

REDE CENTRO-OESTE DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E INOVAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS
BACTERIANAS ENDOFÍTICAS DE *Anacardium othonianum*
RIZZINI

Paula Sperotto Alberto Faria

RIO VERDE
GOIÁS - BRASIL
2017

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

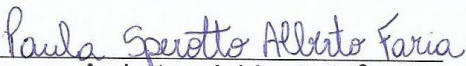
Nome completo do autor: Paula Sperotto Alberto Faria

Título do trabalho: Potencial Biotecnológico de Linhagens Bacterianas Endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini

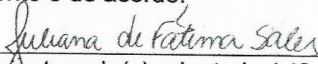
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 08 / 12 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

PAULA SPEROTTO ALBERTO FARIA

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS
BACTERIANAS ENDOFÍTICAS DE *Anacardium othonianum*
RIZZINI**

Orientadora:

Prof. Juliana de Fátima Sales

Co-orientadora:

Prof. Paula Fabiane Matins

Tese apresentada à Universidade de Goiás como parte das exigências do programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**RIO VERDE
GOIÁS - BRASIL
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Faria, Paula Sperotto Alberto
POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE LINHAGENS BACTERIANAS
ENDOFÍTICAS DE *Anacardium othonianum* RIZZINI [manuscrito] /
Paula Sperotto Alberto Faria. - 2017.
xvii, 81 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Juliana de Fátima Sales; co-orientadora
Dra. Paula Fabiane Matins.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós
graduação em Biotecnologia e Biodiversidade, Goiânia, 2017.

Bibliografia.

Inclui tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Caju-de-árvore-do-cerrado. 2. ecologia microbiana. 3.
biotecnologia. 4. traços funcionais. 5. promoção de crescimento vegetal.
I. Sales, Juliana de Fátima, orient. II. Título.

CDU 60



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIODIVERSIDADE
Rua 235, S/N - Setor Universitário - Goiânia/GO CEP 74605-050
Fone (62) 3209.6362
email: pgbb.goias@gmail.com

ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TESE DE PAULA SPEROTTO ALBERTO FARIA - Aos vinte e nove dias do mês de setembro do ano de 2017 (29/09/2017), às 08:00 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Profs. Drs. JULIANA DE FÁTIMA SALES, PAULA FABIANE MARTINS, GUSTAVO ADOLFO PINTO, PRISCILA J. R. DE OLIVEIRA GONÇALVES e LUCIANA VITORINO, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada nas dependências do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada: **"ECOLOGIA E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDÓFITICAS DE A - OTHONIANUM RIZZ.",** em nível de **DOUTORADO**, área de concentração em **BIOTECNOLOGIA**, de autoria de **PAULA SPEROTTO ALBERTO FARIA**, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela orientadora da discente, Profa. Dra. JULIANA DE FÁTIMA SALES, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida a autora da tese que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca seguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução n° 1181/2013 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada ou Reprovada**.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Juliana de Fátima Sales

Profa. Dra. Paula Fabiane Martins

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Pinto

Profa. Dra. Priscila J. R. de Oliveira Gonçalves

Profa. Dra. Luciana Vitorino

Aprovada / Reprovada

Aprovada

Aprovada

APROVADA

Aprovada

APROVADA

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata Habilitada, (Habilitada ou não Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA E BIODIVERSIDADE, na área de concentração em BIOTECNOLOGIA, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16h38 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de tese e para constar em, ZHARA HELOU RIBEIRO DE CASTILHO, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biodiversidade levez a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor.

A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Tese:

Potencial biotecnológico de linhagens bacterianas endófitas de Amacardium othonianum Rizzini.

Profa. Dra. Juliana de Fátima Sales (IFGoiano)

Profa. Dra. Paula Fabiane Martins (IFGoiano)

Prof. Dr. Gustavo Adolfo Pinto (Fazenda)

Profa. Dra. Priscila J. R. de Oliveira Gonçalves (IFGoiano)

Profa. Dra. Luciana Vitorino (IFGoiano)

Secretaria da Pós-Graduação:

Zhara Helou Ribeiro de Castilho

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Paulo e Marta, como reconhecimento do amor, esforço e dedicação depositados para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Ao Espírito Santo de Deus, companheiro presente em todo momento da minha vida! Por me guiar até aqui com paciência, persistência, confiança e a sabedoria para entender cada momento vivido e permitir que neste percurso eu dividisse o caminho com pessoas especiais!

Meus pais, Paulo Roberto Alberto e Marta Sperotto, meu irmão Gabriel Sperotto Alberto e meu esposo Flávio Faria Pereira que me ensinam a cada dia o quão intenso é o sentimento do Amor! Agradeço por sempre me incentivarem, pela paciência e apoio nos momentos de dificuldades e por compartilhar e apreciar comigo as alegrias.

Professoras Juliana de Fátima Sales e Paula Fabiane Martins agradeço pela oportunidade, pelas orientações e ensinamentos concedidos para realização deste trabalho, sempre regados com entusiasmo, otimismo e respeito. São grandes exemplos de mulheres/professoras/pesquisadoras pela garra, responsabilidade e profissionalismo!

Aos professores Fabiano Guimarães Silva, Aurélio Rubio Neto e Juliana da Silva Rodrigues Cabral, por toda colaboração neste trabalho e na minha caminhada acadêmica, por vocês guardo grande admiração e respeito.

Aos amigos de laboratório Juliana, Mariluz, Elisvane, Luciana, Ana Cláudia, Valéria, Letícia, Vanessa, Janniffer, Cíntia, Tainara, Ana Cristina, Higor, Diego e Ana Flávia, os quais tive a oportunidade de dividir tantos momentos de alegria que guardarei na memória! Em especial ao Vinicius Barra por todo apoio na implantação e avaliação dos experimentos, pela dedicação e amizade.

Aos membros da banca examinadora, professoras Luciana Vitorino e Priscila Gonçalves, e o pesquisador Gustavo Adolfo Pinto pela disponibilidade em contribuir para a melhoria deste trabalho e na minha formação.

Ao Instituto Federal Goiano, Campus Rio Verde por proporcionar minha formação acadêmica desde a graduação.

A Rede Pró Centro-Oeste de Pós-graduação, Pesquisa e Inovação, a Universidade Federal de Goiás e ao Instituto Federal Goiano pela colaboração e estruturação deste programa de Pós-Graduação. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG), pela bolsa de estudos e auxílio financeiro.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Paula Sperotto Alberto Faria, filha de Paulo Roberto Alberto e Marta Sperotto, nasceu em Santo Augusto, estado do Rio Grande do Sul, em 26 de julho de 1990.

De 2008 a 2012 cursou Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas no Instituto Federal Goiano - Câmpus Rio Verde, neste período realizou iniciação científica (PIBIC - CNPq).

Em março de 2012, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Ciências Agrárias pelo Instituto Federal Goiano, Câmpus Rio Verde, como estudante de mestrado, sob a orientação do Dr. Fabiano Guimarães Silva, sendo bolsista CAPES por 18 meses, e em setembro de 2013 defendeu a dissertação intitulada “Ecologia e diversidade de fungos endofíticos de *Anacardium othonianum* Rizzini e seu potencial biotecnológico”.

Em setembro de 2013 ingressou como estudante de Doutorado no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biodiversidade da Rede Centro-oeste de Pós-graduação, Pesquisa e Inovação, tendo como unidade tituladora a Universidade Federal de Goiás, sob a orientação da Dr. Juliana de Fátima Sales, sendo bolsista CAPES por 48 meses.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini	18
2.2 Interação planta x micro-organismo	19
2.3 Micro-organismos Endofíticos	22
3. REFERÊNCIAS	24
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo geral	30
4.2 Objetivos específicos	30
CAPÍTULO I	31
Biodiversidade bacteriana endofítica cultivável de <i>A. othonianum</i> Rizzini	31
1. Introdução	32
2 Material e métodos.....	32
2.1 Isolamento	33
2.2 Identificação Molecular.....	34
2.3 Árvore de similaridade com gene 16S	34
2.4 Análise de diversidade e comparação das comunidades	35
3 Resultados	35
4 Discussão	39
5 Conclusão.....	42
6 Referências.....	42
CAPÍTULO II	48
Traços funcionais de promoção do crescimento vegetal de bactérias endofíticas cultiváveis de <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini	48
1 Introdução	49
2. Material e métodos.....	50

2.1 Teste de bioestimulação: síntese de auxina.....	51
2.2 Testes de biofertilização: solubilização de fosfato e síntese de fosfatase	51
2.4 Testes de biocontrole: síntese de sideróforo e antibiose	52
3 Resultados	53
4 Discussão	55
5. Conclusão.....	57
6. Referências.....	58
CAPÍTULO III	63
Promoção do crescimento inicial de <i>Anacardium othonianum</i> Rizzini por bactérias endofíticas	63
1 Introdução	64
2 Material e Métodos	65
2.1 Material vegetal.....	65
2.2 Microbiolização dos aquênios	66
2.3 Avaliações biométricas	66
2.4 Sobrevivência do inóculo	67
3 Resultados	67
4 Discussão	72
5 Conclusão.....	74
6 Referências.....	75
5. CONCLUSÃO GERAL	81

LISTA DE TABELAS

Página

CAPÍTULO I. Biodiversidade bacteriana endofítica cultivável de *Anacardium othonianum* Rizzini

Tabela 1 Linhagens bacterianas endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini já descritas na literatura.....30

CAPÍTULO II. Traços funcionais de promoção do crescimento vegetal de bactérias endofíticas cultiváveis de *Anacardium othonianum* Rizzini

Tabela 1 Síntese de auxina (AIA), solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO₄) por bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini. Rio Verde – GO, 2017.....44

Tabela 2 Antibiose de bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini contra *Fusarium* sp e *Rhizoctonia* sp. Rio Verde – GO, 2017.....45

CAPÍTULO III. Traços funcionais de promoção do crescimento vegetal de bactérias endofíticas cultiváveis de *Anacardium othonianum* Rizzini

Tabela 1 Sobrevivência dos inóculos bacterianos após 24h e 45 dias da microbiolização em aquênios de *Anacardium. othonianum* Rizzini.....56

Tabela 2 Comprimento médio da raiz (cm) e parte aérea (cm) de plantas de *Anacardium. othonianum* Rizzini provenientes de aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.....60

Tabela 3 Massa fresca da raiz e massa fresca da parte aérea de *Anacardium. othonianum* Rizzini de plantas de *Anacardium othonianum* Rizzini provenientes de aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.....61

