mL de meio NBRIP adicionado de 100 µL do meio de cultura KB sem inóculo. Os frascos foram incubados a 28°C, durante 10 dias, sob agitação constante. Findo o tempo de incubação, foi verificado o pH do meio de cultura em cada tratamento. Em seguida, adicionou-se 1 mL do meio de cultura de cada tratamento em microtubos de 1,5 mL, os quais foram centrifugados a $9500 \times g$ durante 5 minutos. Em poços de microplaca plástica, adicionaram-se 29 µL do sobrenadante de cada tratamento, 114 µL de água deionizada e 57 µL do reagente vanado-molibdico (MALAVOLTA et al., 1989). O leitor de microplacas foi zerado utilizando-se o controle negativo constituído na adição de 29 µL do sobrenadante do meio NBRIP sem inóculo, 114 µL de água deionizada e 57 µL do reagente vanado-molibdico. A curva padrão foi

construída através do preparo de uma solução estoque de KH_2PO_4 e H_2SO_4 (10N), dissolvidos em água. A leitura das amostras foi feita em 420 nm, 10 minutos após a adição do reativo colorido.

3.5.4 Detecção da produção de fosfatases

Inicialmente preparou-se uma solução de difosfato de fenolftaleína (0,5%), a qual foi esterilizada por filtração em membrana 0,22 μm . Dois mililitros da solução de difosfato de fenolftaleína foram adicionados para cada 100 mL de meio de cultura TSA (Trypticase Soy Agar: triptona, 1,5 g; peptona de soja, 0,5 g; NaCl, 1,5 g; ágar, 15 g; completar o volume para 1000 mL; pH 7,3) esterilizado em autoclave e ainda fundente. O meio de cultura foi homogeneizado e vertido em placas de Petri. Os isolados bacterianos foram inoculados em pontos sobre a superfície das placas, seguindo a incubação por 24-48 h a 28°C. Para a obtenção do resultado, algumas gotas de hidróxido de amônia (8,4%) foram depositadas na tampa das placas de Petri, procedendo-se a avaliação após 15 minutos. A produção de fosfatases pelas estirpes foi evidenciada pela formação de um halo róseo ao redor das colônias (ROMEIRO, 2007).

3.5.5 Capacidade de crescimento dos isolados em meio de cultura livre de nitrogênio

Detecção do potencial de fixação assimbiótica de nitrogênio

Os isolados de rizobactérias foram inoculados em frascos de penicilina contendo 5 mL de meio de cultura JNFB semi-sólido (Tabela 2), sem fonte de nitrogênio, no qual excluiu-se o extrato de levedura (DÖBEREINER et al., 1995). Sete dias após a incubação a 28°C, os isolados que formaram uma película, característica de bactérias diazotróficas de vida livre, foram estriados em placas de Petri contendo o meio JNFB sólido, suplementado com 20 mg L^{-1} de extrato de levedura. Os isolados que cresceram no meio sólido foram então reinoculados no meio JNFB semi-sólido sem

nitrogênio. A reinoculação sucessiva dos isolados é realizada para confirmar se o crescimento não está ocorrendo à custa de reservas de nitrogênio das células, bem como para verificar a estabilidade dessa característica dos isolados (CATTELAN, 1999). Finalmente, os isolados que apresentaram a formação de película pela segunda vez foram selecionados para o teste de acúmulo de nitrogênio total em meio de cultura e análise de redução do acetileno (ARA).

Tabela 2 – Meios de cultura utilizados para a seleção de rizobactérias com potencial para a fixação assimbiótica de nitrogênio

Constituintes	Meios de cultura	
	JNFB	CC
Sacarose (g L ⁻¹)		5,0
Manitol (g L ⁻¹)		5,0
Lactato de sódio (mL, 50%, v/v)		0,6
Ácido málico (g L ⁻¹)	5,0	
K ₂ HPO ₄ (g L ⁻¹)	0,6	0,8
KH ₂ PO ₄ (g L ⁻¹)	1,8	0,2
MgSO ₄ .7H ₂ O (g L ⁻¹)	0,2	0,2
NaCl (g L ⁻¹)	0,1	0,1
CaCl ₂ .2H ₂ O (g L ⁻¹)	0,02	0,06
Extrato de levedura (mg L ⁻¹)	20	100
CuSO ₄ .5H ₂ O (mg L ⁻¹)	0,08	
ZnSO ₄ .7H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,4	
H ₃ BO ₃ (mg L ⁻¹)	2,8	
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,0	25
MnSO ₄ .H ₂ O (mg L ⁻¹)	2,35	
Na ₂ FeEDTA (mg L ⁻¹)	65,6	28
Biotina (mg L ⁻¹)	0,1	0,005
Pyridoxol – HCl (mg L ⁻¹)	0,2	
PABA (mg L ⁻¹)*		0,01
KOH (g L ⁻¹)	4,5	
Azul de bromotimol (mL, solução 0,5% em 0,2N KOH)	2,0	2,0
pH	6,8	7,0
Ágar (g L ⁻¹)		
- consistência semi-sólida	2,2	2,2
- consistência sólida	16	16
NH ₄ Cl ₃	1	

*ácido p-aminobenzóico (PABA).

Acúmulo de nitrogênio total em meio de cultura

Para a detecção do aumento da concentração de nitrogênio total (N-total) no meio de cultura livre deste elemento, os isolados foram inoculados, em triplicata, em tubos de ensaio contendo 3 mL do meio de cultura CC (carbono combinado) (RENNIE, 1981) modificado, contendo 1 g L⁻¹ de extrato de levedura. O isolado *Pseudomonas* S32154 foi utilizado como controle positivo (C54) (NERONI, 2007). As culturas foram mantidas a 28°C por 4 dias, sob agitação constante. Findo este período, procedeu-se a agitação dos tubos de ensaio e, 100 µL da suspensão bacteriana foram adicionados a frascos de penicilina contendo 5 mL do meio JNFB semi-sólido sem nitrogênio. Os frascos de penicilina foram mantidos por 6 dias nas condições já mencionadas. Após o cultivo das culturas em meio livre de nitrogênio, estas foram congeladas a -80°C. Os frascos com meio JNFB foram então levados ao liofilizador, onde permaneceram por 48 horas. Após a liofilização, as amostras foram homogeneizadas com uma espátula e alíquotas de aproximadamente 10 mg foram utilizadas para a determinação da concentração do N-total em analisador elementar (NCS Soil Analyzer Flash EA 1112 - Thermo Electron Corporation).

Análise de redução do acetileno (ARA)

A capacidade de fixação assimbiótica dos isolados também foi avaliada através da técnica de análise de redução do acetileno. Com essa finalidade, os isolados foram inoculados em frascos de penicilina, em duplicata, contendo o meio de cultura CC, sendo então incubados a 28°C durante 24 h. Decorrido esse período, foi injetado o gás acetileno (C₂H₂) correspondente a 10% do volume dos frascos. Esses foram então vedados com rolhas maciças e lacre metálico, evitando assim a liberação do gás. Os frascos foram incubados por mais 1 h nas condições apresentadas acima. A concentração de etileno (C₂H₄) foi avaliada em cromatógrafo a gás (Thermo Finnigan, modelo Trace 2000 GC, com duas colunas Porapack N).

3.5.6 Detecção da produção de sideróforos

As estirpes foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3 mL de meio de cultura KB líquido e mantidas durante 7 dias a 28°C, sob agitação constante. Após esse período, adicionou-se 1 mL das culturas em microtubos de 1,5 mL de capacidade. Os microtubos foram então centrifugados durante 5 minutos a aproximadamente 9500 × *g*. Adicionaram-se 100 µL do sobrenadante de cada cultura a poços de microplacas, além de mais 100 µL do reagente cromo azurol S (CAS) (ver Apêndice) (ALEXANDER; ZUBERER, 1991) sobre as amostras. Após 30 minutos, as placas foram avaliadas. A coloração alaranjada ou amarelada das amostras indica a produção de sideróforos pelos isolados. O meio de cultura KB, sem inóculo, foi utilizado como controle negativo.

3.5.7 Detecção da produção de quitinases

A capacidade dos isolados em produzir quitinases foi avaliada utilizando-se o meio de cultura descrito por Hsu e Lockwood (1975), que apresenta a quitina como única fonte de carbono (quitina, 4 g; K₂HPO₄, 0,7 g; KH₂PO₄, 0,3 g; MgSO₄.5H₂O, 0,5 g; FeSO₄.7H₂O, 0,01 g; ZnSO₄, 0,001 g; MnCl₂, 0,001 g; ágar, 20 g e água deionizada, 1000 mL). Depois de esterilizado em autoclave, o meio de cultura teve seu pH ajustado para 8,0, utilizando-se NaOH 5N esterilizado. Os isolados, se apresentarem um halo claro ao seu redor, são considerados como produtores de quitinases.

3.5.8 Rizobactérias antagonistas a fitopatógenos de espécies arbóreas

3.5.8.1 Detecção do potencial de biocontrole a *Fusarium oxysporum*

Para verificar o potencial e selecionar as rizobactérias mais promissoras como agentes de biocontrole, foram realizados ensaios de antagonismo *in vitro* frente ao fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, causador de tombamento em *Pinus* (Tabela 3). Para isso, foram inoculadas nas extremidades, pontualmente e equidistantes, três rizobactérias por placa de Petri, contendo o meio de cultura BDA. No centro da placa foi

adicionado um disco de 0,5 cm da cultura do patógeno. Esses discos foram retirados da borda da colônia do fungo, o qual estava crescendo ativamente no mesmo meio de cultura. Placas contendo apenas o disco da cultura fúngica no centro foram utilizadas como controle. As placas foram incubadas a 28°C, procedendo-se a avaliação no momento em que o fungo presente na placa controle atingisse o crescimento máximo (SHIOMI et al., 2008).

3.5.8.2 Quantificação do potencial antagônico de rizobactérias a *Fusarium oxysporum* e *Cylindrocladium candelabrum*

Os melhores antagonistas foram selecionados para a realização dos testes de pareamento em placas de Petri contra *F. oxysporum* e *C. candelabrum*. Assim, foi inoculado, a 1 cm da extremidade, um único isolado de rizobactéria por placa contendo o meio de cultura BDA. No lado oposto, a 1 cm da extremidade da placa, foi adicionado um disco de 0,5 cm da cultura do fitopatógeno. Placas contendo apenas o disco da cultura fúngica, inoculado a 1 cm da borda, foram utilizadas como controle. As placas foram incubadas a 28°C, procedendo-se a medição dos raios dos isolados fúngicos 15 dias após a inoculação das rizobactérias.

3.5.8.3 Quantificação do potencial antagônico de rizobactérias a *Cylindrocladium pteridis*

Devido ao crescimento irregular da cultura, o antagonismo a *C. pteridis* foi verificado através de seu crescimento em meio de cultura BDA contendo o metabólito secundário dos isolados bacterianos. Para a extração de metabólitos secundários termo-resistentes, livres de células bacterianas, procedeu-se a inoculação das rizobactérias em erlenmeyers contendo 30 mL de meio de cultura BD (batata-dextrose). Os frascos foram incubados a 28°C durante 7 dias sob agitação constante. Findo este período, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 9500 × g, durante 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana 1,2 µm. Foram adicionados 20 mL de cada metabólito secundário em 200 mL de meio BDA e homogeneizados, obtendo-

se uma concentração final igual a 10%. Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos, sendo novamente homogeneizados e vertidos em placas de Petri. Um disco de 0,5 cm de diâmetro da cultura de *C. pteridis* foi inoculado no centro da placa contendo o meio de cultura mais o metabólito. O controle consistiu apenas no meio de cultura BDA sem o metabólito secundário e o disco de 0,5 cm de diâmetro do isolado fúngico no centro da placa. As placas foram incubadas a 28°C, procedendo-se a medição do diâmetro dos isolados fúngicos, em dois pontos, 15 dias após a inoculação nas placas contendo o metabólito bacteriano.

Tabela 3 - Origem dos isolados fúngicos utilizados no presente estudo

Fungos	Origem	Local	Cedido por
<i>Cylindrocladium candelabrum</i>	<i>Eucalyptus</i> sp.	Monte Dourado - PA	ALFENAS, A.C.; ALFENAS, R.F.
<i>C. pteridis</i> (CMD 22.1)	<i>Eucalyptus</i> sp.	Monte Dourado - PA	ALFENAS, A.C.; ALFENAS, R.F.
<i>Fusarium oxysporum</i> (n° de acesso ao GenBank: FJ853142)	<i>Pinus</i> sp.	Colombo - PR	AUER, C.G.