Tabela 4 Relação da massa fresca da raiz pela parte aérea de plantas de *Anacardium othonianum* Rizzini provenientes de aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.....62

Tabela 5 Massa seca da raiz de plantas de *Anacardium. othonianum* Rizzini provenientes de aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.....62

Tabela 6 Massa seca da parte aérea de plantas de *Anacardium. othonianum* Rizzini provenientes de diferentes acessos, com aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.....63

Tabela 7 Relação massa seca da raiz pela parte aérea de plantas de *Anacardium. othonianum* Rizzini provenientes de aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.....63

Tabela 8 Número de folhas de plantas *Anacardium. othonianum* Rizzini provenientes de diferentes acessos.....64

LISTA DE FIGURAS

Página

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** Aspecto visual de uma planta adulta (A), folhas e fruto (B) de *Anacardium othonianum* Rizzini.....16
- Figura 2** Visão geral da interação entre plantas e bactérias benéficas, que ocorre de três formas: bactérias presentes na rizosfera, associadas à superfície da planta ou colonizando tecidos internos de raízes e parte aérea. Carvalho et al. (2016).....17
- Figura 3** Modelo de seleção em duas etapas: a planta deposita compostos na rizosfera que promove o crescimento de bactérias organotróficas, b) acolhimento e seleção da bactéria pelas células da raiz. Bulgarelli et al. (2013).....18

CAPÍTULO I. BIODIVERSIDADE BACTERIANA ENDOFÍTICA CULTIVÁVEL DE *Anacardium othonianum* RIZZINI

- Figura 1** Mapa indicando os três locais de amostragem. Coordenadas geográficas: S 16°08'02.2'' de latitude e W 51°17'56,6'' de longitude, 592m de altitude (A), S 16°08'02.5'' de latitude e W 51°17'57,3'' de longitude, 596m de altitude (B) e S 16°08'02.6'' de latitude e W 51°17'57,8'' de longitude, 597m de altitude (C). Fonte Google Earth.....24
- Figura 2** Análise de similaridade baseado em sequências de rRNA 16S parciais, mostrando as relações entre sequências de isolados endofíticos bacterianos de *Anacardium othonianum* Rizzini e alguns de seus parentes filogenéticos mais próximos (indicado pelo número de acesso). *Methanospirillum* sp. (AJ133792.1) foi utilizado como grupo externo.....27
- Figura 3** Distribuição taxonômica de bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini. Distribuição dos isolados nos Filos (A) e nas Classes (B).....28
- Figura 4** Abundancia relativa das espécies de bactérias endofíticas cultiváveis em três plantas de *Anacardium othonianum* Rizzini.....29
- Figura 5** Distribuição das espécies bacterianas nas três plantas de *Anacardium othonianum* Rizzini.....30

CAPÍTULO II. Traços funcionais de promoção do crescimento vegetal de bactérias endofíticas cultiváveis de *Anacardium othonianum* Rizzini

Figura 1 Fluxograma da triagem funcional *in vitro* de bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini.....41

Figura 2 Traços funcionais de bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini: síntese de auxina (A), solubilização de fosfato (B), síntese de fosfatase (C), síntese de sideróforo (D), antibiose a *Fusarium* sp. (E) e a *Rhizoctonia* sp. (E).....45

CAPÍTULO III. Promoção do crescimento inicial de *Anacardium othonianum* Rizzini por bactérias endofíticas

Figura 1. Frutos de *Anacardium othonianum* Rizzini. Acesso 13 (A), 36 (B), 82 (C) e 95 (D). Barra de 5 cm.....55

RESUMO

FARIA, Paula Sperotto Alberto, Universidade Federal de Goiás, setembro de 2017.

Potencial biotecnológico de linhagens bacterianas endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini. Orientadora: Juliana de Fátima Sales. Co-Orientador: Paula Fabiane Matins.

As plantas são repletas de micro-organismos que colonizam suas estruturas, aqueles capazes de habitar internamente os tecidos vegetais são conhecidos como endofíticos e fornecem novas vias nutricionais e de defesa, atuando como estratégia da planta para suportar as adversidades bióticas e abióticas. *Anacardium othonianum* Rizzini também conhecido como caju-de-árvore-do-cerrado é um dos principais cajueiros de importância econômica e social na região centro-oeste do Brasil, entretanto, sua comunidade bacteriana endofítica ainda não foi investigada. Neste sentido, objetivou-se com este trabalho definir linhagens bacterianas endofíticas com potencial funcional de promoção de crescimento de *Anacardium othonianum* Rizzini. Fragmentos de raízes de *A. othonianum* foram inoculados em meio nutritivo. As colônias que cresceram foram isoladas, purificadas e a identificação foi realizada pela comparação da sequência 16S rDNA no banco de dados GenBank. Posteriormente, testes *in vitro* de bioestimulação, biofertilização e biocontrole foram realizados para seleção das linhagens com multifatores de promoção do crescimento de plantas. Duas linhagens endofíticas foram selecionadas e investigadas com inoculação *in vivo* em *A. othonianum* para confirmação de sua ação promotora de crescimento. Este trabalho é o primeiro relato sobre isolamento, seleção e aplicação de bactérias endofíticas promotoras do crescimento vegetal de *A. othonianum*. Foram isoladas 22 espécies das quais *Acinetobacter* sp. Bac109, *Bacillus mycoides* Bac160, *Lysinibacillus sphaericus* Bac161 e *Pantoea agglomerans* Bac131 com multifatores de interesse. A co-inoculação de *A. othonianum* com as bactérias endofíticas *Acinetobacter* sp. (Bac109) e *Pantoea agglomerans* (Bac131), promoveram incremento no crescimento inicial.

Palavras-chave: Caju-de-árvore-do-cerrado; ecologia microbiana; biotecnologia; traços funcionais; promoção de crescimento vegetal.

ABSTRACT

FARIA, Paula Sperotto Alebrto, Federal University of Goiás. September de 2017.

Endophytic-bacterial diversity and ecology from *Anacardium othonianum* Rizzini and its biotechnological application. Advisor: Juliana de Fátima Sales.
Co-advisor: Paula Fabiane Matins.

Plants are filled with microorganisms that colonize their structures, those capable of inhabiting plant tissues internally are known as endophytes and provide new nutritional and defense pathways, acting as a plant strategy to withstand biotic and abiotic adversities. *Anacardium othonianum* Rizzini, also known as cerrado-tree-cashew, is one of the main cashew trees of economic and social importance in the central-western region of Brazil, but its endophytic bacterial community has not been investigated yet. In this regard, the aim of this work was to define endophytic bacterial lineages with functional potential to promote growth of *Anacardium othonianum* Rizzini. Root fragments of *A. othonianum* were inoculated in a culture medium. Grown colonies were isolated, purified and the identification was performed by comparing the 16S rDNA sequence in the GenBank database. Subsequently, *in vitro* tests of biostimulation, biofertilization and biocontrol were performed to select lineages with multifactors that promote plant growth. Two endophytic lines were selected and investigated with *in vivo* inoculation in *A. othonianum* to confirm their growth promoting action. This work is the first report on the isolation, selection and application of endophytic bacteria that promote plant growth of *A. othonianum*. Twenty-two species were isolated, of which *Acinetobacter sp.* Bac109, *Bacillus mycoides* Bac160, *Lysinibacillus sphaericus* Bac161 and *Pantoea agglomerans* Bac131 with multifactors of interest. Co-inoculation of *A. othonianum* with the endophytic bacteria *Acinetobacter sp.* (Bac109) and *Pantoea agglomerans* (Bac131), promoted an increase in initial growth.

Keywords: Cerrado-tree-cashew; microbial ecology; biotechnology; functional traits; promotion of plant growth.

1. INTRODUÇÃO

Anacardium othonianum Rizzini, conhecido popularmente como caju-de-árvore-do-cerrado é considerado um dos principais cajueiros de importância econômica e cultural na região centro-oeste do Brasil, devido sua utilização na alimentação e na medicina popular (Correa et al., 2008; Vieira et al., 2010). Entretanto, seu cultivo ocorre de maneira extrativista e para mudar este cenário se faz necessário selecionar plantas elites e aplicar práticas sustentáveis, como a utilização de micro-organismos associados às plantas, que promovam vantagens frente à adversidade (Gaiero et al., 2013).

Os micro-organismos são responsáveis pela manutenção da flora ao atuarem na degradação da matéria orgânica, reciclagem e disponibilização de nutrientes e controle biológico de doenças (Bresolin et al., 2010; Bulgarelli et al., 2013), porém os micro-organismos do Cerrado constituem um universo pouco explorado, com potencial para aplicação biotecnológica (Mesquita et al., 2013).

As bactérias endofíticas são conhecidas por habitar o interior dos tecidos vegetais, sem causar sintomas de doença em seu hospedeiro (Kogel et al., 2006). Nesta íntima associação demonstram contribuir com os principais aspectos da vida vegetal, através da síntese de substâncias promotoras do crescimento vegetal (Piccoli et al., 2011; Friesen et al., 2012; Brader et al., 2014), da aquisição de nutrientes (Ma et al., 2011) e do controle biológico de doenças (Santos e Varavallo, 2011).

Nas últimas décadas estudos investigam a eficiência deste grupo de micro-organismos através do isolamento, cultivo e triagem funcional da comunidade microbiana associada ao vegetal. Entretanto, na maioria dos estudos a atividade de promoção do crescimento vegetal só pôde ser confirmada em testes *in vivo* via inoculação na planta (Andrade et al., 2014; Afzal et al., 2015).

A inoculação de micro-organismos pode acontecer na espécie vegetal em que foi isolado (Szilagyizecchin et al., 2015) ou em outra espécie de interesse – inoculação cruzada (Knoth et al., 2013; Gomoung et al., 2017; Hassan et al., 2017), e uma vez confirmada a promoção do crescimento, segue-se com o desenvolvimento de inoculantes microbianos comerciais (Berg 2009). Entre os micro-organismos explorados comercialmente encontram-se os gêneros bacterianos *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* e *Pantoea* (Berg, 2009; Bashan et al., 2014; Lin et al., 2014).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Anacardium othonianum* Rizzini

O gênero *Anacardium* pertence à família Anacardiaceae e é composto por árvores, arbustos e subarbustos, com fruto do tipo aquênio (castanha) e pseudofruto (resulta do desenvolvido do pedúnculo) seus ramos contêm canais resiníferos e folhas alternadas, coriáceas, sem estípulas. Ocorre em clima tropical, nos domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Mitchell e Mori, 1987; Paiva et al., 2003; Luz e Pirani, 2017). Este gênero tem Amazônia Central, Planalto Central e Semiárido como centros de diversidade e é constituído pelas espécies: *A. excelsum*, *A. spruceanum*, *A. occidentale*, *A. othonianum*, *A. microcarpum*, *A. amilcarianum*, *A. pumilum*, *A. humile*, *A. nanum*, *A. cobrybosum*, *A. parvifolium*, *A. fruticosum*, *A. giganteum* e *A. microsepalum* (Mitchell e Mori, 1987; Lima, 1988).