3.6 Caracterização fenotípica dos isolados de rizobactérias através da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (Fatty Acid Methyl Ester - FAME)

Os isolados que se destacaram nos testes realizados anteriormente, apresentando características desejáveis de RPCP, foram submetidos à análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME) (SASSER, 2001). Inicialmente os isolados foram inoculados, através de estrias simples, em placas de Petri contendo o meio de cultura TSBA (Trypticase Soy Broth Agar, BBL, Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) e incubados a 28°C durante 24h. Em seguida, os isolados foram inoculados mais uma vez em meio de cultura TSBA (BBL) utilizando-se a técnica de esgotamento. Após o crescimento das culturas nas condições mencionadas acima, as colônias foram coletadas do terceiro quadrante e transferidas para tubos de ensaio com rosca (13 x 100 mm). Feito isso, iniciou-se o processo de saponificação, onde foi adicionado

1000 µL do reagente de saponificação (45 g de hidróxido de sódio, 150 mL de metanol e 150 mL de água deionizada) a cada tubo de ensaio contendo as células bacterianas, bem como um tubo vazio utilizado como controle. Os tubos foram lacrados com tampas revestidas com teflon, agitados durante 10 segundos e aquecidos em banho de água fervente (100°C) por aproximadamente 5 minutos, sendo resfriados em banho de água à temperatura ambiente. Após o resfriamento, os tubos foram novamente agitados durante 10 segundos e retornaram ao banho de água, sendo aquecidos por mais 25 minutos. Posteriormente ao resfriamento, adicionaram-se 2000 µL do reagente de metilação (325 g de ácido clorídrico 6 N e 275 mL de metanol) aos tubos os quais foram agitados durante 10 segundos e aquecidos durante 10 minutos a 80°C. Adicionaram-se 1250 µL do reagente de extração (200 mL de hexano e 200 mL de metil-terc-butil-éter) aos tubos resfriados e, em seguida, foram novamente vedados e centrifugados durante 10 minutos. A fase aquosa (inferior) foi descartada com o auxílio de pipetas Pasteur de vidro e haste longa. Foram adicionados 3000 µL do reagente de lavagem (10,8 g de hidróxido de sódio e 900 mL de água deionizada) à fase orgânica que permanece nos tubos, sendo tampados novamente e agitados por 5 minutos. Após agitação e centrifugação, cerca de 2/3 da fase orgânica foi transferida e repassada para tubos de vidro (vials) específicos para cromatografia. A análise dos ácidos graxos obtidos foi realizada em cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard (Agilent GC System Serie 6850). Deste modo, é apresentado um cromatograma e um relatório contendo o comprimento, a área de pico, além do tempo de retenção nomeado dos ácidos graxos.

Os isolados foram caracterizados através do programa de Identificação Microbiana MIDI (Biblioteca Sherlock®, TSBA6 versão 6.10, Microbial ID, DE, USA), no qual são comparados os ácidos graxos das amostras com os presentes no banco de dados, identificando assim, o micro-organismo desejado. As amostras que apresentarem um índice de similaridade (IS) igual ou superior a 0,5 e que estiverem separadas de no mínimo 0,100 entre o primeiro e o segundo micro-organismo presente na biblioteca, indicam boa qualidade e podem ser consideradas como identificadas (KUNITSKY et al., 2006).

3.7 Caracterização genotípica dos isolados de rizobactérias

3.7.1 Extração do DNA genômico

Os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura TSA, após 24h de incubação a 28°C, algumas colônias foram transferidas para microtubos de 1,5 µL, contendo 1 mL de água ultra-pura (Milli-Q®) esterilizada, os quais foram centrifugados por 30 segundos a 12000 × *g*. Procedeu-se a extração do DNA através do protocolo apresentado pelo *Bacterial DNA Isolation Kit* (Norgen Biotek Corporation).

3.7.2 BOX-PCR

A reação de BOX-PCR foi conduzida para um volume final de 25 µL, contendo 1 µL de DNA (aproximadamente 25 ng), 2 µL do *primer* BOX A1R (25 pmol) (5' – CTACGGCAAGGCGACGCTGACG – 3'), 2,5 µL de DMSO (dimetilsulfóxido), 2,5 µL de dNTP mix (2 mM), 4 µL (1mg mL⁻¹) de BSA (bovine serum albumine), 5 µL de tampão Gitschier 5X (RADEMAKER et al., 1998), 0,5 µL de Taq DNA polimerase e 7,5 µL de água ultra-pura (Milli-Q®) esterilizada. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (PCR Gene Pro 96 Gradiente, TC-E, Bioer) programado para um ciclo inicial de 95°C por 2 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 3 segundos, 92°C por 30 segundos, 50°C por 1 minuto, 65°C por 8 minutos, seguidos de uma extensão final de 65°C por 8 minutos. Os produtos de PCR foram revelados em agarose 1,5% (p/vol) em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), por 2 h a 50 V. Utilizaram-se 12 µL de produto de PCR, 2 µL de *Sybr(R) Green I nucleic A* (Invitrogen) e 2 µL de *Loading Buffer*. Como marcador de peso molecular foi utilizado o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) 100 bp. Os géis de agarose foram observados em transiluminador de luz ultra-violeta, os quais foram posteriormente digitalizados em Scanner Storm 845 (GE). O perfil de bandas obtidos no gel de agarose foi analisado utilizando-se o programa Diversity Database. O dendrograma foi gerado pelo programa Systat 11®.

3.7.3 Sequenciamento parcial do gene 16S rRNA

Amplificação do gene 16S rRNA

A extração do DNA genômico das estirpes bacterianas foi realizada como descrito no item 3.7.1. A reação para a amplificação do gene 16S rRNA foi conduzida para um volume final de 25 µL, contendo 1 µL de DNA (aproximadamente 25 ng), 1 µL do *primer* 8F (10 pmol) (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'), 1 µL do *primer* 1541R (10 pmol) (5' – AAGGAGGTGATCCAGCCGCA – 3'), 2,5 µL de PCR Buffer 10X - Mg, 2,5 µL de dNTP mix (2 mM), 0,75 µL de MgCl₂, 0,25 µL de Taq DNA polimerase e 16 µL de água ultra-pura (Milli-Q ®) esterilizada. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (PCR Gene Pro 96, com Gradiente, TC-E, Bioer) programado para um ciclo inicial de 94°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos, seguidos de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram revelados em agarose 1,5% (p/vol) em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA), por 1 h a 50 V. Utilizou-se 12 µL de produto de PCR, 2 µL de *Sybr(R) Green I nucleic A* (Invitrogen) e 2 µL de *Loading Buffer*. Como marcador de peso molecular utilizou-se o *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) 100 bp.

Purificação dos fragmentos de DNA e quantificação em gel de agarose

A purificação dos produtos de PCR foi feita utilizando-se o kit comercial *Invisorb Spin DNA Extraction Kit* (Invitex). A quantificação dos fragmentos purificados foi realizada aplicando-se em gel de agarose 1% em tampão TAE, 2 µL de produto de PCR, 1 µL de *Sybr(R) Green I nucleic A* (Invitrogen) e 2 µL de *Loading Buffer*. Como padrão de tamanho e concentração das bandas formadas, utilizou-se o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) 100 bp, comparando-o com a intensidade de cada amostra.

Reação de sequenciamento

A reação de sequenciamento foi conduzida em microplacas plásticas (96 poços) utilizando-se 2 µL (100 ng) de DNA do gene amplificado, 1 µL (10 pmol) do *primer* 63F (5' – CAGGCCTAA CACATGCAAGTC – 3') ou 1 µL (10 pmol) do *primer* 704R (5' – TCTACGSATTTCAACCCTAC – 3') por reação, 2 µL do tampão “*Save Money*”, 1 µL de *Dynamic ET Terminator* (GE Healthcare) e 4 µL de água ultra-pura (Milli-Q®) esterilizada. A reação de sequenciamento foi conduzida em termociclador programado para um ciclo inicial a 95°C durante 1 segundo, seguido de 25 ciclos a 95°C por 20 segundos, 55°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Purificação do gene 16S rRNA

Após a reação de sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados utilizando-se 2 µL de uma solução de acetato de sódio (NaAc) (3M; pH 9,0) e EDTA (0,5 M; pH 8,0) na proporção 1V:1V em cada poço. Em seguida a microplaca foi agitada durante 30 segundos, seguindo-se de centrifugação a 3250 × *g* durante 1 minuto. Adicionaram-se 60 µL de etanol absoluto gelado, seguindo-se de agitação. Procedeu-se a centrifugação da placa a 3250 × *g* por 45 min a 4°C. Em seguida, descartou-se o sobrenadante, a placa foi invertida, colocada sobre guardanapos de papel e centrifugada a 800 × *g* por 30 segundos. Posteriormente, adicionaram-se 150 µL de etanol 70% gelado, sendo centrifugada a 3250 × *g* durante 5 minutos a 4°C. Centrifugou-se a placa invertida a 800 × *g* por 30 segundos. Finalmente a placa foi armazenada em local seco e protegido da luz até que secasse completamente. Após a purificação, o precipitado foi re-suspendido em 10 µL de formamida e submetido ao sequenciador automático ABI 3730, 48 capilares (Applied Biosystems), obedecendo às instruções do fabricante.

Análise das sequências

Os cromatogramas obtidos pelo sequenciador foram processados pelo programa Codon Code Aligner®, onde foi utilizada a função “Clip Ends” para eliminar as extremidades das sequências que apresentavam baixa qualidade. As sequências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do GenBank, utilizando-se o software on-line Blast.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção dos isolados de rizobactérias

Ao total, foram obtidos 97 isolados de rizobactérias. Desses, 28 isolados (29%) foram selecionados em meio de cultura KB e 68 (70%) no meio de cultura BDA pelo método seletivo para o isolamento de rizobactérias formadoras de endósporos. O isolado RISP2, também obtido da rizosfera de *A. angustifolia*, foi incluído nos testes fenotípicos para a seleção de possíveis RPCP.

4.2 Seleção de rizobactérias com potencial para a promoção do crescimento de plantas

4.2.1 Detecção e quantificação da produção de ácido indol-acético (AIA)

Os isolados de rizobactérias obtidos pelo isolamento em meio de cultura KB apresentaram os melhores níveis de produção de AIA, enquanto que as estirpes formadoras de endósporos não apresentaram níveis expressivos do fitohormônio avaliado (Figuras 2 e 3).

Alguns autores sugerem que altas concentrações de triptofano causam uma resposta tóxica às células bacterianas, podendo inibir o crescimento destas, levar à alteração da coloração da cultura e a mudanças específicas na transcrição do DNA e na síntese de proteínas. Desse modo, a produção de auxinas seria uma resposta dos isolados aos níveis tóxicos de triptofano no ambiente (BAR; OKON, 1992).

As auxinas sintetizadas pelas rizobactérias afetam principalmente o sistema radicular, aumentando o tamanho, o número de ramificações de raízes adventícias e a área de contato com o solo, possibilitando que uma maior área deste seja explorada pela superfície radicular, disponibilizando assim grandes quantidades de nutrientes à planta. Essa, por sua vez, beneficia as rizobactérias através de elevados níveis de exsudatos radiculares (VESSEY, 2003).

Figura 2 – Produção de ácido indol-acético (AIA) em microplaca. Isolados de rizobactérias produtoras de AIA são evidenciados pela coloração que varia do rosa claro ao vermelho intenso

Figura 3 - Produção de ácido indol-acético (AIA) por rizobactérias em meio de cultura LB líquido após 24 h de incubação. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias de três repetições. Dados originais transformados em raiz quadrada de (x), obedecendo às regras de normalidade do programa estatístico SAS, versão 9.1. As barras representam os desvios padrões das médias

Não obstante, as auxinas induzem os tecidos do caule a se diferenciar em tecidos radiculares. No entanto, os efeitos das auxinas podem variar de acordo com as concentrações em que são liberadas no sistema radicular, e de acordo com a variedade vegetal, podem ter efeito inibitório sobre o crescimento da planta (SOLANO et al., 2008).

No presente estudo, o isolado R43 apresentou uma das maiores taxas de produção de AIA ($126 \mu\text{g mL}^{-1}$) nas condições utilizadas. Para verificar o comportamento da produção de AIA por essa estirpe, em relação a diferentes valores de L-triptofano, foram adicionadas concentrações crescentes deste precursor ao meio de cultura LB. Admiravelmente, o isolado R43 foi capaz de produzir elevadas concentrações de AIA nos meios de cultura contendo baixos níveis do precursor e até mesmo na ausência deste (Figura 4).

Figura 4 - Produção de ácido indol-acético (AIA) pelo isolado R43 em relação a diferentes concentrações do precursor L-triptofano presentes no meio de cultura LB líquido. Médias de 3 repetições. As barras representam os desvios padrões das médias

Yasmin et al. (2007) avaliando isolados de rizobactérias quanto à produção de AIA, selecionaram o isolado UPMSP9 como o mais hábil produtor do fitohormônio ($46,66 \mu\text{g mL}^{-1}$), na presença de L-triptofano. Os autores concluíram que alguns dos isolados avaliados são dependentes do precursor L-triptofano para a síntese de AIA. No hábitat natural, o requerimento de L-triptofano pelas rizobactérias é provido pela exsudação radicular.