Anacardium occidentale L. é a única espécie deste gênero cultivada, sendo explorada de maneira extrativista ou em pequenos e médios pomares na Região Nordeste (Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte) (Almeida et al., 2017). Seus principais produtos são a amêndoa da castanha-de-caju (ACC – consumida processada), líquido da casca da castanha-de-caju (LCC - usado na indústria de lubrificantes, curtidores, aditivos, entre outros), e o pseudofruto (consumo *in natura* ou processado) (Rufino et al., 2008; Dendena e Corsi, 2014; Dantas et al., 2015).

As demais espécies do gênero *Anacardium*, têm sua importância econômica restrita a regiões produtoras (Vieira et al., 2006). Nas regiões dos cerrados campo sujo e cerradão encontra-se um ecótipo: *Anacardium othonianum* Rizzini caracterizado por ter folhas mais coriáceas, onduladas e subsésseis, pseudofruto menor e mais ácido que o ecótipo típico das áreas de restinga e capacidade adaptativa a solos de baixa fertilidade, temperaturas elevadas e estresse hídrico (Mitchell e Mori, 1987; Garcia, 2009; Luz e Pirani, 2017).

Anacardium othonianum Rizzini é conhecido popularmente como caju-de-árvore-do-cerrado, cajuzinho e cajuí, difere das espécies deste gênero que habitam o Cerrado, *A. humile*, *A. nanum* e *A. corymbosum*, pelo porte arbóreo chegando a 6 m de comprimento (Figura 1 A) (Vieira et al., 2006). Como fruto verdadeiro têm o aquênio e o pedúnculo que se desenvolve em pseudofruto, com coloração que varia do amarelo ao vermelho e massa entre 5 e 12 g (Figura 1 B), contém elevado valor nutritivo,

relacionado principalmente ao alto teor de vitamina C, fonte de fibras, rico em compostos fenólicos, em especial taninos que lhe confere adstringência (Silva et al., 2008; Alves et al., 2013; Alves et al., 2016).

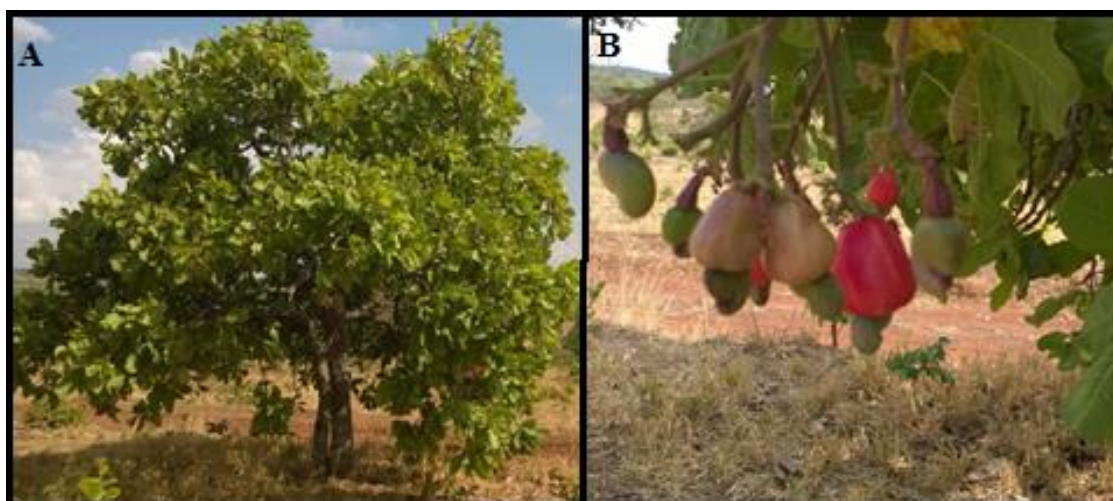


Figura 1 Aspecto visual de uma planta adulta (A), folhas e fruto (B) de *Anacardium othonianum* Rizzini.

O pseudofruto de *A. othonianum* é consumido *in natura* ou na forma de sucos, doces e iogurtes, sendo uma fonte alternativa de nutrientes (Correa et al., 2008; Bessa et al., 2013; Fonseca et al., 2014; Souza et al., 2015; Alves et al., 2016) e o extrato das folhas têm ação anti-microbiano (Curado et al., 2016). Além disso, pode ser utilizado na implantação de pomares comerciais, recuperação de áreas degradadas e conservação de áreas nativas (Assis et al., 2014).

Os pomares comerciais enfrentam fatores que influenciam sua produtividade, como períodos de estiagem, aparecimento de pragas e doenças (Melo et al., 1999). A busca por superar essas adversidades sem causar prejuízos ao meio ambiente vai ao encontro de novas tecnologias sustentáveis como a utilização de micro-organismos associados às plantas, que promovam vantagens frente à adversidade (Gaiero et al., 2013).

2.2 Interação planta x micro-organismo

A interação entre planta e micro-organismo foi inicialmente associada apenas a ocorrência de doenças. Entretanto, atualmente reconhece-se que os micro-organismos podem impactar positivamente o crescimento e a sanidade das plantas, enquanto que

estas podem "selecionar" o seu microbioma, por meio da liberação de exsudados para ter colonizadores benéficos (Mendes et al., 2013; Philippot et al., 2013).

O microbioma planta é complexo e pode ser dividido em três grandes regiões onde os micro-organismos se estabelecem: rizosfera, endosfera e filosfera (Carvalho et al., 2016) (Figura 2). A filosfera é a superfície do caule, folhas, frutos e flores da planta, onde micro-organismos podem colonizar (Philippot et al., 2013). A rizosfera é a parte constituinte do solo com ampla influência das raízes da planta, é considerado um nicho altamente atrativo aos micro-organismos, pois há grande liberação de exsudados radiculares (açúcares e aminoácidos) e onde ocorre troca metabólica intensa (Philippot et al., 2013). Já o ambiente endofítico é caracterizado como o interior dos tecidos vegetais (como córtex ou xilema da raiz), onde ocorre uma íntima associação de trocas constantes, que resulta no aumento da capacidade competitiva frente a estresses bióticos e abióticos do hospedeiro (Kogel et al., 2006).

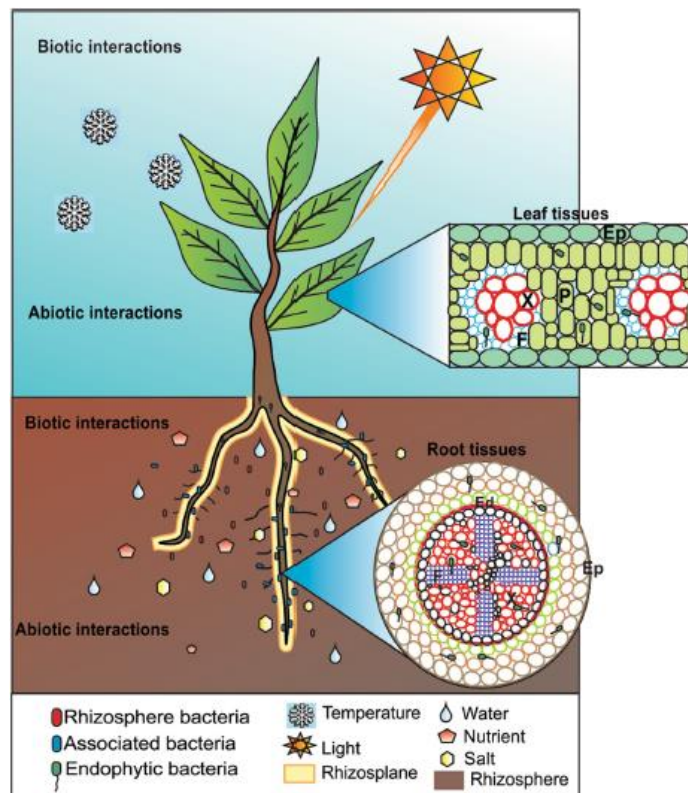


Figura 2 Visão geral da interação entre plantas e bactérias: bactérias presentes na rizosfera, associadas à superfície da planta ou colonizando tecidos internos de raízes e parte aérea. Carvalho et al. (2016).

As plantas ao exsudar compostos nutritivos ou sinalizadores atraem bactérias rizosféricas para melhorar seu desempenho em condições ambientais adversas, formando o complexo “micro-organismo-solo-planta” (Soussi et al., 2016; Zhou et al., 2016). Grande variedade dos micro-organismos rizosféricos são capazes de migrar para o ambiente endofítico (Saharan e Nehra, 2011). Entretanto, o microbioma endofítico difere significativamente da rizosfera, indicando uma restrita seleção dos micro-organismos (Gottel et al., 2011; Santoyo et al., 2016).

O modelo proposto por Bulgarelli et al. (2013) identifica duas etapas na colonização endofítica: a) a planta deposita compostos na rizosfera que promove o crescimento de bactérias organotróficas, b) posteriormente há seleção de bactérias pelas células da raiz e apenas as “escolhidas” colonizam seu interior (Figura 3).

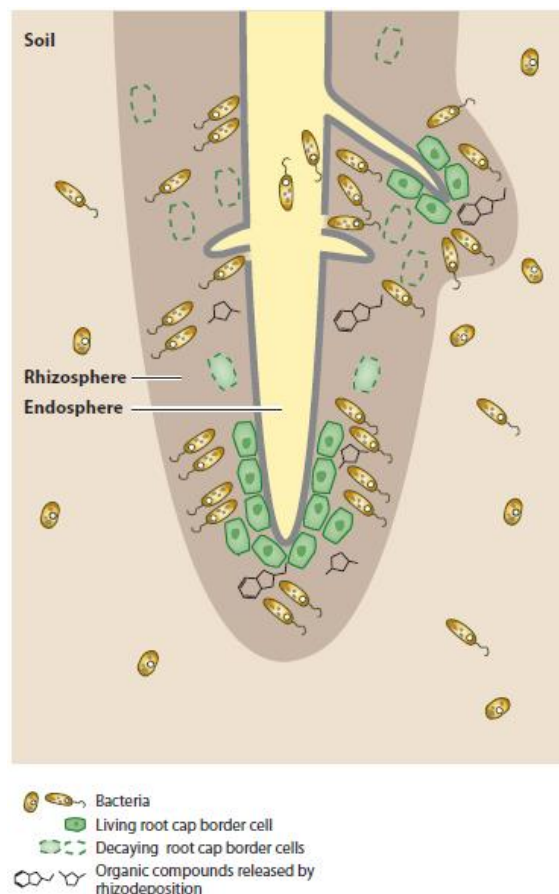


Figura 3 Representação do modelo de seleção em duas etapas: a) planta deposita compostos na rizosfera que promove o crescimento de bactérias organotróficas, b) acolhimento e seleção da bactéria pelas células da raiz. Bulgarelli et al. (2013).