Em outro estudo, Husen (2003) avaliando o potencial para a promoção do crescimento de isolados bacterianos de diferentes rizosferas, constatou que algumas estirpes não eram capazes de produzir AIA, enquanto que outras, como a linhagem TCaR 59, apresentaram elevadas concentrações do fitohormônio, aproximadamente $58,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, e presumiu a aplicação destas como promotoras do crescimento vegetal.

Correa et al. (2004), caracterizaram a diversidade fenotípica e genotípica da rizosfera de *Chamaecytisus proliferus* ssp. *proliferus* var. *palmensi*, uma leguminosa perene, e observaram que os melhores isolados produtores de AIA pertenciam ao gênero *Pseudomonas*.

Desse modo, os isolados selecionados no presente estudo, apresentam altos níveis de AIA, superando as estirpes encontradas pelos autores citados. Isto evidencia o potencial dessas rizobactérias na promoção do crescimento em *Araucaria angustifolia*.

4.2.2 Detecção e quantificação da solubilização de fosfato inorgânico

O fósforo (P) é um dos principais macronutrientes para o crescimento e desenvolvimento dos seres vivos. No entanto, a concentração de P solúvel no solo é baixa, cerca de 1 ppm, o que nos leva a buscar alternativas para a disponibilização deste elemento às plantas (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999).

No presente estudo, os isolados obtidos no meio de cultura KB apresentaram os resultados mais promissores quanto à solubilização de fosfato de cálcio (Figura 5). Dos 28 isolados obtidos nesse meio de cultura, 27 (96%) foram hábeis solubilizadores de fosfato inorgânico. Nenhuma das estirpes formadoras de endósporos foi capaz de solubilizar fosfato inorgânico nas condições observadas. Os valores de pH dos meios

de cultura NBRIP líquido variaram entre 3,2 (isolado R12) até 5,6 (R17), sendo que a produção de fosfato solúvel variou entre $57 \mu\text{g mL}^{-1}$ (R37) até níveis próximos a $450 \mu\text{g mL}^{-1}$ (R4) (Figuras 6 e 7).

Figura 5 – Solubilização de fosfato em meio NBRIP. A, controle (sem inóculo) - aspecto leitoso devido ao precipitado de cristais finos de fosfato de cálcio; B, isolado R18 - aspecto amarelado e dissolução dos cristais; C, isolado R37 - meio de cultura translúcido devido a dissolução dos cristais. D, a coloração amarelada nos poços da microplaca indica a presença de fosfato solúvel

Chen et al. (2006), utilizando o meio de cultura NBRIP para isolar bactérias solubilizadoras e quantificar os níveis de produção, obtiveram valores de pH entre 4,9 e 6,0 e fosfato solúvel de $31,5$ até $519 \mu\text{g mL}^{-1}$, avaliados 72h após a incubação dos isolados.

A solubilização de fosfato de cálcio pode estar relacionada principalmente à diminuição do pH do meio de cultura (Figura 6), ocasionada pela produção de ácidos orgânicos pelas rizobactérias. A eficiência na solubilização de fosfatos inorgânicos de baixa solubilidade deve-se, sobretudo, ao tipo de ácido orgânico que é liberado e, também, à combinação entre eles, com diferentes capacidades de dissolver as diversas formas de fosfato. Entre esses ácidos destacam-se os ácidos cítrico, propiônico, glucônico, láctico e succínico, os quais favorecem a solubilização de fosfatos (CHEN, 2006).

Em estudos buscando caracterizar o potencial de promoção do crescimento de bactérias nativas do solo de salinas na Argentina, Príncipe et al. (2007), testaram 72 isolados quanto à habilidade de solubilizar fosfato inorgânico. Como resultado, os autores observaram que 26% dos isolados solubilizaram fosfato mineral.

Souchie et al. (2005) avaliaram isolados de fungos e bactérias solubilizadores em meios de cultura contendo diferentes fontes de fosfato. Em relação a uma das formas de fosfato utilizadas neste experimento (CaHPO_4), os autores observaram que todos os isolados foram capazes de solubilizar o precipitado em meio sólido. Devido à baixa disponibilidade de fósforo em solos tropicais, a seleção de rizobactérias com esta habilidade seria uma alternativa promissora, principalmente no que se refere à ação destas no melhoramento da nutrição vegetal.

Figura 6 – Valores do pH em meio de cultura NBRIP líquido contendo isolados de rizobactérias. C, controle (meio NBRIP sem inóculo). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Médias de três repetições. Dados originais transformados em $(x)^2$, obedecendo às regras de normalidade do programa estatístico SAS, versão 9.1. As barras representam os desvios padrões das médias

Figura 7 – Solubilização de fosfato de cálcio por rizobactérias em meio de cultura NBRIP líquido. C, controle (meio NBRIP sem inóculo). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Médias de três repetições. Dados originais transformados em raiz quadrada de (x), obedecendo às regras de normalidade do programa estatístico SAS, versão 9.1. As barras representam os desvios padrões das médias

4.2.3 Detecção da produção de fosfatases

No presente estudo, 83 (85%) dos isolados testados foram capazes de produzir fosfatases (Figura 8; Tabela 4), o que demonstra a grande potencialidade desses isolados para a disponibilização de P na rizosfera. Assim, constatou-se que a técnica empregada apresenta grande praticidade em sua execução, possibilitando a seleção de um grande número de isolados capazes de produzir fosfatases em um curto período de tempo.

Sabe-se que os solos contêm uma ampla gama de substratos orgânicos, os quais são uma fonte de P para o crescimento vegetal. Formas orgânicas de P podem constituir de 30-50% do fósforo total de grande parte dos solos. O fósforo orgânico no solo está em grande parte na forma de fosfato inositol (fitato). No entanto, para que essas formas de P sejam disponibilizadas para a nutrição vegetal, devem ser

hidrolisadas a P inorgânico. A mineralização da maioria dos compostos orgânicos fosforados é realizada por meio de enzimas denominadas fosfatases. Além disso, sabe-se que a principal fonte de fosfatases no solo é de origem microbiana, e que a atividade desta enzima aumenta substancialmente na rizosfera (RODRIGUEZ; FRAGA, 1999). Assim torna-se imprescindível a busca por micro-organismos produtores dessas enzimas e o estudo desses mecanismos no ambiente rizosférico.

Bactérias produtoras de fosfatases também foram isoladas de várias rizosferas de plantas crescendo em solos vulcânicos no Chile. Os isolados foram caracterizados, pelo sequenciamento parcial do gene 16S rRNA, como *Enterobacter*, *Pantoea* e *Pseudomonas*, sendo que todos apresentaram a produção de hidrolases fosfóricas, como fosfatases alcalinas, fosfatases ácidas e fosfato hidrolase naftol. Esses dados indicam que os isolados mineralizam uma ampla gama de formas de P orgânico. Três cepas do gênero *Pseudomonas* que se destacaram como candidatos a prover incrementos de P, foram isoladas da rizosfera de diferentes plantas, sugerindo que estas bactérias são generalistas e poderiam beneficiar várias culturas. Também se aventou a possibilidade de se estudar a comunidade de bactérias não cultiváveis, através da detecção de genes envolvidos na mineralização de P, além de se utilizar os isolados mais promissores para o desenvolvimento de inoculantes, melhorando assim a disponibilidade de P em solos vulcânicos (JORQUERA et al., 2008).

Figura 8 – Isolados produtores de fosfatases são evidenciados pela formação de um halo róseo ao redor das colônias

Tabela 4 – Isolados produtores de fosfatases

Isolado	Produção de fosfatases	Isolado	Produção de fosfatases	Isolado	Produção de fosfatases	Isolado	Produção de fosfatases
R1	-*	R55	++	B25	+	B51	-
R3	+	R56	++	B26	+	B52	+
R4	+	R58	++	B27	-	B54	-
R5	+	B1	+	B28	+	B55	+
R6	++	B2	-	B29	+	B56	+
R7	++	B3	+	B30	+	B57	+
R8	++	B4	-	B31	+	B58	+
R9	++	B5	-	B32	+	B59	+
R11	++	B6	+	B33	++	B60	+
R12	++	B7	+	B34	+	B61	+
R17	++	B8	++	B35	+	B62	+
R18	++	B9	+	B36	+	B63	+
R19	-	B10	+	B37	+	B66	+
R20	-	B11	+	B38	+	B67	+
R23	+	B12	+	B39	+	B69	++
R24	+	B13	+	B40	+	B70	++
R25	+	B15	+	B41	-	B71	+
R36	-	B16	+	B42	++	B72	+
R37	+	B17	+	B43	+	B73	+
R38	+	B18	+	B44	+	B74	+
R41	+	B19	+	B45	-	B75	+
R43	+	B20	+	B46	+	RISP2	+
R44	++	B22	+	B48	-		
R45	-	B23	+	B49	+		
R54	+	B24	+	B50	+		

*, sem produção; +, produção; ++, elevada produção.

4.2.4 Capacidade de crescimento dos isolados em meio de cultura livre de nitrogênio

Vinte e um isolados (22%) foram capazes de crescer e formar película em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio (Figura 9). A consistência semi-sólida desse meio de cultura origina um ambiente micro-aeróbio, o qual favorece a atividade da nitrogenase (DÖBEREINER et al., 1995). No entanto, não houve diferença significativa em relação à concentração de nitrogênio total presente no meio de cultura do controle em relação às amostras avaliadas (Figura 10). O controle, contendo somente o meio JNFB sem nitrogênio, apresentou concentração de N total semelhante aos tratamentos que continham os isolados bacterianos, demonstrando a baixa sensibilidade do método empregado (Figura 10). Desse modo, os isolados formadores de película foram também submetidos à análise de redução de acetileno (ARA) para a confirmação da capacidade

diazotrófica. A análise de redução do acetileno foi positiva para 10 isolados, no entanto, apenas 3 (R36, B5 e B29) diferiram significativamente do controle, sendo consideradas como diazotróficas (Tabela 5) .

A nitrogenase, além de reduzir dinitrogênio (N_2) até a amônia, também é capaz de reduzir o acetileno (C_2H_2) até etileno (C_2H_4). Além disso, o acetileno não inibe outras reações metabólicas da célula bacteriana. Assim, a ARA é uma técnica extremamente sensível, sendo que nmoles por hora de etileno podem ser facilmente detectados e rapidamente analisados através de cromatografia gasosa (BODDEY et al., 2007).

No trabalho de Neroni (2007) buscou-se avaliar a ocorrência de bactérias diazotróficas no solo e nas raízes de *A. angustifolia*. Foram obtidos 73 isolados capazes de formar de película em meios de cultura livre de nitrogênio. Desses, somente 4 foram capazes de aumentar a concentração total de nitrogênio e apresentar a redução de acetileno para etileno “*in vitro*”. Discute-se a possibilidade de mais isolados obtidos serem diazotróficos, visto que poderiam fixar nitrogênio em condições não avaliadas. Assim, o resultado observado poderia estar relacionado às distintas características das estirpes, à limitação das fontes de carbono presentes nos meios de cultura, às variações na concentração do inóculo, bem como na análise de redução do acetileno, que considerou apenas um único tempo de incubação com o gás, ou ainda, a condições ligadas à concentração de oxigênio na atmosfera do frasco de incubação.

O trabalho de Barraquio et al. (1997) buscou selecionar estirpes de bactérias diazotróficas provenientes de tecidos de plantas de arroz (*Oryza sativa*) desinfestados superficialmente. O número mais provável (NMP) de bactérias totais por grama de tecido seco (raiz e colmo) foi avaliado em meio de cultura enriquecido com nitrogênio. Já o NMP de bactérias possivelmente diazotróficas foi verificado em meio de cultura semi-sólido deficiente em nitrogênio. Os autores verificaram uma redução de aproximadamente 90% no número de colônias obtidas em meio de cultura deficiente em nitrogênio, quando comparado ao meio de cultura suplementado com este elemento, sugerindo que menos de 10% das bactérias obtidas seriam realmente diazotróficas.

Figura 9 – Isolados formadores de película (setas) em meio de cultura livre de nitrogênio. A, isolado R1; B, isolado B5; C, isolado R37

Figura 10 – Crescimento dos isolados em meio de cultura JNFB semi-sólido livre de nitrogênio. C, controle negativo (meio de cultura JNFB); CR, controle positivo (meio JNFB + 100 μ L de meio CC Rennie); C54, controle positivo (*Pseudomonas* S3215). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias de três repetições. As barras representam os desvios padrões das médias

Tabela 5 – Atividade da nitrogenase dos isolados de rizobactérias avaliada através da análise da redução do acetileno (ARA)

Isolado	Atividade da nitrogenase*
B5	62,881a
B29	27,781b
R36	22,091bc
R23	9,694cd
R9	9,620cd
B12	7,740cd
R17	7,33cd
B59	6,38cd
R37	6,169cd
R1	3,873d
C	3,36d

* $\times 10^{-2}$ mmol mL⁻¹ h⁻¹ (C₂H₄). C, controle negativo (meio de cultura CC). Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Coeficiente de variação 27,5. Médias de duas repetições.