A diversidade da microbiota associada às plantas é influenciada por fatores abióticos, como umidade, temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutriente (Farrar et al., 2014; Santoyo et al., 2016) e por fatores bióticos, como as características genética inerente aos indivíduos (diversidade da comunidade microbiana em espécies cultivadas e selvagens) (Finkel et al., 2017).

Nas últimas décadas, com o crescente avanço das técnicas de manipulação genética e computacionais, um número maior de micro-organismos tem sido identificado permitindo elucidar a composição da comunidade microbiana associada às plantas e fechar lacunas na compreensão desta interação (Bresolin et al., 2010; Imam et al., 2016; Soussi et al., 2016). Contudo, os micro-organismos do Cerrado constituem um universo pouco explorado, com potencial para estudos de aplicação biotecnológica ou para estudos taxonômicos (Mesquita et al., 2013).

As sequências do gene 16S contêm domínios altamente conservados que são referências importantes para deduzir relações filogenéticas e evolutivas dos micro-organismos (Gaiero et al., 2013). Muitas sequências já estão depositadas em banco de dados de acesso livre, oferecendo informações para estudos sobre a diversidade microbiana mundial (Soussi et al., 2016).

2.3 Micro-organismos Endofíticos

A relação planta x micro-organismos endofíticos pode ser estabelecida de 3 formas: a) penetração passiva - através da colonização por aberturas naturais como estômatos, hidatódios, lenticelas ou ferimentos; b) penetração ativa - o endófito produz enzimas ou estruturas que facilitam sua entrada; ou c) transmissão vertical - quando o endófito tem capacidade de perpetuar a simbiose colonizando as estruturas reprodutivas do hospedeiro, desta forma, ao liberar as sementes estarão levando consigo o micro-organismo endofítico (Wang et al., 2007; Johnston-Monje et al., 2011).

Na interação mutualística planta-endófito, o micro-organismo recebe nutrição e o microhabitat que permite estabilidade térmica e osmótica, assim aumenta sua possibilidade de sobrevivência e disseminação (Muller e Krauss, 2005; Santoyo et al., 2016). Nesta íntima associação, as bactérias promovem o crescimento das plantas através de três mecanismos: fitoestimulação, biofertilização e biocontrole (Farrar et al., 2014; Hardoim et al., 2015; Abbamondi et al., 2016).

A fitoestimulação aumenta o crescimento das plantas pela produção direta de fitormônios como auxinas, giberelinas e citocininas (Piccoli et al., 2011; Smith et al., 2015; Khan et al., 2016). Dentre os fitormônios, as auxinas como o ácido indol-3-acético (AIA) são os mais estudados, pois atuam diretamente no alongamento celular, afetando a morfologia das raízes, com aumento do comprimento e número dos pelos radiculares, permitindo explorar novas regiões e aumentando a área de captação radicular (Piccoli et al., 2011; Khan et al., 2016).

A biofertilização promove a disponibilidade de nutrientes como o fósforo e nitrogênio que não estão prontamente disponíveis as plantas (Berg et al., 2014; Brader et al., 2014) e o biocontrole protege as plantas contra patógenos, através da competição por nutrientes, resistência sistêmica induzida, produção de metabolitos antimicrobianos secundários e sideróforo (Santos e Varavallo, 2011; Newman et al., 2013; Brader et al., 2014).

Nas últimas décadas, com o crescente avanço das técnicas de manipulação de ácidos nucleicos, os micro-organismos têm sido catalogados, permitindo elucidar a composição da comunidade endofítica de muitas espécies de plantas (Bresolin et al., 2010; Podolich et al., 2015; Yu et al., 2015; Soussi et al., 2016). Entretanto, confirmar o efeito benéfico destes micro-organismos só é possível através do isolamento, cultivo e triagem funcional da comunidade microbiana associada ao vegetal. Neste processo algumas linhagens se destacam e passam para a próxima fase de teste e ao final se o efeito de promoção do crescimento for confirmado é possível a criação de inoculantes microbianos (Friesen et al., 2011; Saharan e Nehra, 2011).

Alguns gêneros de endofíticos já foram isolados e descritos com ação de promoção do crescimento vegetal, e são utilizados como inoculantes microbianos comerciais, dentre eles destacam-se *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* e *Pantoea* (Berg, 2009; Bashan et al., 2014). Além disso, o possível uso destes micro-organismos pode ser preferível ao uso de fertilizantes químicos e pesticidas, não somente devido ao menor custo, mas por contribuir com um sistema agrícola sustentável (Gaiero et al., 2013).

3. REFERÊNCIAS

- Abbamondi, G. R., Tommonaro, G., Weyens, N., Thijs, S., Sillen, W., Gkorezis, P., Odice, C., Rangel, W. M., Nicolaus, B., & Vangronsveld, J. (2016). Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1-10.
- Afzal, I. M. R. A. N., Shinwari, Z. K., & Iqar, I. (2015). Selective isolation and characterization of agriculturally beneficial endophytic bacteria from wild hemp using canola. *Pakistan Journal of Botany*, 47(5), 1999-2008
- Almeida, L. H. F., Cordeiro, S. A., Pereira, R. S., Couto, L. C., & Lacerda, K. D. S. (2017). Viabilidade econômica da produção de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Nativa: Pesquisas Agrárias e Ambientais*, 5 (1), 9-15.
- Alves, M. S. O., Alves, A. M., & Naves, M. M. V. (2013). Compostos bioativos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 72(4), 327-331.
- Alves, A. M., Fernandes, D. C., Borges, J. F., Sousa, A. G. D. O., & Naves, M. M. V. (2016). Oilseeds native to the Cerrado have fatty acid profile beneficial for cardiovascular health. *Revista de Nutrição*, 29(6), 859-866.
- Andrade, L. F., de Souza, G. L. O. D., Nietsche, S., Xavier, A. A., Costa, M. R., Cardoso, A. M. S., & Pereira, D. F. G. S. (2014). Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(1), 27-34.
- Assis, K. C., Pereira, F. D., Alberto, P. S., Silva, F. G., Silva, J. W., & de Menezes, C. C. E. (2014). *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: Effects of growth regulator, explant orientation and lighting. *African Journal of Biotechnology*, 11(7), 1559-1566.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18.

- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5(148), 1-7.
- Bessa, N. G. F., Borges, J. C. M., Beserra, F. P., Carvalho, R. H. A., & Pereira, M. A. B. (2013). Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde–Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(4), 692-707.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 30-37.
- Bresolin, J. D., Bustamante, M. M. C., Krüger, R. H., Silva, M. R. S. S., & Perez, K. S. (2010). Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 391-403.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 807-838.
- Correa, G. C., Naves, R. V., da Rocha, M. R., Chaves, L. J., & Borges, J. D. (2008). Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), visando melhoramento genético. *Bioscience Journal*, 24(4), 42-47.
- Carvalho, T. L. G., Ballesteros, H. G. F., Thiebaut, F., Ferreira, P. C. G., & Hemerly, A. S. (2016). Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. *Plant Molecular Biology*, 90 (6), 561-574.
- Curado, F. A. M. L. I. M. J., Gazolla, A. P., Pedroso, R. C. N., Pimenta, L. I. P., de Oliveira, P. F., Tavares, D. C., Silva, M. L. A., Cunha, W. R., Pietro, R. C. L. R., Januário, A. H., Pauletti, P. I. M. J. Sales, J. F. & Silva, F. G. (2016). Antifungal and cytotoxicity activities of *Anacardium othonianum* extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(29), 450-456.

- Dantas, T., Oliveira, N. F., & Leal, R. S. (2015). The importance of the cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) coat: a review. *American International Journal of Contemporary Scientific Research*, 2(8), 09-41.
- Dendena, B., & Corsi, S. (2014). Cashew, from seed to market: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4), 753-772.
- Farrar, K., Bryant, D., & Cope-Selby, N. (2014). Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant Biotechnology Journal*, 12(9), 1193-1206.
- Friesen, M. L., Porter, S. S., Stark, S. C., Von Wettberg, E. J., Sachs, J. L., & Martinez-Romero, E. (2011). Microbially mediated plant functional traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(1), 23-46.
- Fonseca, C. M., Boari, C. A., Domingues, P. H. D., Meira, D. P., Fernandes, L. S. F., & Dumont, M. A (2014). Iogurte produzido com cajuí (*Anacardium othonianum* Rizz). *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4), 1-9.
- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9), 1738-1750.
- Garcia, A. F. Análise Filogenética no Gênero *Anacardium*. 2009. 72f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, SP.
- Gomoung, D., Mbailao, M., Toukam, S. T., & Ngakou, A. (2017). Influence of Cross-Inoculation on Groundnut and Bambara Groundnut-Rhizobium Symbiosis: Contribution to Plant Growth and Yield in the Field at Sarh (Chad) and Ngaoundere (Cameroon). *American Journal of Plant Sciences*, 8(08), 1953.
- Gottel, N. R., Castro, H. F., Kerley, M., Yang, Z., Pelletier, D. A., Podar, M. & Doktycz, M. J. (2011). Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 5934-5944.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Doring, M & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.