Em outro ensaio visando obter bactérias diazotróficas de tecidos internos de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), foram selecionados 32 isolados (MAGNANI et al., 2010). Desses, aproximadamente 90% não apresentaram atividade da enzima nitrogenase, sendo que somente 4 isolados, CC22 (*Klebsiella*), CC26 (*Enterobacter*), CC29 (*Pantoea*) e CC35 (*Pseudomonas*) foram capazes de reduzir acetileno para etileno. Grande parte dos isolados obtidos do interior dos tecidos caulinares e foliares foram caracterizados como pertencentes às famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae, respectivamente.

Estudos buscando identificar a comunidade de bactérias associadas às raízes da gramínea *Lasiurus indicus*, demonstraram que a maior parte das bactérias obtidas em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio, submetidas à análise de redução do acetileno e amplificação do gene *nifH*, o qual codifica a Fe-proteína que faz parte do complexo nitrogenase e é responsável pela fixação biológica do nitrogênio, não eram diazotróficas (CHOWDHURY et al., 2007). Somente três isolados foram positivos para a amplificação do gene *nifH*, apresentando elevada similaridade com os gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, através da análise das sequências do gene 16S rRNA. Pode-se levantar a hipótese de que muitas bactérias são

oligotróficas, e poderiam crescer apenas com elementos traços presentes no meio de cultura.

Alguns autores também relatam que a capacidade de formar película em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio não está obrigatoriamente associada à capacidade dos isolados em reduzir acetileno (THOMAS-BAUZON et al., 1982).

Recentemente, a diversidade de *Bacillus* e *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio foi avaliada em diferentes culturas de arroz no Rio Grande do Sul (BENEDUZI et al., 2008). O isolado SVPR30, identificado através do sequenciamento do gene 16S rRNA como *Bacillus* sp., foi selecionado para um experimento em casa de vegetação e apresentou aumentos significativos no comprimento de raízes e da parte aérea de plantas de arroz. Os autores verificaram que os grupos encontrados combinam a habilidade de fixar nitrogênio à capacidade de produção de AIA e à solubilização de fosfato, que resultam na promoção do crescimento. Finalmente, o isolado obtido pode ser útil para a formulação de novos inoculantes, aumentando assim a rentabilidade das culturas de arroz.

4.2.5 Detecção da produção de sideróforos

Dentre os isolados avaliados, 37 (38%) foram capazes de produzir sideróforos (Figura 11; Tabela 6). O meio de cultura KB, devido à ausência de Fe, induz a produção de sideróforos pelos isolados bacterianos. Deste modo, os sideróforos produzidos sequestram e complexam o Fe presente na solução CAS, liberando o corante, o que resulta na mudança da coloração do meio de cultura (ALEXANDER; ZUBERER, 1991).

O ferro é um nutriente essencial para todos os organismos vivos, entretanto, é relativamente insolúvel na solução do solo. Assim, para competirem por esse elemento limitante, os micro-organismos sintetizam e liberam sideróforos, moléculas de baixo peso molecular, que se ligam com alta afinidade ao Fe^{3+} (SIDDIQUI, 2005).

Figura 11 – A coloração amarelo-alaranjada indica a produção de sideróforos

Tabela 6 – Isolados produtores de sideróforos

Isolado	Produção de sideróforos	Isolado	Produção de sideróforos	Isolado	Produção de sideróforos	Isolado	Produção de sideróforos
R1	+	R55	+	B25	-	B51	+
R3	-	R56	+	B26	+	B52	-
R4	-	R58	-	B27	+	B54	+
R5	-	B1	-	B28	+	B55	+
R6	-	B2	+	B29	-	B56	+
R7	-	B3	-	B30	-	B57	-
R8	+	B4	-	B31	-	B58	-
R9	-	B5	-	B32	-	B59	-
R11	+	B6	-	B33	+	B60	+
R12	-	B7	-	B34	+	B61	-
R17	+	B8	-	B35	-	B62	-
R18	-	B9	-	B36	-	B63	-
R19	-	B10	+	B37	-	B66	-
R20	-	B11	+	B38	+	B67	-
R23	-	B12	-	B39	+	B69	-
R24	-	B13	+	B40	+	B70	+
R25	-	B15	-	B41	+	B71	+
R36	-	B16	-	B42	-	B72	-
R37	-	B17	-	B43	+	B73	-
R38	-	B18	+	B44	-	B74	+
R41	-	B19	-	B45	+	B75	-
R43	-	B20	+	B46	-	RISP2	+
R44	-	B22	+	B48	+		
R45	+	B23	-	B49	-		
R54	-	B24	+	B50	+		

*, sem produção; +, produção.

Dessa forma, os micro-organismos que complexam o Fe^{3+} , tornam-no menos disponível na rizosfera para outras espécies da comunidade microbiana, os quais não produzem sideróforos ou que elaborem sideróforos com menor afinidade por ferro, quando comparados às RPCP.

Assim, os sideróforos agem indiretamente no controle biológico de fitopatógenos, criando um ambiente mais favorável para a persistência das RPCP no solo (KLOEPPER et al., 1980).

Estudos evidenciaram a diversidade genética de rizobactérias produtoras de sideróforos na rizosfera de tabaco (TIAN et al., 2009). Os ensaios caracterizaram os isolados através da técnica de análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) e similaridade de sequências de 16S rRNA. Dentre os 354 isolados analisados, 85% foram positivos para sideróforos, indicando uma alta diversidade de rizobactérias para esta característica nesse ambiente. Constatou-se a predominância dos gêneros *Enterobacter* (24,7%) e *Pseudomonas* (44,5%). O isolado *Pseudomonas* sp. G-229-21 foi selecionado como um candidato promissor a ser aplicado em solos com baixos teores de ferro, atuando no controle biológico de doenças fúngicas que ocasionam graves perdas anuais na cultura do tabaco.

4.2.6 Detecção da produção de quitinases

Nenhum dos isolados testados foi capaz de produzir quitinases em meio de cultura contendo quitina como única fonte de carbono. Os mecanismos de inibição exercidos pelos isolados bacterianos podem estar relacionados à produção de sideróforos, antibióticos ou até mesmo a outras enzimas, como glucanases (SIDDIQUI, 2005).

4.2.7 Rizobactérias antagonistas a fitopatógenos de espécies arbóreas

Quanto ao antagonismo de rizobactérias contra *Fusarium oxysporum*, 45 (46%) dos isolados testados demonstraram pelo menos algum nível de inibição ao fitopatógeno desafiante (Tabela 7). Todos antagonistas foram obtidos pelo isolamento seletivo de rizobactérias formadoras de endósporos, além do isolado RISP2 (Figura 12). Deste modo, os isolados que apresentaram antagonismo acentuado a *F. oxysporum* no ensaio preliminar qualitativo, foram avaliados quantitativamente quanto à inibição de *F. oxysporum*, *C. candelabrum* e *C. pteridis*. Finalmente os isolados B4, B15, B27, B35, B36, B42 e RISP2 destacaram-se como excelentes antagonistas a *F. oxysporum* (Figura 13), *C. candelabrum* (Figura 14) e *C. pteridis* (Figuras 15 e 16), podendo ser utilizados em futuros ensaios *in vivo*.

Destaca-se também o poder de inibição dos metabólitos secundários testados contra *C. pteridis*, os quais mesmo após serem esterilizados a 121°C durante 20 minutos, surpreendentemente, não tiveram sua atividade antifúngica afetada, sugerindo uma característica de termo-estabilidade dos compostos. As diferenças morfológicas observadas nas colônias fúngicas crescendo em meio de cultura contendo metabólitos bacterianos podem indicar propriedades distintas destas substâncias (Figura 15).

Lee et al. (2008) obtiveram um antifúngico termoestável (esterilização a 121°C durante 3 horas) proveniente do isolado *Paenibacillus lentimorbus* WJ5. Os autores submeteram o composto a análises cromatográficas, que indicaram a natureza peptídica do metabólito.

Figura 12 – Avaliação do antagonismo de rizobactérias contra *Fusarium oxysporum*, A: controle; B: pareamento entre culturas; C: halo de inibição produzido pelo isolado B35

Tabela 7 – Ação antagonística de rizobactérias contra *Fusarium oxysporum* em meio de cultura BDA

Isolado	Antagonismo	Isolado	Antagonismo	Isolado	Antagonismo	Isolado	Antagonismo
R1	-	R55	-	B25	-	B51	-
R3	-	R56	-	B26	+	B52	-
R4	-	R58	-	B27	++	B54	-
R5	-	B1	+	B28	+	B55	-
R6	-	B2	-	B29	+	B56	+
R7	-	B3	+	B30	+	B57	+
R8	-	B4	++	B31	-	B58	+
R9	-	B5	-	B32	+	B59	-
R11	-	B6	-	B33	+	B60	+
R12	-	B7	+	B34	+	B61	+
R17	-	B8	-	B35	++	B62	+
R18	-	B9	+	B36	++	B63	-
R19	-	B10	+	B37	+	B66	+
R20	-	B11	-	B38	+	B67	+
R23	-	B12	-	B39	+	B69	-
R24	-	B13	-	B40	+	B70	+
R25	-	B15	++	B41	+	B71	-
R36	-	B16	+	B42	++	B72	-
R37	-	B17	-	B43	-	B73	+
R38	-	B18	+	B44	-	B74	-
R41	-	B19	+	B45	+	B75	+
R43	-	B20	+	B46	+	RISP2	++
R44	-	B22	+	B48	-		
R45	-	B23	-	B49	+		
R54	-	B24	+	B50	+		

*(-) sem inibição; (+) inibição moderada, fungo cessa seu crescimento ao tocar no antagonista; (++) formação de halo de inibição.

Em sistemas florestais, verificam-se grandes prejuízos na produção de mudas, principalmente no início do desenvolvimento, quando estas são mais susceptíveis ao ataque de fitopatógenos.

Os três fungos avaliados, *Cylindrocladium candelabrum*, *C. pteridis* e *Fusarium oxysporum*, apresentam grandes problemas às culturas de espécies arbóreas como *Araucaria*, *Eucalyptus* e *Pinus* (AUER et al., 2001). Os fitopatógenos do gênero *Cylindrocladium* e *Fusarium* podem causar o apodrecimento de raízes e tombamento de plântulas. Já o fitopatógeno *C. pteridis* é relatado por ocasionar queima de acículas, com lesões de coloração marrom-avermelhada, em *Pinus*.

Figura 13 – Antagonismo entre isolados de rizobactérias e *Fusarium oxysporum*. Raios (cm) dos isolados fúngicos na ausência (C, controle) ou presença das rizobactérias. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. Médias de três repetições. Dados originais transformados para $\log_{10}(x)$, obedecendo às regras de normalidade do programa estatístico SAS, versão 9.1. As barras representam os desvios padrões das médias

Figura 14 – Antagonismo entre isolados de rizobactérias e *Cylindrocladium candelabrum*. Raios (cm) dos isolados fúngicos na ausência (C, controle) ou presença das rizobactérias. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias de três repetições. As barras representam os desvios padrões das médias

Figura 15 – Aspecto de *Cylindrocladium pteridis* em meio de cultura BDA contendo metabólitos secundários de rizobactérias esterilizados em autoclave. A, controle; B, isolado B42 ; C, isolado B36; D, isolado RISP2

Figura 16 - Crescimento de *Cylindrocladium pteridis* em meio de cultura BDA contendo metabólitos secundários de rizobactérias. Diâmetros (cm) dos isolados fúngicos na ausência (C, controle) ou presença dos metabólitos. Médias de quatro repetições. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade. As barras representam os desvios padrões das médias

Mafia et al. (2009) avaliaram a eficiência de isolados de RPCP no controle biológico de *C. candelabrum* e *Rhizoctonia solani*, agentes causais da podridão de mini-estacas de eucalipto. Inesperadamente, o isolado Ca (*Pseudomonas fulva*), o qual não foi o mais eficiente no antagonismo aos fitopatógenos em placas de Petri, mostrou-se o mais promissor na supressão de *C. candelabrum*, quando inoculado em substrato para enraizamento de eucalipto. Os autores sugerem que fatores, como a capacidade de sobrevivência e de manutenção da densidade populacional bacteriana no substrato, podem estar envolvidos na eficiência antagônica da rizobactéria. Assim, o isolado Ca foi selecionado para futuros estudos de controle biológico em condições de viveiros de eucalipto.

Recentemente, Hynes et al. (2008), em seus estudos buscando isolar rizobactérias de culturas agrícolas no Canadá, através da caracterização dos mecanismos diretos e indiretos de promoção do crescimento, verificaram que 40 isolados (7%) demonstraram antagonismo a *Fusarium avenaceum*, 26 (5%) suprimiram o crescimento de *Pythium* sp. e 53 (9%) inibiram *Rhizoctonia solani*. Através da identificação dos isolados pela análise de ácidos graxos da membrana celular (FAME) e sequenciamento do gene 16S rRNA, os autores constataram que a maioria dos isolados capazes de inibir os fitopatógenos eram membros das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*. Os pesquisadores concluíram que os isolados analisados promoveram o crescimento e suprimiram patógenos de leguminosas e, portanto, poderiam ser possíveis candidatos ao desenvolvimento de inoculantes.

Além de fungos fitopatogênicos, as RPCP também têm sido aplicadas com sucesso no controle biológico de bactérias, nematóides e vírus causadores de doenças em plantas, em diferentes localidades do mundo (SIDDIQUI, 2005).

Por fim, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que os isolados caracterizados fenotipicamente possuem grande potencial biotecnológico, principalmente quanto aos mecanismos de promoção do crescimento e ao controle biológico de fungos fitopatogênicos, sendo selecionados para futuros estudos.

4.3 Caracterização fenotípica e genotípica dos isolados de rizobactérias

O dendrograma gerado através da análise dos mecanismos de ação originou 3 grandes grupos de rizobactérias, quando utilizada a distância euclidiana menor que 7 unidades (Figura 17). A distância euclidiana é uma medida de dissimilaridade amplamente empregada, e considera que quanto menor seu valor entre duas comunidades, mais próximas elas se estabelecem em termos de parâmetros quantitativos por classe (BROWER; ZAR, 1977).

Assim, o Grupo 1 relacionou-se aos isolados de rizobactérias com respostas positivas para um ou mais dos mecanismos diretos de promoção do crescimento, como síntese de AIA, solubilização de fosfato de cálcio, formação de película em meio de cultura livre de nitrogênio e produção de fosfatases. Já o Grupo 2 separou os isolados produtores de fosfatases e antagonistas a *F. oxysporum*. Finalmente, as linhagens de rizobactérias positivas para um ou mais dos mecanismos indiretos de ação, como produção de sideróforos e inibição de *F. oxysporum*, além da produção de fosfatases, situaram-se no Grupo 3. Os 3 grandes grupos apresentaram ao todo 24 perfis distintos, demonstrando elevada variabilidade fenotípica dos isolados.

A análise do perfil de ácidos graxos das rizobactérias mais promissoras revelou a presença de 4 famílias: Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Paenibacillaceae e Pseudomonadaceae e 4 gêneros, dentre eles: *Pseudomonas* (1 isolado), *Ewingella* (3), *Bacillus* (8) e *Paenibacillus* (1) (Tabela 8). Em alguns casos, uma mesma estirpe foi semelhante a diferentes gêneros da família Enterobacteriaceae, não sendo possível discriminar com precisão o gênero em questão.

Por outro lado, o sequenciamento parcial do gene 16s rRNA das rizobactérias apresentou similaridade a 3 famílias: Bacillaceae, Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae, e 5 gêneros: *Pseudomonas* (1), *Enterobacter* (7), *Ewingella* (3), *Rahnella* (1) e *Bacillus* (9) (Tabela 9). O isolado RISP2 apresentou baixa similaridade (0,3-0,4) para *Paenibacillus* pela análise de ácidos graxos da membrana, no entanto, demonstrou elevada similaridade (99%) a *Bacillus amyloliquefaciens*, pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.

Figura 17 - Dendrograma dos 97 isolados de rizobactérias agrupados de acordo com suas características fenotípicas: produção de AIA, solubilização de fosfato, formação de película em meio de cultura livre de nitrogênio, produção de fosfatases, síntese de sideróforos e antagonismo a *F. oxysporum*. Escala representa a distância euclidiana entre os isolados. Dendrograma gerado pelo programa Systat 11®

Tabela 8 – Identificação dos isolados através da análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular (FAME)

Isolado	FAME (TSBA6 versão 6.10)		IS*
	Família	Gênero/Espécie	
R1	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas fluorescens/syringae</i>	0,921/0,922
R4	Enterobacteriaceae	NI*	-
R7	Enterobacteriaceae	NI	-
R8	Enterobacteriaceae	<i>Ewingella americana</i>	0,850
R9	Enterobacteriaceae	NI	-
R11	Enterobacteriaceae	<i>Ewingella americana</i>	0,621
R12	Enterobacteriaceae	<i>Ewingella americana</i>	0,929
R17	Enterobacteriaceae	NI	-
R36	Enterobacteriaceae	NI	-
R43	Enterobacteriaceae	NI	-
R55	Enterobacteriaceae	NI	-
R56	Enterobacteriaceae	NI	-
B4	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>	0,756
B15	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>	0,667
B27	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>	0,645
B33	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>	0,757
B35	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>	0,765
B36	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>	0,612
B42	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>	0,737
B70	Bacillaceae	<i>Bacillus subtilis</i>	0,693
RISP2	Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus lentimorbus/macerans</i>	0,351/0,428

*NI = não identificado; Índice de similaridade: escala 0-1.

A análise genotípica através de BOX-PCR dos isolados mais promissores, apresentou dois grandes grupos, considerando a distância euclidiana menor que 3 unidades. O primeiro grupo, com 10 perfis distintos, compreendeu as rizobactérias obtidas em meio de cultura KB, além do isolado RISP2. Por outro lado, o segundo ramo, com apenas 1 perfil genético, agrupou os isolados formadores de endósporo, o que indica um posicionamento taxonômico muito próximo entre eles. Esse resultado comprova a robustez indicada pela técnica BOX-PCR, podendo agrupar isolados genotipicamente muito próximos. No entanto, vale ressaltar que embora os isolados tenham impressões genéticas semelhantes, boa parte destes demonstrou características fenotípicas distintas. De um modo geral, os perfis gerados pelo BOX-PCR corresponderam aos resultados obtidos pelo sequenciamento parcial do 16S rRNA. Assim, os perfis do grupo 1 agruparam os isolados 8, 11 e 12 como

geneticamente idênticos, posteriormente caracterizados como *Ewingella americana*, o mesmo foi observado para os isolados 55 e 56, similares a *Enterobacter aerogenes* e os isolados formadores de esporos B4, B15, B27, B35, B36, B42, que apresentaram a mesma impressão digital, identificados como *B. subtilis*. O isolado RISP2, apresentou-se como exceção, pois foi similar a *B. amyloliquefaciens* pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, mas localizando-se no grupo 1, diferentemente dos demais isolados formadores de endósporos.

Figura 18 – Caracterização genotípica dos isolados de rizobactérias através da técnica de BOX-PCR utilizando-se o *primer* BOXA1R. Escala representa a distância euclidiana entre os isolados. Dendrograma gerado pelo programa Systat 11®

Há de se avaliar o tamanho da região amplificada pela técnica de BOX-PCR, pois quanto mais impressões digitais forem obtidas, maior a confiabilidade da técnica para realizar o agrupamento dos isolados, bem como avaliar o nível de similaridade obtido entre eles. No presente estudo foram obtidos de 100 pb até 1000 pb, já Cottyn et al. (2001) obtiveram fragmentos maiores, de aproximadamente 200 pb até 4,5 kb, fornecendo mais informações sobre o perfil genético dos isolados.

Naik et al. (2008), utilizou-se a análise de BOX-PCR para caracterizar a diversidade funcional e genética de linhagens de *Pseudomonas* do grupo fluorescente solubilizadoras de fosfato. Foram avaliados 443 isolados de *Pseudomonas*, e destes, 80 foram positivos para a solubilização de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$). O agrupamento por BOX-PCR resultou em três ramos, e 26 perfis distintos, considerando-se a similaridade em 80%. Todos os isolados demonstraram variações no padrão de perfis obtidos entre os grupos, indicando elevada variabilidade genética entre as espécies solubilizadoras de fosfato. O sequenciamento parcial dos isolados por 16S rRNA identificou os isolados como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. fulva*, *P. monteilii*, *P. mosselii*, *P. plecoglossicida* e *P. putida*.

A comunidade de bactérias associadas a sementes de arroz foi caracterizada por Cottyn et al. (2001). Nesse trabalho foram obtidas um total de 428 bactérias, destas 244 gram-negativas e 184 bactérias gram-positivas. Através da análise de BOX-PCR, os autores observaram 82 impressões digitais distintas do DNA genômico para as bactérias gram-negativas e 69 para gram-positivas. Considerando-se que cada impressão digital represente uma população bacteriana, aproximadamente 151 populações ocorreram nas sementes de arroz. A identificação dos isolados através da análise de ácidos graxos da membrana celular (FAME) e testes bioquímicos revelou que o grupo de bactérias predominante pertencia à família *Enterobacteriaceae* (25%), seguidos pelos gêneros *Bacillus* spp. (22%) e *Pseudomonas* spp. (14%). Dentre os isolados testados, 17 apresentaram antagonismo a *Rhizoctonia solani* ou *Pyricularia grisea*, fitopatógenos da cultura de arroz, sendo que 8 antagonistas foram identificados como *B. subtilis*.

Tabela 9 - Caracterização genotípica dos isolados através do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA (fragmentos de aproximadamente 600-700 pares de bases)

Isolado	Base de dados			
	NCBI*	Acesso n°	E-value**	IS*** (%)
R1	<i>Pseudomonas</i> sp.	EU934229.1	0.0	99
R4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	GU265554.1	0.0	99
R7	<i>Enterobacter aerogenes</i>	GU265554.1	0.0	99
R8	<i>Ewingella americana</i>	AB273745.1	0.0	98
R9	<i>Rahnella</i> sp.	U88434.1	0.0	99
R11	<i>Ewingella americana</i>	AB273745.1	0.0	98
R12	<i>Ewingella americana</i>	AB273745.1	0.0	98
R17	<i>Enterobacter aerogenes</i>	FJ360760.1	0.0	98
R36	<i>Enterobacter amnigenus</i>	AB362305.1	0.0	99
R43	<i>Enterobacter aerogenes</i>	FJ360760.1	0.0	99
R55	<i>Enterobacter aerogenes</i>	GU265554.1	0.0	98
R56	<i>Enterobacter aerogenes</i>	GU265554.1	0.0	99
B4	<i>Bacillus subtilis</i>	EF032684.1	0.0	98
B15	<i>Bacillus subtilis</i>	FJ465167.2	0.0	98
B27	<i>Bacillus subtilis</i>	GU191916.1	0.0	99
B33	<i>Bacillus subtilis</i>	HM149534.1	0.0	99
B35	<i>Bacillus subtilis</i>	AF549498.1	0.0	99
B36	<i>Bacillus subtilis</i>	AF549498.1	0.0	99
B42	<i>Bacillus subtilis</i>	AF549498.1	0.0	99
B70	<i>Bacillus subtilis</i>	GU191916.1	0.0	99
RISP2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	FJ859694.1	0.0	99

*National Center for Biotechnology Information; ** O valor do e-value sugere que quanto mais próximo de zero este estiver, mais confiável é o alinhamento das sequências; ***Índice de similaridade: 0-100%.

O estudo conduzido por Krechel et al. (2002) buscou caracterizar a comunidade bacteriana associada à batata (*Solanum tuberosum*) e seu potencial antagônico aos fitopatógenos fúngicos *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani* e ao nematóide *Meloidogyne incognita*. Dentre os principais antagonistas, 27 foram identificados por FAME e 16s rRNA. Comparando-se os resultados obtidos pelas duas técnicas, concluiu-se que a caracterização não correspondeu para 6 isolados, que foram classificados em gêneros distintos, sendo que nenhuma estirpe foi classificada como pertencente a mesma espécie pelos dois métodos. Essas discrepâncias podem ocorrer devido às limitações do banco de dados do FAME, bem como, este ser desenvolvido principalmente para a análise de isolados clínicos, possuindo estirpes ambientais menos representativas quando comparado ao banco de dados on-line, como o GenBank.

O gênero *Pseudomonas*, como foi caracterizado o isolado R1 no presente estudo, é relatado como um dos principais grupos de RPCP, e possivelmente o mais estudado, principalmente no que se refere a sua versatilidade metabólica e capacidade de colonização radicular (DE WEERT et al., 2002). Diversas espécies do gênero *Pseudomonas* não requerem muitos fatores para o crescimento e podem desenvolver-se em meio de cultura mineral, necessitando apenas de um único componente como fonte de carbono e energia (STANIER et al., 1966; DOUDOROFF; PALLERONI, 1974). Em 1992, sete espécies do gênero *Pseudomonas*, pertencentes ao grupo II, de acordo com o sequenciamento do gene 16S rRNA (*P. caryophylli*, *P. cepacia*, *P. gladioli*, *P. mallei*, *P. pickettii*, *P. pseudomallei* e *P. solanacearum*), foram transferidas para o novo gênero *Burkholderia* (YABUUCHI, et al., 1992). Diferentemente do gênero *Pseudomonas*, que pertence à subdivisão Gamma do filo Proteobacteria, o gênero *Burkholderia* está agrupado na subdivisão Beta (COENYE et al., 2001).

Além disso, muitas espécies de *Pseudomonas* apresentam características desejáveis de RPCP, como a produção de hormônios reguladores do crescimento, produção de sideróforos e antagonismo a fungos de grande importância econômica (HYNES et al., 2008). Destacam-se as espécies *P. aeruginosa*, *P. corrugate*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* e *P. veronii*, por trazerem grandes benefícios à nutrição vegetal (HYNES et al., 2008; SING et al., 2010).