- Hassan, S. E. D. (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of Advanced Research*, 6(8), 1-9.
- Imam, J., Singh, P. K., & Shukla, P. (2016). Plant microbe interactions in post genomic era: perspectives and applications. *Frontiers in Microbiology*, 7 (1488), 1-15.
- Johnston-Monje, D., & Raizada, M. N. (2011). Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. *PLoS One*, 6(6), e20396.
- Khan, A. L., Halo, B. A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A. & Lee, I. J. (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21(1), 58-64.
- Knoth, J. L., Kim, S. H., Ettl, G. J., & Doty, S. L. (2013). Effects of cross host species inoculation of nitrogen-fixing endophytes on growth and leaf physiology of maize. *Gcb Bioenergy*, 5(4), 408-418.
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hüchelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite—what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 358-363.
- LIMA, V. P. M. S. *A Cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil*. Fortaleza: ETENE, 988, p.448.
- Luz, C.L.S.; Pirani, J.R. Anacardiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB77853>>. Acesso em: 06 Set. 2017.
- Melo, Q. M. S., Teixeira, L. M. S., Bleicher, E., & Rodrigues, S. M. M. (1999). *Artropodes e microrganismos de importancia quarentenaria associados ao cajueiro*. EMBRAPA-CNPAT.
- Mendes, R.; Garbeva, P.; Raaijmakers, J.M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews* 37(1): 634-663.
- Mesquita, V. A., Magalhães, K. T., Batista, C. F. S., & Schwan, R. F. (2013). The molecular phylogenetic diversity of bacteria and fungi associated with the cerrado soil from different regions of Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Microbiology Research*, 4(2), 119-131.

- Mitchell, J. D., & Mori, S. A. (1987). The cashew and its relatives (*Anacardium: Anacardiaceae*). El marañón y sus parientes (*Anacardium: Anacardiaceae*). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 42(1), 1-76.
- Müller, C. B., & Krauss, J. (2005). Symbiosis between grasses and asexual fungal endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 450-456.
- Newman, M. A., Sundelin, T., Nielsen, J. T., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4(139), 1-14.
- Paiva, J. R.; Crisostomo, J. R.; Barros, L. M. Recursos Genéticos do cajueiro: coleta, conservação, caracterização e utilização. Fortaleza: EMBRAPA-CNPAT. p. 43, 2003.
- Piccoli, P., Travaglia, C., Cohen, A., Sosa, L., Cornejo, P., Masuelli, R., & Bottini, R. (2011). An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A1 and A3 and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regulation*, 64(2), 207-210.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799.
- Podolich, O., Ardanov, P., Zaets, I., Pirttilä, A. M., & Kozyrovska, N. (2015). Reviving of the endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance. *Plant and Soil*, 388(1-2), 367-377.
- Rufino, M. S. M.; Corrêa, M. P. F.; Alves, R. E.; Leite, L. A. S.; & Santos, F. J. S. (2008). Utilização atual do cajuí nativo da vegetação litorânea do Piauí, Brasil. *Proceedings of the Tropical Region – American Society for Horticultural Science*, 52(1), 147-149.
- Saharan, B. S.; Nehra, V. (2011) Plant Growth Promoting Rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medicine Research*. 21(1), 1–30.
- Santos, T. T., & Varavallo, M. A. (2011). Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 32(2), 199-212.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183(1), 92-99.

- Silva, M. R., Lacerda, D. B. C. L., Santos, G. G., & de Oliveira Martins, D. M. (2008). Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Ciência Rural*, 38(6), 1790-1793.
- Smith, D. L., Praslickova, D., & Ilangumaran, G. (2015). Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. *Frontiers in Plant Science*, 6(722) 1-6.
- Soussi, A., Ferjani, R., Marasco, R., Guesmi, A., Cherif, H., Rolli, E. & Cherif, A. (2016). Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. *Plant and Soil*, 405(1-2), 357-370.
- Souza, P. L. C., & Silva, M. R. (2015). Quality of granola prepared with dried caju-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) and baru almonds (*Dipteryx alata* Vog). *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1712-1717.
- Szilagyi-zecchin, V. J.; Klosowki, A. C.; Ikeda, A. C.; Hungria, M.; Galli-terasawa, L. V.; Kava-cordeiro, V.; Glienke, C.; Morgor, A. F. (2015) Potential inoculant strains of Brazilian endophytic bacteria for maize (*Zea mays* L.) growth promotion. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 7 (1), 128-134.
- Vieira, R. F., Agostini-Costa, T., Silva, D. D., Sano, S. M., & Ferreira, F. R. (2006). Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. *Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*.
- Wang, B., Priest, M. J., Davidson, A., Brubaker, C. L., Woods, M. J., & Burdon, J. J. (2007). Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. *Mycological Research*, 111(3), 347-354.
- Yu, X., Yang, J., Wang, E., Li, B., & Yuan, H. (2015). Effects of growth stage and fulvic acid on the diversity and dynamics of endophytic bacterial community in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Frontiers in Microbiology*, 6(867). 1-13.
- Zhou, D., Huang, X. F., Chaparro, J. M., Badri, D. V., Manter, D. K., Vivanco, J. M., & Guo, J. (2016). Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. *Plant and Soil*, 401(1-2), 259-272.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Definir linhagens bacterianas endofíticas com potencial funcional de promoção de crescimento de *Anacardium othonianum* Rizzini.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar a comunidade cultivável de bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini.

- Selecionar linhagens com multifatores de promoção do crescimento vegetal *in vitro*, como síntese de auxina, solubilização de fosfatos inorgânicos, síntese fosfatase, sideróforo e ação de antibiose.

- Avaliar a promoção do crescimento vegetal inicial pela reinoculação de linhagens bacterianas endofíticas isoladas ou em mistura em *Anacardium othonianum* Rizzini.

CAPÍTULO I

Biodiversidade bacteriana endofítica cultivável de *Anacardium othonianum* Rizzini

Resumo: *Anacardium othonianum* Rizzini é conhecido como caju-de-árvore-do-cerrado e utilizado como fonte de alimento pelas populações locais da região do Cerrado, entretanto, desconhece sua comunidade endofítica. Os micro-organismos que colonizam internamente os tecidos vegetais são conhecidos como endofícos e o conhecimento da comunidade endofítica, presente em cada espécie de plantas e a investigação de suas potencialidades são uma importante fonte de recursos de aplicação biotecnológica. Diante disto, objetivou-se identificar a comunidade cultivável de bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini. Fragmentos de raízes de *A. othonianum* foram coletados, lavados e inoculados em meio ágar nutriente. A classificação dos isolados foi realizada pelo sequenciamento da região 16S rDNA e as sequências comparadas no banco de dados GenBank. Foram isoladas 148 linhagens bacterianas endofíticas cultiváveis distribuídas em 22 espécies pertencentes aos filos Proteobacteria (86%) e Firmicutes (14%). As espécies dominantes foram *Bacillus pumilus*, *Rhizobium tropici*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens* e *Acinetobacter oleivorans*. A diversidade alfa da comunidade bacteriana endofítica foi determinada pelo índice de diversidade de Shannon (H') de 2,27, e o valor de equabilidade 0,74, indicando a diversidade e riqueza de espécies. Este estudo foi a primeira investigação sobre a diversidade e composição da comunidade bacteriana endofítica cultivável associadas a *A. othonianum* com foco principal de criar e explorar uma coleção de bactérias cultiváveis representativas de habitat endofítico, e futuramente fornecer material para triagem funcional e descoberta de potencialidades na promoção do crescimento vegetal. Conclui-se que a biodiversidade da comunidade bacteriana endofítica cultivável de *Anacardium othonianum* Rizzini, contempla 22 espécies distribuídos em 2 filos, Proteobacteria e Firmicutes.

Palavras-chave: Caju-de-árvore-do-cerrado; Cerrado; ecologia microbiana; biotecnologia.

1. Introdução

O Cerrado brasileiro é a mais rica savana tropical, contendo grande número de espécies vegetais (Myers et al., 2000; Sano et al., 2010) e microbianas (Mesquita et al., 2013; Souza et al., 2016) ainda pouco conhecidas e exploradas. Dentre as espécies vegetais da região destaca-se o *Anacardium othonianum* Rizzini, um ecótipo de *A. occidentale* (Mitchell e Mori, 1987), conhecido popularmente como caju-de-árvore-do-cerrado e considerado um dos principais cajueiros de importância econômica e cultural na região Centro-Oeste, devido a sua utilização na alimentação e na medicina popular (Carvalho-Correa et al., 2008; Vieira et al., 2010).

Os micro-organismos têm nichos relacionados às plantas, que variam de parasitário, neutro ou benéfico (Hardoim et al., 2015). Aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais, pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, sem causar sintomas de doenças no hospedeiro são chamados de endofíticos (Kogel et al., 2006). As bactérias endofíticas demonstram contribuir com os principais aspectos da vida vegetal, através da síntese de substâncias promotoras do crescimento (Piccoli et al., 2011; Friesen et al., 2012; Brader et al., 2014), aquisição de nutrientes (Ma et al., 2011) e controle biológico de doenças (Santos e Varavallo, 2011).

Nas últimas décadas, com abordagens omic independentes da cultura, por exemplo, metagenômica, metatranscriptômica, metaproteômica e metabolômica, os micro-organismos têm sido catalogados, permitindo elucidar a composição da comunidade endofítica de muitas espécies de plantas (Bresolin et al., 2010; Podolich et al., 2015; Yu et al., 2015; Soussi et al., 2016). Mas confirmar o efeito benéfico destes micro-organismos só é possível através do isolamento, cultivo e triagem funcional. Alguns gêneros de endofíticos já foram isolados e descritos com ação de promoção do crescimento vegetal, e são utilizados como inoculantes microbianos comerciais, dentre eles destacam-se *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas* e *Serratia* (Berg, 2009; Bashan et al., 2014).

No entanto, a comunidade bacteriana endofítica do caju-de-árvore-do-cerrado ainda não foi investigada. Diante disto, objetivou-se identificar a comunidade cultivável de bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini.

2 Material e métodos

2.1 Isolamento

Três plantas de *A. othonianum* Rizz. com aproximadamente 50 cm em estágio vegetativo, foram coletadas no verão (março de 2012) no município de Montes Claros de Goiás – GO (Figura 1) e retiradas integralmente do solo com escavador manual, cuidadosamente manuseado para impedir danos à raiz e preservar o solo aderido. Em seguida, foram conduzidas ao Laboratório de Microbiologia Agrícola do IF Goiano – Campus Rio Verde para processamento.