Já os integrantes da família Enterobacteriaceae, como foram caracterizados 11 dos isolados mais promissores, ao contrário do que normalmente possa se imaginar, não habitam somente o trato gastro-intestinal de vertebrados, sendo amplamente distribuídos na natureza, nos estados de vida livre, em uma grande variedade de habitats. Entre esses, pode-se destacar a ocorrência de enterobactérias na água, no solo, bem como associadas a plantas, como rizosféricas ou endofíticas, muitas delas referidas como RPCP (KIM et al., 1998; KHAN; DOTY, 2009; JANDA; ABBOTT, 2009).

O gênero *Enterobacter* pode ser encontrado nos mais diversos habitats, como na água, em plantas e no solo. Esse gênero apresenta uma complexa classificação taxonômica. Um dos isolados obtidos no presente estudo, *E. aerogenes*, é descrito como uma das espécies mais comuns do gênero, e que provavelmente poderá ser reclassificada como *Klebsiella*, enquanto que a espécie *E. agglomerans* já foi

classificada como um representante do gênero *Pantoea*. Outros representantes desse grupo foram realocados em novos gêneros e espécies, como *Ewingella americana*, *Leclercia adecarboxylata* e *Rahnella aquatilis* (JANDA; ABBOTT, 2009). O gênero *Enterobacter* é amplamente descrito como bactéria endofítica em diversas culturas, como cana-de-açúcar (MAGNANI et al., 2010), batata-doce (KHAN; DOTY, 2009) e citros (ARAÚJO et al., 2002).

Nesse sentido, outras rizobactérias selecionadas foram muito similares a espécie *Ewingella americana*, relatada por estar mais distribuída no ambiente do que se imaginava, sendo isolada como micro-organismo endofítico de milho (SHIOMI et al., 2008), parreiras (BULGARI et al., 2009), em sistemas de cultivo de cogumelos da espécie *Agaricus bisporus* (CHOWDHURY et al., 2007) e até mesmo de tanques de cloração (KHLEIFAT, 2006).

Em um estudo buscando selecionar bons agentes de biocontrole de *Pythium aphanidermatum*, foram avaliados 95 isolados endofíticos de milho. Desses, os 6 melhores antagonistas foram caracterizados através da análise do perfil dos ácidos graxos da membrana. O isolado P10F5, proveniente de tecidos foliares, foi caracterizado como *E. americana*. No entanto, os isolados *Bacillus agaradhaerens* 12R2 d/a e *Escherichia coli* GC subgrupo B P10F2, foram identificados como os antagonistas mais promissores para o biocontrole de fitopatógenos (SHIOMI et al., 2008).

A capacidade de *E. americana* em degradar compostos fenólicos foi verificada pela primeira vez por Khleifat (2006). Os compostos fenólicos, mesmo em baixas concentrações (1 mg L^{-1}) são extremamente tóxicos, e podem oferecer sérios riscos ao ambiente. Os autores sugerem que esse micro-organismo poderia ser um de poucos capazes de degradar o fenol, mesmo em altas concentrações, no ambiente em que foi isolado. Também foi identificado que *E. americana* apresenta uma curta fase de latência (lag) quando comparada a outras bactérias. Mesmo quando excluída a fonte de carbono do meio de cultura durante 24 horas, a bactéria diminuiu significativamente o tempo para a degradação do fenol.

No entanto, ao que tudo indica, este estudo avaliando RPCP em *A. angustifolia*, é um dos primeiros a ressaltar a habilidade de isolados de *E. americana* relacionada a

múltiplos mecanismos de ação favoráveis à nutrição vegetal, visto que se destacaram como bons solubilizadores de fosfato, produtores de AIA, fosfatases e sideróforos. Assim, os isolados R8, R11 e R12, similares a *E. americana*, foram selecionados como possíveis candidatos a RPCP para futuros ensaios.

Estudos filogenéticos buscando caracterizar a família Enterobacteriaceae através da avaliação do gene 16S rRNA, revelaram que a espécie *E. americana* estava relacionada como vizinha mais próxima de *Rahnella aquatilis* (SPRÖER et al., 1999). A espécie *Rahnella aquatilis* é descrita como fixadora de nitrogênio e capaz de solubilizar fosfato mineral, através da produção de ácido glucônico, sendo a solubilização mais elevada que a obtida pelas espécies *Erwinia herbicola* e *Burkholderia cepacia* (KIM et al., 1998). Esses resultados foram confirmados pelo presente estudo, pois o isolado R9, que apresentou elevada similaridade a *Rahnella* sp., foi capaz de solubilizar fosfato de cálcio, crescer em meio de cultura livre de nitrogênio, sintetizar AIA, além de ser um hábil produtor de fosfatases.

Outro grupo importante grupo de RPCR congrega os isolados do gênero *Bacillus*, como foram selecionadas e caracterizadas 8 estirpes no presente trabalho. Esse gênero compreende bactérias gram-positivas, formadoras de esporos resistentes às condições ambientais adversas, tais como, calor e baixos níveis de umidade, sendo aeróbias ou anaeróbias facultativas (CLAUS; BERKELEY, 1986).

Em 1991, o trabalho desenvolvido por Ash et al., através do sequenciamento do gene 16S rRNA de 51 espécies de *Bacillus*, revelou 5 grupos filogeneticamente distintos. Os autores puderam concluir que o gênero *Bacillus* é extremamente heterogêneo, e propuseram uma ampla revisão taxonômica que poderia dividi-lo em vários gêneros filogeneticamente distintos. Dois anos depois (ASH et al., 1993), os autores sugeriram que um dos grupos (Grupo 3) fosse denominado como um novo gênero, *Paenibacillus*, que significa “quase um *Bacillus*”. Muitas espécies de *Bacillus* até então conhecidas como fixadoras de nitrogênio, como *B. polymyxa* e *B. macerans*, foram transferidas para o gênero *Paenibacillus*, que atualmente conta com 89 espécies e 2 subespécies, sendo 14 descritas como diazotróficas (SELDIN, 2008).

Os isolados formadores de endósporos mais promissores foram caracterizados como pertencentes ao grupo *Bacillus subtilis*, que inclui um grande número de espécies,

agrupadas pelo sequenciamento do 16S rRNA e consideradas fisiologicamente muito similares e entre si. Pertencem a esse grupo as espécies *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. subtilis* ssp. *subtilis*, *B. subtilis* ssp. *spizizenii* e *B. vallismortis*. Por apresentarem características muito similares, a diferenciação entre *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* não pode ser realizada somente através de métodos bioquímicos, sendo mais recomendada a caracterização genotípica, como o sequenciamento do gene 16S rRNA e através da hibridização DNA-DNA (O'DONNELL et al., 1980; STACKEBRANDT; WOESE, 1979).

Quatro dessas espécies, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* e *B. subtilis*, são descritas pelo elevado potencial biotecnológico, especialmente no que se refere à produção de enzimas de grande interesse industrial, como as α -amilases termoestáveis. Essas enzimas são valorizadas pela indústria pelo papel fundamental que realizam na hidrólise de polissacarídeos como o amido e o glicogênio (PRAKASH; JAISWAL, 2010).

Estudos conduzidos por Adesemoye et al. (2009) demonstraram que o uso de rizobactérias pode reduzir os custos com a aplicação de fertilizantes e, conseqüentemente, seus impactos ambientais. Nesse sentido, foram aplicados em plântulas de tomate, os isolados *Bacillus amyloliquefaciens* IN937a e *Bacillus pumilus* T4, em consórcio, além do fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*. Buscou-se avaliar quais seriam os menores níveis de fertilizantes utilizados juntamente com os micro-organismos que correspondessem ao crescimento vegetal obtido com o emprego total dos fertilizantes. Constatou-se que a aplicação das rizobactérias e o uso de 75% da taxas de adubação produziu resultados semelhantes ao crescimento da planta em níveis de nutrientes (nitrogênio e fósforo) estatisticamente equivalentes ao emprego da adubação completa. Admiravelmente, o emprego dos isolados de *Bacillus* mais o fungo micorrízico arbuscular e 70% da dose de adubação, resultou no mesmo efeito que se obtém ao aplicar a dose completa de fertilizantes sem os inoculantes.

Finalmente, esses estudos comprovam a eficiência de RPCP e demonstram o vasto campo para a aplicação desses micro-organismos. Essas rizobactérias poderiam ser empregadas como inoculantes em viveiros para a produção de mudas de diversas espécies vegetais e até mesmo em programas de reflorestamento de áreas

degradadas. A aplicação desses micro-organismos como biofertilizantes poderia diminuir o uso de adubos químicos, um dos fatores responsáveis pelo encarecimento da produção. Assim, o emprego de RPCP proporcionaria uma grande economia, além de ser uma medida sustentável para o desenvolvimento de práticas agrícolas mais limpas. Destaca-se também a importância do uso de RPCP no combate a problemas fitossanitários, apresentando uma alternativa à aplicação de agrotóxicos, que além de serem custosos, podem contaminar o solo, sendo seu tratamento dispendioso, e em alguns casos, pouco eficiente. Assim, a utilização de RPCP para o controle biológico desses fitopatógenos seria uma alternativa a ser indicada.

Portanto, estudos subsequentes são necessários para elucidar detalhadamente os fenômenos pelos quais as rizobactérias beneficiam as plantas hospedeiras, já que um mesmo isolado pode apresentar múltiplos mecanismos de ação. Além disso, os isolados selecionados no presente estudo poderão ser utilizados em ensaios futuros, ao serem aplicados como inoculantes e testados em diferentes veículos para a aplicação, principalmente em espécies arbóreas, onde são necessários vários meses para se verificar os efeitos sobre a promoção do crescimento. Também surge a possibilidade dos isolados serem monitorados através de técnicas dependentes e independentes de cultivo, verificando-se assim a capacidade de sobrevivência dos isolados na rizosfera, bem como, avaliar possíveis mudanças na estrutura da comunidade bacteriana após o estabelecimento das estirpes.

5 CONCLUSÕES

- A rizosfera de *A. angustifolia* apresenta um grande número de bactérias com potencial para a promoção do crescimento de plantas;
- Os isolados bacterianos selecionados apresentaram diversas características relacionadas a mecanismos diretos de promoção do crescimento, como síntese de AIA, solubilização de fosfato de cálcio, produção de fosfatases e fixação de nitrogênio de modo assimbiótico;
- As rizobactérias selecionadas também demonstraram mecanismos indiretos de promoção do crescimento, como síntese de sideróforos e antagonismo a fungos fitopatogênicos de espécies arbóreas;
- Verificou-se a presença de diversas estirpes com múltiplos mecanismos de ação;
- Os testes fenotípicos e genotípicos concordaram em caracterizar os isolados mais promissores como integrantes das famílias Bacillaceae, Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae;
- A maioria dos isolados selecionados pertence a gêneros amplamente descritos na literatura como RPCP, no entanto, tudo indica que este é o primeiro estudo a evidenciar que *Ewingella americana* está relacionada a múltiplos mecanismos de ação favoráveis à nutrição vegetal.

REFERÊNCIAS

- ACINAS, S.G.; SILVIA, G.; MARCELINO, L.A.; KLEPAC-CERAJ, V.; POLZ, M.F. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 9, p. 2629–2635, May 2004.
- ADESEMOYE, A.O.; TORBERT, H.A.; KLOEPPER, J.W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, New York, v. 58, p. 921–929, May 2009.
- ALEXANDER, D.B.; ZUBERER, D.A. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 12, n. 1, p. 39-45, Sept. 1991.
- ANDRADE, G.; DELEIJ, F.A.; LYNCH, J.M. Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum* and arbuscular mycorrhizae on pea. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, p. 311–316, 1998.
- ARAÚJO, W.L.; MARCON, JR.; MACCHERONI, W.J.; VAN ELSAS, J.D.; VAN VUURDE, J.W.L.; AZEVEDO, J.L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 10, p. 4906-4914, Oct. 2002.
- ASH, C.; FARROW, J.A.E.; WALLBANKS, S.; COLLINS, M.D. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small subunit ribosomal RNA sequences. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 13, p. 202-206, 1991.
- ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M.D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test - proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. **Antonie van Leeuwenhoek**, Dordrecht, v. 64, p. 253-260, 1993.
- AUER, C.G.; GRIGOLETTI JÚNIOR, A., A.; SANTOS, Á.F. **Doenças em pinus: identificação e controle**. Colombo: Embrapa Florestas, 2001. 28 p. (Embrapa Florestas. Circular Técnica).
- BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudation in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 57, p. 233-256, 2006.
- BANCO REGIONAL DE DESENVOLVIMENTO DO EXTREMO SUL. Agência de Florianópolis. Gerência de Planejamento. **Cultivo da *Araucaria angustifolia*: análise de viabilidade econômico-financeira**. Florianópolis, 2005. 53 p.

BARRAQUIO, W.L.; REVILLA AND, L.; LADHA, J.K. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 194, p. 15–24, 1997.

BARRIUSO, J.; PEREYRA, M.T.; LUCAS GARCÍA, J.A.; MEGÍAS, M., GUTIERREZ MANÉRO, F.J.; RAMOS, B. Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus*-*Pinus* sp. **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 82–89, 2005.

BAR, T; OKON, Y. Induction of indole-3-acetic acid synthesis and possible toxicity of tryptophan in *Azospirillum brasilense* sp7. **Symbiosis**, Rehovot, v. 13, n. 1/3, p. 191-198, 1992.

BAZZICALUPO, M.; OKON, Y. Associative and endophytic symbiosis. In: PEDROSA, F.; HUNGRIA, M.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Dordrecht: Kluwer Academic, 2000. p. 409-410.

BENEDUZI, A.; PERES, D.; VARGAS, L.K.; ZANETTINI, M.H.; PASSAGLIA, L. Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 39, p. 311-320, 2008.

BENT, E.; TUZUN, S.; CHANWAY, C.P.; ENEBAK, S. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.47, p.793–800, 2001.

BETTIOL, W. Isolamento seletivo de *Bacillus*. In: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M.V. (Ed.). **Métodos de seleção de microrganismos antagônicos a fitopatógenos**. Jaguariúna: EMBRAPA, 1995. p. 35-36.

BLUM, H.E.H. Ecologia de *Araucaria angustifolia* e futuras condições de reflorestamento no sul do Brasil. **Brasil Madeira**, Curitiba, v. 7, p. 10-12, 1977.

BODDEY, L.H.; BODDEY, R.M.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. **A avaliação da fixação biológica de N₂ associada a leguminosas e não-leguminosas utilizando a técnica da redução do acetileno: história, teoria e prática**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 43 p. (EMBRAPA Agrobiologia. Documentos, nº 245).

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria Nº 37-N, de 03 de abril de 1992. **Reconhece como lista oficial das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção a relação que apresenta**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/proge/index.php?id_menu=19>. Acesso em: 12 fev. 2008.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, n. 2, p. 535–538, 1991.

BRINGHURST, R.M.; CARDON, Z. G.; GAGE, D.J. Galactosides in the rhizosphere: Utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 8, p. 4540-4545, 2001.

BROWER, J.E.; ZAR, J.H. **Field & laboratory methods for general ecology**. 2nd ed. Dubuque: Wm. C. Brown Publ., 1977. 226 p.

BULGARI, D.; CASATI, P.; BRUSETTI, L.; QUAGLINO, F.; BRASCA, M.; DAFFONCHIO, D.; BIANCO, P.A. Endophytic bacterial diversity in grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves described by 16S rRNA gene sequence analysis and length heterogeneity-PCR. **The Journal of Microbiology**, Dordrecht, v. 47, n. 4, p.393-401, Aug. 2009.

BURR T.J.; SCHROTH, M.N.; SUSLOW, T.V. Increased potato yields by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 68, p. 1377-1383, 1978.

CALDEIRA, M.V.W.; WATZLAWICK, L.F.; SOARES, R.V.; VALÉRIO, A.F. Teores de micronutrientes em espécies arbóreas da Floresta Ombrófila Mista Montana - General Carneiro/PR. **Ambiência - Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**: Guarapuava, v. 2, n. 1, p. 29-50, jan./jun. 2006.

CARDOSO, E.J.B.N. **Biodiversidade vegetal e de organismos edáficos em ecossistemas de *Araucaria angustifolia* naturais e impactados no Estado de São Paulo**. Piracicaba: ESALQ, 2004. 23 p. Projeto temático versão equipe processo FAPESP 01/05146-6.

CARVALHO, P.E.R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Colombo, Paraná, Brasil. EMBRAPA, 1994. 639 p.

CASTELLANI, A. Further researches on the long viability and growth of many pathogenic fungi and some bacteria in sterile distilled water. **Mycopathologia**, Den Haag, v. 20, n. 1/2, p. 1-6, Aug, 1963.

CATTELAN, A.J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 199. 36 p. (Embrapa Soja. Documentos, 139).

CHANWAY, C.P. Inoculation of tree roots with PGPR soil bacteria: an emerging technology for reforestation. **Forest Science**, Washington, v. 43, n. 1, p. 99-112, Feb. 1997.

CHEN, Y.P.; REKHA, P.D.; ARUN, A.B.; SHEN, F.T.; LAI, W.A.; YOUNG, C.C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 33-34, Nov. 2006.

CHOWDHURY, P.R.; PAY, J.; BRAITHWAITE, M. Isolation, identification and ecology of *Ewingella americana* (the causal agent of internal stipe necrosis) from cultivated mushrooms in New Zealand. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 36, n. 5, p. 424-428, Aug. 2007.

CHOWDHURY, S.P.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; TRIPATHI, A.K. Identification of diazotrophs in the culturable bacterial community associated with roots of *Lasiurus sindicus*, a perennial grass of Thar Desert, India. **Microbial Ecology**, New York, v. 54, n. 1, p. 82-90, Jan. 2007.

CLAUS, D.; BERKELEY, R.C.W. Genus *Bacillus* Cohn. In: SNEATH, P.H.A. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins, 1986. v. 2, p. 110-539.

COENYE, T.; VANDAMME, P.; GOVAN, J.R.W.; LIPUMA, J.J. Taxonomy and Identification of the *Burkholderia cepacia* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, n. 10, p. 3427-3436, Oct. 2001.

CORREA, J.D.; BARRIOS, M.L.; GALDONA, P.R. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, n. 1/2, p. 261-272, 2004.

COTTYN, B.; REGALADO, E.; LANOOT, B.; DE CLEENE, M.; MEW, T.W.; SWINGS, J. Bacterial Populations Associated with Rice Seed in the Tropical Environment. **Phytopathology**, St. Paul, v. 91, n. 3, p. 282-292, 2001.

DE WEERT, S.; VERMEIREN, H.; M. MULDER, I.H.; KUIPER I.; HENDRICKX, G.; BLOEMBERG, V.; VANDERLEYDEN, J.; DE MOT, R.; LUGTENBERG, B.J.J. N. Flagella-driven chemotaxis toward exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 15, p. 1173-1180, 2002.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa, SPI, 1995. 60 p.

DOUDOROFF, M.; PALLERONI, N.J. Genus *Pseudomonas*. In: BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1974. p. 217-243.

EMBRAPA. **Cultivo do pinheiro-doparaná**. 2003. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pinheiro-do-Parana/CultivodoPinheirodoParana/index.htm>>. Acesso em: 22 ago. 2005.

ENEBAK, S.A.; WEI, G.; KLOEPPER, J.W. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on loblolly and slash pine seedlings. **Forest Science**, Washington, v. 44, n. 1, p.139-144, Feb. 1998.

FARJON, A. ***Araucaria angustifolia***. In: IUCN 2009. 2006 IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/search/details.php/32975/all>>. Acesso em: 05 jul. 2009.

FLORES, H.E.; WEBER, C.; PUFFETT, J. Underground plant metabolism: the biosynthetic potential of roots. In: WASEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAZI, U. **Plant roots: the hidden half**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 769–781.

FREITAS, S.S. **Rizobactérias e suas interações com plantas e microrganismos**. 1994. 112 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

FREITAS, S.S.; MELLO, A.M.T.; DONZELI, V.P. Promoção do crescimento de alface por rizobactérias. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 1, p. 61-70, 2003.

GOLFARI, L. Coníferas aptas para reflorestamento nos Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. **Brasil Florestal**, Brasília, n. 1, p. 1-71, out. 1971.

GOMES, A.M.A.; MARIANO, R.L.R.; SILVEIRA, E.B.; MESQUITA, J.C.P. Isolamento, seleção de bactérias e efeito da utilização de *Bacillus* spp. na produção de mudas orgânicas de alface. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 4, p. 699-703, 2003.

GOTO, K.; KATO, Y.; ASAHARA, M.; YOKOTA, A. Evaluation of the hypervariable region in the 16S rDNA sequence as an index for rapid species identification in the genus *Paenibacillus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 48, p.281–285, 2002.

GOTO, K.; MOCHIDA, K.; ASAHARA, M.; SUZUKI, M.; YOKOTA, A. Application of the hypervariable region of the 16S rDNA sequence as an index for the rapid identification of species in the genus *Alicyclobacillus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 48, p. 243–250, 2002.

GOTO, K.; OMURA, T.; HARA, Y.; SADAIE, Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. **Journal of General and Applied Microbiology**, Tokyo, v. 46, p. 1–8, 2000.

GRIMES, H.D.; MOUNT, M.S. Influence of *Pseudomonas putida* on nodulation of *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 16, p. 27-30, 1984.
 HAAS, D.; DÉFAGO, G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 4, p. 307-319, Mar. 2005.

HSU, S.C.; LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 29, n. 3, p. 422-426, 1975.

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**, Malden, v. 5, p. 825-762, 1991.

HUSEN, E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, Cibinong, v. 4, n. 1, p. 27-31, 2003.

HYNES, R.K.; LEUNG, G.C.Y.; HIRKALA, D.L.M.; NELSON, L.M. Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 54, n. 4, p. 248-258, Apr. 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro, 1992. 92 p. (Série Manuais Técnicos em Geociências, 1).

JANDA, J.M.; ABBOTT, S.L. The family Enterobacteriaceae. In: GOLDMAN, E.; GREEN, L.H. (Ed.) **Practical handbook of microbiology**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. chap. 17, p. 217-229.

JORQUERA, M.A.; HERNÁNDEZ, M.T.; RENGEL, Z.; MARSCHNER, P.; MORA, M.L. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil. **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 44, p. 1025–1034, 2008.

KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L.V.; SHAPOSHNIKOV, A.I.; MAKAROVA, N.; LUGTENBERG, B. Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v. 19, n. 10, p. 1121-1126, 2006.

KAMILOVA, F.; VALIDOV, S.; AZAROVA, T.; MULDER, I.; LUGTENBERG, B. Enrichment for enhanced competitive root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 7, p. 1809-1817, 2005.

- KATAOKA, M.; UEDA, K.; KUDO, T.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 151, p. 249–255, 1997.
- KATZNELSON, H.; BOSE, B. Metabolic activity and phosphate dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non rhizosphere soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 5, p. 79-85, 1959.
- KHAN, Z.; DOTY, S.L. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 322, p. 197-207, Sept. 2009.
- KHLEIFAT, K.M. Biodegradation of phenol by *Ewingella americana*: effect of carbon starvation and some growth conditions. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 41, p. 2010–2016, 2006.
- KIM, K.Y.; JORDAN, D.; KRISHNAN, H.B. Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 159, p. 121-127, 1998.
- KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Milwaukee, v. 44, p. 301-307, Aug. 1954.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TIENTZE, M.; SCHROTH, M.N. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. **Nature**, London, v. 286, p. 885-886, 1980.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PLANT PATHOGENIC BACTERIA, 4., 1978, Angers. **Proceedings...** Angers: Institute National de la Recherche, 1978. v. 2, p. 879-882.
- KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, Woodbury, v. 5, p. 408-418, 1995.
- KRECHEL, A.; FAUPEL, A.; HALLMANN, J.; ULRICH, A.; BERG, G. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 9, p. 772–786, 2002.
- KUNITSKY, C; OSTERHOUT, G.; SASSER, M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock Microbial Identification System. In: MILLER, M. (Ed.). **Encyclopedia of rapid microbiological methods**. Bethesda: PDA, 2006. v. 3, p. 1-18.

LAMMEL, D.R.; BRANCALION, P.H.S.; DIAS, C.T.S.; CARDOSO, E.J.B.N. Rhizobia and other legume nodule bacteria richness in Brazilian *Araucaria angustifolia* forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, p. 400-408, July/Aug. 2007.

LEE, Y.K.; SENTHILKUMAR, M.; KIM, J.H.; SWARNALAKSHMI, K.; ANNAPURNA, K.; Purification and partial characterization of antifungal metabolite from *Paenibacillus lentimorbus* WJ5 o. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 24, p. 3057–3062, 2008.

MACHADO, S.A.; SIQUEIRA, J.D.P. Distribuição natural da *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In: IUFRO MEETING ON FORESTRY PROBLEMS OF THE GENUS ARAUCARIA, 1., 1979, Curitiba. **Forestry problems of the genus *Araucaria***. Curitiba: FUPEF, 1980. p. 4-9.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.M.; BINOTI, D.H.B.; MAFIA, G.M.V. Plant growth promoting rhizobacteria as agents in the biocontrol of eucalyptus mini-cutting rot. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 10-17, 2009.

MAFIA, R.G.; ALFENAS, A.C.; MAFFIA, L.A.; FERREIRA, E.M.; SIQUEIRA, L. de. Efeito de rizobactérias sobre o enraizamento e crescimento de clones de eucalipto em diferentes condições de propagação clonal. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 3, n. 5, p.813-821, set./out. 2007

MAGNANI, G.S.; DIDONET, C.M.; CRUZ, L.M.; PICHETH, C.F.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. Diversity of endophytic bacteria in Brazilian sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 1, p. 250-258, 2010.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. Metodologia para análise de elementos em material vegetal. In: _____. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1989. p. 135-189.