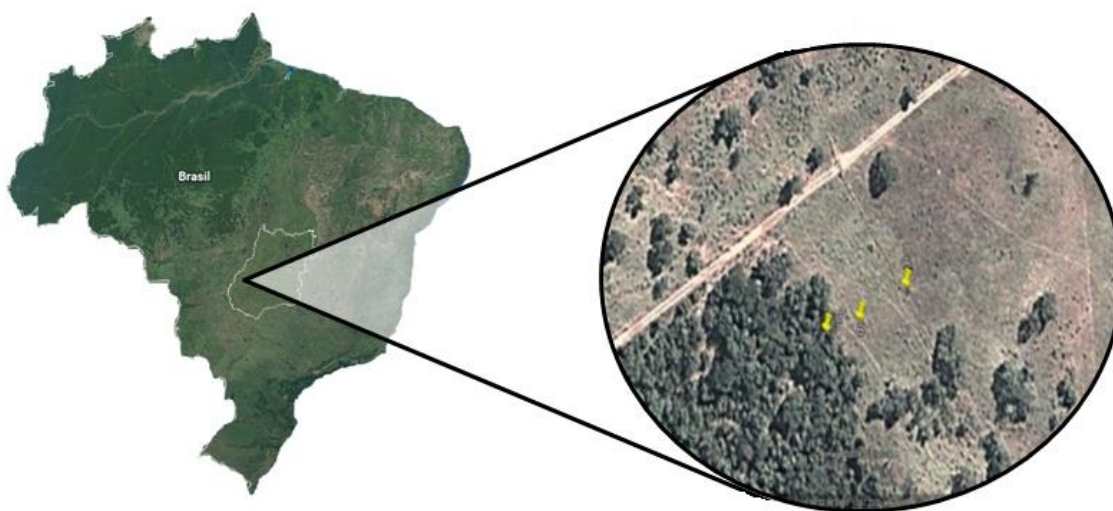


Figura 1 Mapa indicando os três locais de amostragem. Coordenadas geográficas: S 16°08'02.2'' de latitude e W 51°17'56,6'' de longitude, 592m de altitude (A), S 16°08'02.5'' de latitude e W 51°17'57,3'' de longitude, 596m de altitude (B) e S 16°08'02.6'' de latitude e W 51°17'57,8'' de longitude, 597m de altitude (C). Fonte Google Earth.

As raízes foram destacadas das plantas, imersas em água corrente com detergente neutro e enxaguadas em água destilada. Posteriormente, em fluxo laminar, foram imersas em álcool (70%) por 1 minuto, hipoclorito de sódio (2,5% de cloro ativo) durante 3 minutos e álcool (70%) por 30 segundos. Em seguida, foram enxaguadas 3 vezes com água destilada esterilizada e o excesso de água retirado com papel filtro esterilizado. Como controle do processo de assepsia, foram coletados 500 µL da água utilizada no enxágue final das amostras e inoculada em tubos contendo meio de cultura.

Raízes finas de aproximadamente 1 cm foram obtidas com auxílio de pinça e tesoura e distribuídas superficialmente, sete fragmentos em 12 placas de Petri, contendo ágar nutriente (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona e 15 g de ágar). Para avaliar a

frequência de colonização, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 30 °C e monitoradas diariamente até o 7º dia.

2.2 Identificação Molecular

Os procedimentos de extração, amplificação e purificação do DNA microbiano foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana do Instituto de Biociências da Universidade Federal de Mato Grosso.

A extração do DNA genômico das bactérias foi realizada segundo a metodologia de Cheng e Jiang (2006). A amplificação do gene 16S rDNA foi realizada utilizando os *primers* 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTCAG-3') e 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Weisburg et al., 1991). O volume do PCR foi de 25 µL, contendo 3 µL de extrato de DNA, 14,55 µL de água ultrapura, 2,5 µL de tampão de PCR 10x, 0,75 µL de MgCl₂, 2 µL de dNTP, 1 µL do primer 27 F, 1 µL do *primer* 1492 R e 0,2 µL da enzima Taq polimerase (Invitrogen®). As condições de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de 94 °C por 40 segundos, 58 °C durante 35 segundos e 72 °C por 1 minuto e 20 segundos, com extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Os produtos da amplificação foram purificados (Dunn e Blattner, 1987), a quantificação do DNA foi realizada com 1µL do produto por eletroforese em gel de agarose (0,8%), utilizando-se como padrão de comparação o marcador Lambda (λ) de 1Kb, e em seguida o sequenciamento foi realizado pelo método de Sanger, utilizando o Kit Big Dye, em sequenciador automático ABI3100 AppliedBiosystem no Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da UNESP – Jaboticabal para sequenciamento. As sequências do 16S foram comparadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com sequências conhecidas por busca de similaridade via Blastn.

2.3 Árvore de similaridade com gene 16S

A construção da árvore foi realizada com o software MEGA 6 (Tamura et al., 2013), utilizando o algoritmo Neighbour-Joining, pela opção de distância de acordo com o modelo Jukes and Cantor (1969), onde as sequências das bactérias endofíticas foram comparadas às sequências tipo com base nos resultados observados no Basic Local Alignment Search Tool – BLASTn e Ribosomal Database Project – RDP. A

robustez da árvore de similaridade foi confirmada pela análise de 5.000 bootstrap e *Methanospirillum* sp. (AJ133792.1) foi utilizado como *out group*.

2.4 Análise de diversidade e comparação das comunidades

Após a identificação molecular a comunidade bacteriana endofíticas foi caracterizada quanto à riqueza e diversidade de espécies utilizando métricas ecológicas como índice de diversidade – Shannon, equabilidade e diagramas de Venn (Bardou et al., 2014).

3 Resultados

Nenhum crescimento microbiano foi observado no controle da assepsia superficial das raízes, indicando que o protocolo foi eficaz na inibição do crescimento bacteriano epifítico.

Um total de 148 isolados bacterianos foram cultivados a partir dos fragmentos de raízes de *A. othonianum* com 100% de frequência de colonização. A identificação da sequência DNAr 16S e a construção da relação filogenética com sequências disponíveis em bancos de dados possibilitou a classificação de 22 espécies (Figura 2).

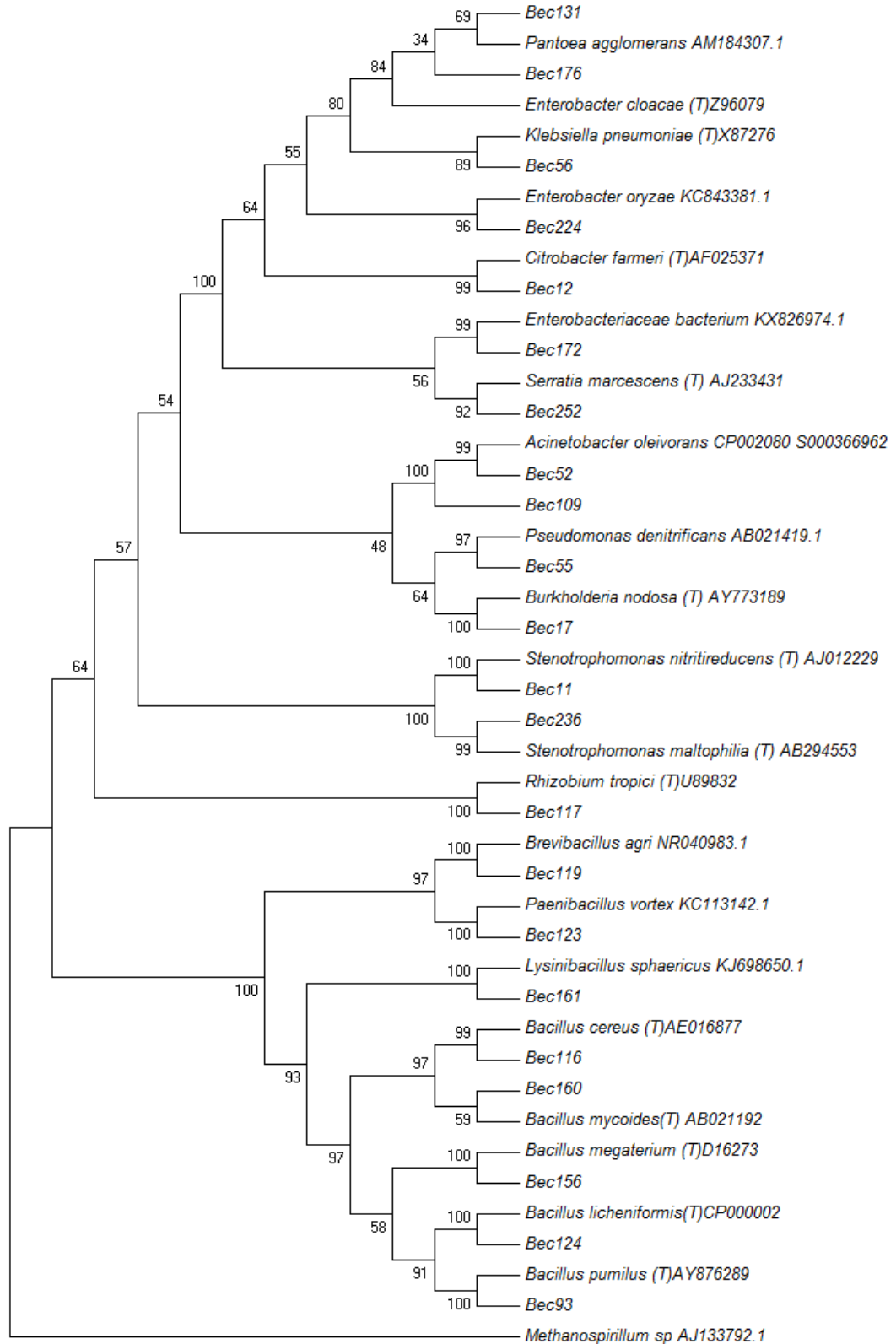


Figura 2 Análise de similaridade baseado em seqüências de rRNA 16S parciais, mostrando as relações entre seqüências de isolados endofíticos bacterianos de *Anacardium. othonianum* Rizzini e alguns de seus parentes filogenéticos mais próximos (indicado pelo número de acesso). *Methanospirillum* sp. (AJ133792.1) foi utilizado como grupo externo.

O filo Proteobacteria foi dominante na comunidade bacteriana endofítica cultivável, representando 86% dos isolados totais, os demais foram representados pelo filo Firmicutes com 14% (Figura 3A). A classe Gamaproteobacteria predominou, representando 73% dos isolados totais, seguido de Bacilli (10%), Alfaproteobacteria (16%) e Betaproteobacteria (1%) (Figura 3B).

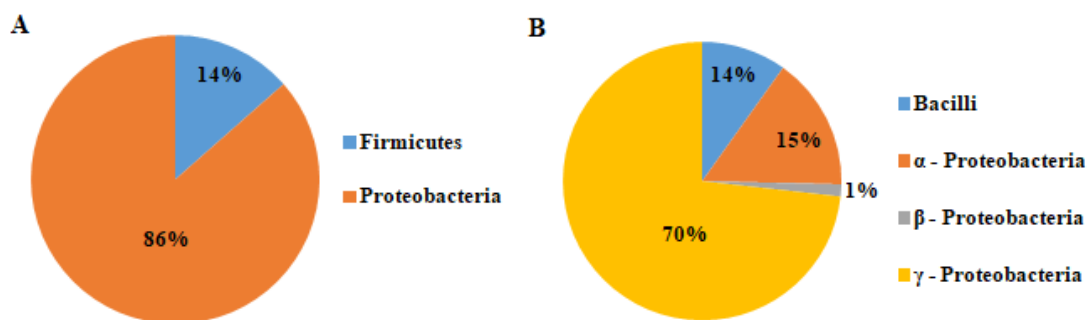


Figura 3 Distribuição taxonômica de bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini. Distribuição dos isolados nos Filos (A) e nas Classes (B).

Foram encontradas 14 espécies pertencentes ao filo Proteobacteria que incluem *Rhizobium tropici*, *Burkholderia nodosa*, *Citrobacter farmeri*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter oryzae*, *Enterobacteriaceae bacterium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter oleivorans*, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas denitrificans*, *Stenotrophomonas nitritireduce* e *Stenotrophomonas maltophilia*. E o filo Firmicutes contém 8 espécies, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pumilus*, *Brevibacillus agri*, *Lysinibacillus sphaericus* e *Paenibacillus vortex*.

As espécies *Bacillus pumilus*, *Rhizobium tropici*, *Enterobacter cloacae*, *Pantoea agglomerans*, *Serratia marcescens* e *Acinetobacter oleivorans*, representam 83% dos 148 isolados. Enquanto nove espécies raras *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Paenibacillus vortex*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas denitrificans*, *Stenotrophomonas nitritireduce* e *Stenotrophomonas maltophilia* representam 6% do total de 148 isolados.

A diversidade alfa determinada pelo índice de diversidade de Shannon (H') da comunidade de bactérias endofíticas geral foi de 2,27, e entre as três plantas observou-se índice de 2,04, 1,78 e 1,65 respectivamente. O valor de equabilidade da comunidade geral foi de 0,74, e entre as três plantas observou-se 0,93, 0,72 e 0,63 respectivamente, evidenciando a planta 1 com maior diversidade.

A planta 3 mostrou-se mais rica tendo 14 espécies e destas 6 exclusivas: *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, *Enterobacter oryzae*, *Enterobacteriaceae bacterium*, *Lysinibacillus sphaericus* e *Stenotrophomonas maltophilia*. Seguida da planta 2 com 12 espécies e 5 exclusivas: *Acinetobacter* sp., *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Paenibacillus vortex* e *Pseudomonas denitrificans*. Na planta 1 foram encontradas 9 espécies, sendo 3 exclusivas: *Burkholderia nodosa*, *Citrobacter farmeri* e *Stenotrophomonas nitritireducens* (Figura 4).

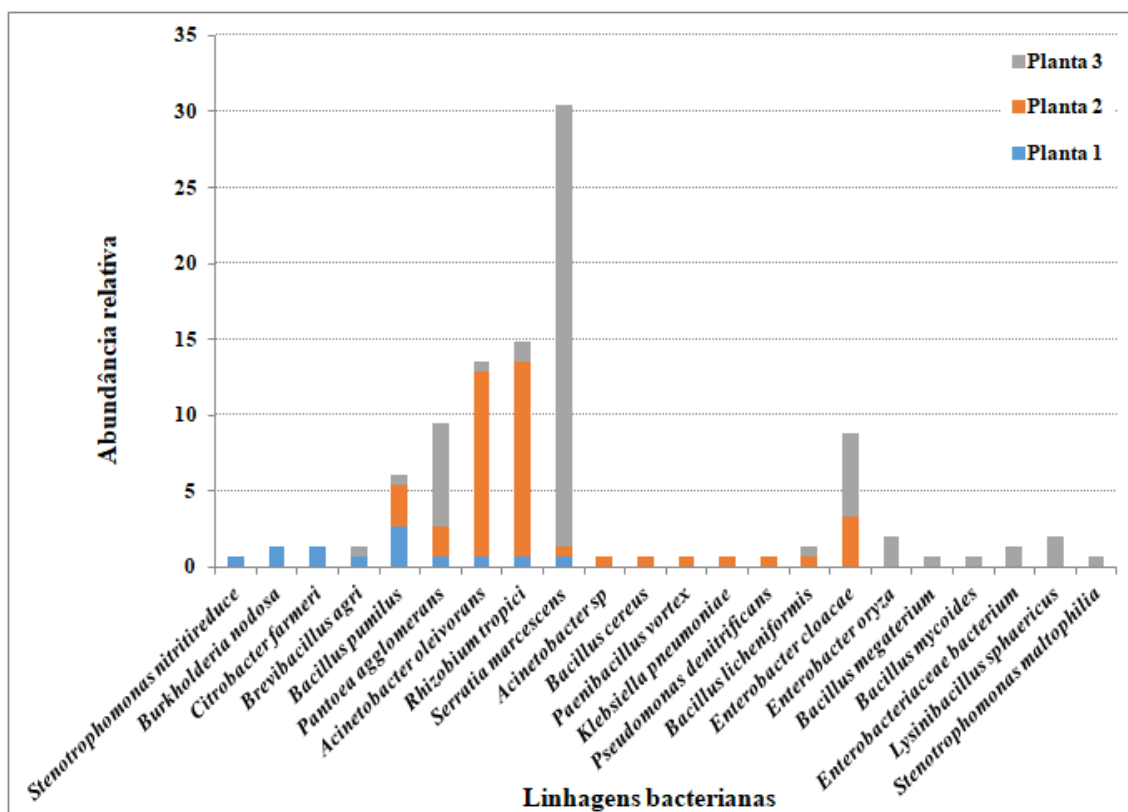


Figura 4 Abundância relativa das espécies de bactérias endofíticas cultiváveis em três plantas de *Anacardium othonianum* Rizzini.

O padrão de colonização indicado pela distribuição da riqueza compartilhada entre as espécies bacterianas nas plantas de *A. othonianum* Rizz., revelou que somente 5 espécies (22,7%) foram encontradas nas três plantas, são elas: *Acinetobacter oleivorans*, *Bacillus pumilus*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium tropici* e *Serratia marcescens* (Figura 5).

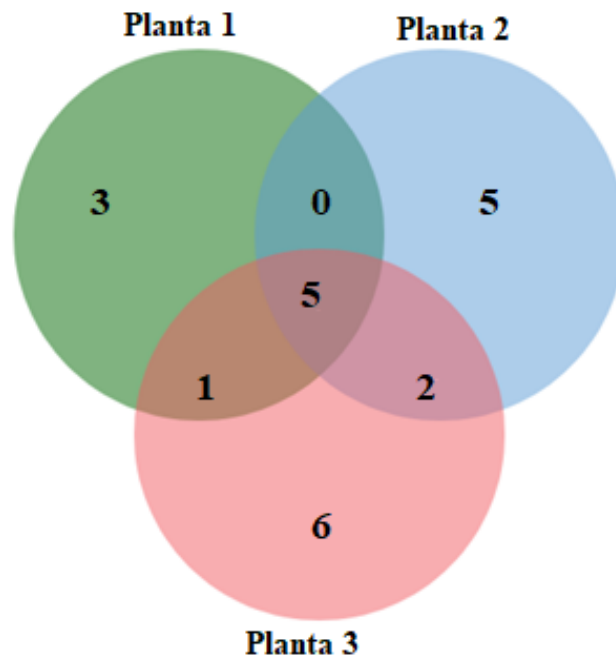


Figura 5 Distribuição das espécies bacterianas nas três plantas de *Anacardium othonianum* Rizzini.

4 Discussão

Este estudo foi a primeira investigação sobre a diversidade e composição da comunidade bacteriana endofítica cultivável associada ao *A. othonianum* Rizz. Com foco principal de criar e explorar uma coleção de bactérias cultiváveis representativas de habitat endofítico, e futuramente fornecer material para triagem funcional e descoberta de potencialidades na promoção do crescimento vegetal.

Os filos Proteobactéria e Firmicutes, encontrados neste trabalho, são geralmente os dominantes em ambiente endofítico (Bulgarlli et al., 2013; Hardoim et al., 2015; Verma et al., 2015; Pereira et al., 2016; Santoyo et al., 2016) e as 22 espécies de bactérias amostradas já foram relatadas como endofíticas em outras espécies vegetais, conforme Tabela 1.

Tabela 1 Linhagens bacterianas endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini já descritas na literatura.

Linhagem bacteriana	Hospedeiro	Autor
<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Glycine max</i>	Kuklinsky-Sobral et al., 2005
<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Brevibacillus agri</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Oriza sativa</i>	Mano et al., 2007
<i>Enterobacter oryzae</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i> <i>Pseudomonas denitrificans</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Acinetobacter oleivorans</i>	<i>Butia purpurascens</i>	Silva et al., 2015
<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> <i>Paenibacillus vortex</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Acinetobacter sp.</i> <i>Acinetobacter oleivorans</i> <i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Phyllanthus amarus</i>	Joe et al., 2016
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Citrobacter farmeri</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Lysinibacillus sphaericus</i> <i>Bacillus megaterium</i>	<i>Oryza sativa</i>	Prakamhang et al., 2009.
<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Bacillus pumilus</i> *	<i>Cannabis sativa</i>	Afzal et al., 2008
<i>Klebsiella pneumoniae</i> *	<i>Oryza sativa</i>	Sun et al., 2008
<i>Bacillus cereus</i> *	<i>Oryza rufipogon</i>	Zhang et al., 2008
<i>Bacillus licheniformis</i> <i>Rhizobium tropici</i> <i>Pantoea agglomerans</i> <i>Bacillus cereus</i>	<i>Theobroma cacao</i>	Melnick et al., 2011
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> <i>Stenotrophomonas nitritireduce</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Bacillus mycoides</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Nikolic et al., 2011
	<i>Musa spp.</i>	Andrade et al., 2014
	<i>Populus spp.</i>	Kandel et al., 2015
	<i>Trichilia elegans</i>	Rhoden et al., 2015
	<i>Triticum aestivum</i>	Verma et al., 2015
	<i>Phoenix dactylifera</i>	Yaish et al., 2015
		Szymánska et al., 2016

Somente 5 espécies foram comuns entre as plantas de *A. othonianum* e estas têm ampla atividade biológica funcional descrita na literatura. Espécies dos gêneros *Pantoea*, *Acinetobacter* e *Serratia*, estão relacionadas na promoção do crescimento vegetal, principalmente pela ação antagonista a patógenos, síntese de sideróforos, fitormônios e solubilização de fosfatos inorgânicos (Hardoim et al., 2015; Kandel et al., 2015; Khan et al., 2015; Rybakova et al., 2015; Walterson e Stavrinides, 2015). Enquanto, o gênero *Rhizobium* é conhecido pela fixação biológica de nitrogênio (Brader et al., 2014). O gênero *Bacillus* foi relacionado à solubilização de fosfatos, fixação de nitrogênio, síntese de fitormônios e sideróforos (Kumar et al., 2012; Kavamura et al., 2013; Berg et al., 2014). Os gêneros *Rhizobium*, *Bacillus* e *Serratia* são explorados atualmente como inoculantes comerciais (Berg, 2009; Bashan et al., 2014). Espécies enquadradas como raras representaram 64% do total de bactérias isoladas, entre elas *Bacillus megaterium*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia nodosa* com potencial para aplicação em produtos/processos biotecnológicos, como em inoculantes microbianos para plantas (Adesemoye & Kloepper, 2009; Berg, 2009; Ryan et al., 2009).