MALUCHE-BARETTA, C.R.D. **Diversidade microbiana em solos sob florestas de *Araucaria angustifolia***. 2007. 184 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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

MATTOS, J.R. **O pinheiro brasileiro**. 2. ed. Santa Catarina: Princesa, 1994. v. 1, 225 p.

MELO, I.S. Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas: descrição e potencial de uso na agricultura. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA CPMA, 1998. cap. 3, p. 87-116.

MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Spore density and root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in preserved or disturbed *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. ecosystems. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 4, p. 380-385, Jul./Aug. 2006.

MOREIRA, M.; BARETTA, D.; TSAI, S.M.; GOMES-DA-COSTA, S.M.; CARDOSO, E.J.B.N. Biodiversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi in *Araucaria angustifolia* forest. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 64, n. 4, p. 393-399, July/Aug. 2007.

NAIK, P.R.; RAMAN, G.; NARAYANAN, K.B.; SAKTHIVEL, N. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads isolated from rhizospheric soil. **BioMed Central Microbiology**. Publish online: 20 December, 2008.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Malden, v. 170, n. 1, p. 265-270, Jan. 1999.

NERONI, R.F. **Diversidade de bactérias diazotróficas associadas à *Araucaria angustifolia* no Estado de São Paulo**. 2007. 60 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

O'DONNELL A.G.; NORRIS J.R.; BERKELEY R.C.W.; CLAUS D.; KANEKO T.; LOGAN N.A.; NOZAKI, R. Characterization of *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus amyloliquefaciens* by pyrolysis gas-liquid chromatography, deoxyribonucleic acid - deoxyribonucleic acid hybridization, biochemical tests and API Systems. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berkshire, v. 30, p. 448–459, 1980.

PARQUE ESTADUAL DAS ARAUCÁRIAS. **Plano de manejo**. Santa Catarina, FUNDAÇÃO DO MEIO AMBIENTE – FATMA, set. 2007. Disponível em: <http://www.fatma.sc.gov.br/educacao_ambiental/araucarias.htm>. Acesso em: 11 fev. 2008.

PRAKASH, O.; JAISWAL, N. α -Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. **Chemistry and Materials Science**, Varanasi, v. 160, n. 8, p. 2401–2414, 2010.

PRÍNCIPE, A.; ALVAREZ, F.; CASTRO, M. G.; ZACHI, L.; FISCHER, S. E.; MORI G.B.; JOFR, E. Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of Argentina. **Current Microbiology**, New York, v. 55, p. 314–322, 2007.

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; de BRUIJN, F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A.D.L; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUIJN, F.J. (Ed.). **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p. 1-26.

RENNIE, E.M. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (nitrogen-fixing) bacteria in soils. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 27, n. 1, p. 8-14, Jan.1981.

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

RODRÍGUEZ-DÍAZ, M.; RODELAS, B.; POZO, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. A review on the taxonomy and possible screening traits of plant growth promoting rhizobacteria. In: AHMAD, I.; PICHTEL, J.; HAYAT, S. (Ed.). **Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. chap. 4, p. 55-80.

ROMEIRO, R.S. **Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. v. 1, 172 p.

SASSER, M. **Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids**. Newark: MIDI Inc., 2001. 6 p. (Technical Note, 101).

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, p. 1-17, Jan. 2004.

SCHUMACHER, M.V.; CALIL, F.N; VOGEL, H.L.M. (Org.). **Silvicultura aplicada**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. 120 p.

SEIBERT, P.; NEGREIROS, O.C.; BUENO, R.A.; EMMERICH, W.; MOURA NETTO, B.V.; MARCONDES, M.A.P.; CESAR, S.F.; GUILLAUMON, J.R.; MONTAGNA, R.A.A.; BARRETO, N.J.C.B.; GARRIDO, M.A.O.; MELLO FILHO, L.E.; EMMERICH, M.; MATTOS, J.R.; OLIVEIRA, M.C.; GODOI, A. **Plano de manejo do Parque Estadual Campos de Jordão**. São Paulo: Instituto Florestal, 1975. 148 p. (Boletim Técnico do Instituto Florestal, 19).

SEITZ, R.A. Crow development of *Araucaria angustifolia* in its natural environment during sixty years. In: FIJIMORI, T., WHITEHEAD, D. **Crow and canopy structure in relation to productivity**. Ibaraki: Forestry and Forest Products Research Institute, 1986. p. 129-145.

SELDIN, L. *Paenibacillus* fixadores de nitrogênio. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N.P.; SANTOS, A.E.R.S. (Org.). **Microorganismos e agrobiodiversidade**: o novo desafio para a agricultura. Guaíba: AgroLivros, 2008. v. 1, cap. 11, p. 259-276.

SHARIFI-TEHRANI, A.; ZALA, M.; NATSCH, A; MOENNE-LOCCOZ, Y.; DEFAGO, G. Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinolproducing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 104, n. 7, p. 631-643, 1998.

SHIMIZU, J.Y.; OLIVEIRA, Y.M.M. **Distribuição da variação e usos dos recursos genéticos de araucária no Sul do Brasil**. Curitiba: EMBRAPA; URPFCs, 1981. 9 p.(EMBRAPA. Documento, 4).

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

SIDDIQUI, Z.A. PGPR: Prospective biocontrol agents of plant pathogens. In: _____. (Ed.). **PGPR: biocontrol and biofertilization**. Dordrecht: Springer, 2005. chap. 4, p. 111-141.

SILVA, H.D. da; BELLOTE, A.F.J.; FERREIRA, C.A.; BOGNOLA, I. Recomendação de solos para *Araucaria angustifolia* com base nas suas propriedades físicas e químicas. **Boletim de Pesquisa Florestal**. Unidade Regional de Pesquisa Florestal, Colombo, n. 43, p. 61-74, jul./dez. 2001.

SINGH, N.; KUMAR, S.; BAJPAI, V.K.; DUBEI R.C.; MAHESHWARI, D.K.; KANG, S.C. Biological control of *Macrophomina phaseolina* by chemotactic fluorescent *Pseudomonas aeruginosa* PN1 and its plant growth promotory activity in chir-pine. **Crop Protection**, 2010. In press. doi:10.1016/j.cropro.2010.04.008.

SOLANO, B.R.; MAICAS, J.B.; MAÑERO, F.J.G. Physiological and Molecular Mechanisms of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In: AHMAD, I; PICHTEL, J.; HAYAT, S. (Ed.). **Plant-bacteria interactions: strategies and techniques to promote plant growth**. Weinheim: Wiley-VCH, 2008. chap. 3, p. 41-54.

SOTTERO, A.N.; FREITAS, S.S.; MELO, A.M. Rhizobacteria and lettuce: root colonization, plant growth promotion and biological control. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 225-234, 2006.

SOUCHIE, E.L.; ABOUD, A.C.S.; CAPRONI, A.L. In vitro phosphate solubilization by rhizospheric microorganisms from pigeonpea. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 2, p. 53-60, Apr./June 2007

SPRÖER, C.; MENDROCK, U.; SWIDERSKI, J.; LANG, E.; STACKEBRANDT, E. The phylogenetic position of *Serratia*, *Buttiauxella* and some other genera of the family Enterobacteriaceae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berkshire, v. 49, p. 1433-1438, 1999.

STACKEBRANDT, E.; WOESE, C.R. A phylogenetic dissection of the family Micrococcaceae. **Current Microbiology**, New York, v. 2, p. 317-322, 1979.

STANIER, R.Y.; PALLERONI, N.J.; DOUDOROFF, M. The aerobic pseudomonads, a taxonomy study. **Journal of General Microbiology**, New York, v. 43, p. 159-271, 1966.

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**, Cambridge, v. 37, p. 1015-1026, 1984.

TEIXEIRA, D.A.; ALFENAS, A.C.; MAFIA, R.G.; FERREIRA, E.M.; SIQUEIRA, L. DE; MAFFIA, L.A.; MOUNTEER, A.H. Rhizobacterial promotion of eucalypt rooting and growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 1, p.118-123, Jan./Mar. 2007.

THOMAS-BAUZON, D.; WEINHARD, P.; VILLECOURT, P.; BALANDREAU, J. The spermosphere model I: its use in growing, counting and isolating N₂-fixing bacteria from the rhizosphere of rice. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 28, p. 922-928, 1982.

TIAN, F.; DING, Y.; ZHU, H.; YAO, L.; DU, B. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 276-284, Jun. 2009.

VASCONCELLOS, R.L.F.; CARDOSO, E.J.B.N. Rhizospheric streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. **BioControl**, Cidade, v. 54, n. 6, p. 807-816, Dec. 2009.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J.; LUPSKI, JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction **Methods in Molecular and Cellular Biology**, New York, v. 5, n. 1, p. 25-40, 1994.

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 571-586, 2003.

WAYNE, L.G.; BRENNER, D.J.; COLWELL, R.R.; GRIMONT, P.A.D.; KANDLER, O.; KRICHEVSKY, M.I.; MOORE, L.H.; MOORE, W.E.C.; MURRAY, R.G.E.; STACKEBRANDT, E.; STARR M.P.; TRUPER, H.G. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Berkshire, v. 37, n. 4, p. 463-464, 1987.

WEI, G.; KLOPPER, J.W.; TZUN, S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Phytopatology**, St. Paul, v. 86, n. 2, p. 221-224, 1996.

WOESE C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, n. 2, p. 221-271, June 1987.

YABUUCHI, E.; KOSAKO Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO Y.; EZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov; and transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and Immunology**, Malden, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YAMADA, S.; OHASHI, E.; AGATA, N.; VENKATESWARAN, K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in Rice. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1483-1490, Apr. 1999.

YASMIN, F.; OTHMAN, R.; SAAD, M.S.; SIJAM, K. Screening for beneficial properties of rhizobacteria isolated from sweetpotato rhizosphere. **Biotechnology**, Malaysia, v. 6, n. 1, p. 49-52, 2007.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. ***Pseudomonas* spp. Fluorescentes – Bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 32 p. (Embrapa. CNPAB. Documentos, 127).

APÊNDICE

SOLUÇÕES

Solução Cromo Azurol S (CAS)

Solução A

Cromo Azurol S.....12,2 mg
Água Deionizada.....10 mL

Solução B

HCl (concentrado)..... 84 μ L
Água Deionizada..... 100 mL
 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 27 mg

Solução C

HDTMA..... 21,9 mg
Água Deionizada (morna)..... 25 mL

Solução D

Piperazina Anidra 4,307 g
Água Deionizada..... 40 mL

Ajustar vagarosamente o pH com HCl (12 M) para 5,6.

Adicionar 7,5 mL da solução A com 1,5 mL da Solução B. Em seguida, acrescentar a mistura vagarosamente ao conteúdo da solução C. Passar o conteúdo para um balão volumétrico de 100 mL. Adicionar a solução D ao balão volumétrico e completar o volume para 100 mL com água deionizada. Armazenar a solução colorida em geladeira.

TAE 50X (Tris-Acetato)

242 g de Tris base

57,1 mL de ácido acético glacial

100 mL de 0,5 M EDTA (pH 8)

Completar para 1000 mL de água ultra-pura (Milli-Q®).

Tampão Gitschier 5X

Preparar separadamente cada reagente e esterilizá-los em autoclave, em seguida, misturá-los para elaborar o tampão Gitschier 5X.

Gitschier 5X (200 mL)	Concentração final
16,6 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 M)	83 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
67 mL de Tris-HCl (1 M) pH 8,8	335 mM Tris-HCl pH 8,8
6,7 mL de MgCl_2 (1 M)	33,5 mM MgCl_2
1,3 mL da diluição 1:100 de EDTA (0,5 M)	33,5 μM EDTA
2,08 mL de β -mercapto-etanol comercial (14,4 M)	150 mM β -mercapto-etanol

Ajustar o volume final para 200 mL com aproximadamente 106 mL de água ultra-pura (Milli-Q®). Dispensar o tampão em microtubos de 1,5 mL e armazenar a -20°C . Esse tampão pode ser armazenado por vários meses.

DNA Loading Buffer 6X

Azul de bromofenol..... 0,25%

Glicerol..... 30%

Preparar em TAE 1X e conservar a 4°C .

Alternativamente pode-se utilizar 40% de sacarose ao invés de glicerol.

EDTA 0,5 M (pH 8)

Adicionar 186,1 g de disodium ethylenediaminetetracetato. H_2O para 800 mL de H_2O . Agitar vigorosamente e ajustar o pH para 8,0 com NaOH. Completar o volume para 1000 mL. Esterilizar em autoclave e armazenar em geladeira.

Obs. O Na_2EDTA não se dissolve enquanto o pH não estiver próximo de 8,0 pela adição de NaOH.

Tampão “Save Money”

200 mM Tris-HCl (pH 9)

5 mM MgCl $\cdot$ 6H $_2$ O

Acetato de sódio (3M)

Dissolver 40,81 g de acetato de sódio em 80 mL de água ultra-pura (Milli-Q ®). Ajustar o pH para 5,2 usando ácido acético glacial. Ajustar o volume para 100 mL e esterilizar em autoclave.