A análise filogenética organizou as espécies de acordo com seu grau de parentesco, e agrupamentos monofiléticos foram formados com as espécies pertencentes ao filo Firmicutes, o mesmo ocorreu com a classe Rhizobiales e Enterobacteriales.

Durante a interação planta-hospedeiro, alguns fatores podem influenciar a composição da microbiota, como os mecanismos que regem a invasão (alguns endófitos são transmitidos verticalmente enquanto que outros advêm do ambiente) (Truyens et al., 2015) e a genética em ambos os parceiros (diversidade da comunidade microbiana em espécies cultivadas e selvagens) (Elbeltagy et al., 2001; Finkel et al., 2017). Deve-se a esses fatores a variação do índice de diversidade de Shannon (H') e alta frequência de exemplares raros nos três exemplares de planta de *A. othonianum* Rizz.

Estudos explorativos com tecnologias analíticas de alto rendimento podem revelar outros grupos endofíticos, como os não cultiváveis (Martiny et al., 2006). Mas as pesquisas microbianas com técnica dependente de cultivo permitem a construção de banco de germoplasma microbiano e ao mesmo tempo é um protocolo adequado para obtenção de cepas promissoras para agricultura e indústria (Ryan et al., 2008; Tikhonovich & Provorov, 2011; Mitter et al., 2016; Finkel et al., 2017).

A identificação da comunidade microbiana endofítica cultivável de *A. othonianum* possibilita futuras pesquisas de reinoculação para investigar traços

funcionais e possíveis benefícios que cepas isoladas ou combinadas podem fornecer à planta hospedeira, Zinniel et al. (2002) apontam que a maioria dos endofitos de plantas podem recolonizar o hospedeiro original e promover acréscimo em seu crescimento.

5 Conclusão

A comunidade bacteriana endofítica cultivável de *Anacardium othonianum* Rizzini, contempla 22 espécies distribuídas nos filos Proteobacteria e Firmicutes.

6 Referências

- Adesemoye, A. O., & Kloepper, J. W. (2009). Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Applied microbiology and biotechnology*, 85(1), 1-12.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., & Iqar, I. (2015). Selective isolation and characterization of agriculturally beneficial endophytic bacteria from wild hemp using canola. *Pakistan Journal of Botany*, 47(5), 1999-2008.
- Andrade, L. F., de Souza, G. L. O. D., Nietsche, S., Xavier, A. A., Costa, M. R., Cardoso, A. M. S., & Pereira, D. F. G. S. (2014). Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(1), 27-34.
- Bardou, P., Mariette, J., Escudié, F., Djemiel, C., & Klopp, C. (2014). jvenn: an interactive Venn diagram viewer. *BMC Bioinformatics*, 15(1), 107.
- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5(148), 1-7.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27(1), 30-37.
- Bresolin, J. D., Bustamante, M. M. C., Krüger, R. H., Silva, M. R. S. S., & Perez, K. S. (2010). Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 391-403.

- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 807-838.
- Carvalho Correa, G., Naves, R. V., da Rocha, M. R., Chaves, L. J., & Borges, J. D. (2008). Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), visando melhoramento genético. *Bioscience Journal*, 24(4), 42-47.
- Cheng, H. R., & Jiang, N. (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology Letters*, 28(1), 55-59.
- Dunn, I. S., & Blattner, F. R. (1987). Charons 36 to 40: multi enzyme, high capacity, recombination deficient replacement vectors with polylinkers and ploystuffers. *Nucleic Acids Research*, 15(6), 2677-2698.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Sato, T., Suzuki, H., Ye, B., Hamada, T., ... & Minamisawa, K. (2001). Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11), 5285-5293.
- Friesen, M. L., Porter, S. S., Stark, S. C., von Wettberg, E. J., Sachs, J. L., & Martinez-Romero, E. (2011). Microbially mediated plant functional traits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(1), 23-46.
- Finkel, O. M., Castrillo, G., Paredes, S. H., González, I. S., & Dangl, J. L. (2017). Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 38(1), 155-163.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Doring, M & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.
- Joe, M. M., Devaraj, S., Benson, A., & Sa, T. 2016. Isolation of phosphate solubilizing endophytic bacteria from *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn: Evaluation of plant growth promotion and antioxidant activity under salt stress. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(2), 71-77.
- Jukes, T. H., Cantor, C. R., & Munro, H. N. (1969). Evolution of protein molecules. *Mammalian Protein Metabolism*, 3(21), 132.

- Kandel, S. L., Herschberger, N., Kim, S. H., & Doty, S. L. (2015). Diazotrophic endophytes of poplar and willow for growth promotion of rice plants in nitrogen-limited conditions. *Crop Science*, 55(4), 1765-1772.
- Khan, A. R., Ullah, I., Khan, A. L., Park, G. S., Waqas, M., Hong, S. J. & Shin, J. H. (2015). Improvement in phytoremediation potential of *Solanum nigrum* under cadmium contamination through endophytic-assisted *Serratia* sp. RSC-14 inoculation. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 14032-14042.
- Kavamura, V. N., Santos, S. N., da Silva, J. L., Parma, M. M., Ávila, L. A., Visconti, A. & de Melo, I. S. (2013). Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological research*, 168(4), 183-191.
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hüchelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite—what decides?. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 358-363.
- Kumar, G., Kanaujia, N., & Bafana, A. (2012). Functional and phylogenetic diversity of root-associated bacteria of *Ajuga bracteosa* in Kangra valley. *Microbiological Research*, 167(4), 220-225.
- Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W. L., Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A. A., & Azevedo, J. L. (2005). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and Soil*, 273(1-2), 91-99.
- Ma, Y., Prasad, M. N. V., Rajkumar, M., & Freitas, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 29(2), 248-258.
- Mano, H., Tanaka, F., Nakamura, C., Kaga, H., & Morisaki, H. (2007). Culturable endophytic bacterial flora of the maturing leaves and roots of rice plants (*Oryza sativa*) cultivated in a paddy field. *Microbes and Environments*, 22(2), 175-185.
- Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine, C., Kane, M., Krumins, J. A., Kuske, C. R., Morin, S. N., Ovreas, L., Reysenbach, A. L & Morin, P. J. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews. Microbiology*, 4(2), 102.
- Melnick, R. L., Suárez, C., Bailey, B. A., & Backman, P. A. (2011). Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*, 57(3), 236-245.
- Mesquita, V. A., Magalhães, K. T., Batista, C. F. S., & Schwan, R. F. (2013). The molecular phylogenetic diversity of bacteria and fungi associated with the cerrado soil from

- different regions of Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Microbiology Research*, 4(2), 119-131.
- Mitchell, J. D., & Mori, S. A. (1987). The cashew and its relatives (*Anacardium: Anacardiaceae*). El marañón y sus parientes (*Anacardium: Anacardiaceae*). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 42(1), 1-76.
- Mitter, B., Pfaffenbichler, N., & Sessitsch, A. (2016). Plant–microbe partnerships in 2020. *Microbial Biotechnology*, 9(5), 635-640.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853.
- Nikolic, B., Schwab, H., & Sessitsch, A. (2011). Metagenomic analysis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene (*acdS*) operon of an uncultured bacterial endophyte colonizing *Solanum tuberosum* L. *Archives of Microbiology*, 193(9), 665-676.
- Piccoli, P., Travaglia, C., Cohen, A., Sosa, L., Cornejo, P., Masuelli, R., & Bottini, R. (2011). An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A1 and A3 and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regulation*, 64(2), 207-210.
- Podolich, O., Ardanov, P., Zaets, I., Pirttilä, A. M., & Kozyrovska, N. (2015). Reviving of the endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance. *Plant and Soil*, 388(1-2), 367-377.
- Prakamhang, J., Minamisawa, K., Teamtaisong, K., Boonkerd, N., & Teaumroong, N. (2009). The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Applied Soil Ecology*, 42(2), 141-149.
- Rhoden, S. A., Garcia, A., Santos e Silva, M. C., Azevedo, J. L., & Pamphile, J. A. (2015). Phylogenetic analysis of endophytic bacterial isolates from leaves of the medicinal plant *Trichilia elegans* A. Juss.(Meliaceae). *Genetics and Molecular Biology*. Res, 14(1), 1515-1525.
- Ryan, R. P., Monchy, S., Cardinale, M., Taghavi, S., Crossman, L., Avison, M. B., Berg, G., Lelie, D, V. D. & Dow, J. M. (2009). The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature reviews. Microbiology*, 7(7), 514-526.
- Ryan, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 278(1), 1-9.

- Sano, E. E., Rosa, R., Brito, J. L., & Ferreira, L. G. (2010). Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 166(1), 113-124.
- Santos, T. T., & Varavallo, M. A. (2011). Aplicação de microrganismos endofíticos na agricultura e na produção de substâncias de interesse econômico. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, 32(2), 199-212.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183(1), 92-99.
- Silva, C. F., Senabio, J. A., Pinheiro, L. C., Soares, M. A., & Souchie, E. L. (2015). Isolation and genetic characterization of endophytic and rhizospheric microorganisms from *Butia purpurascens* Glassman. *African Journal of Microbiology Research*, 9(32), 1907-1916.
- Soussi, A., Ferjani, R., Marasco, R., Guesmi, A., Cherif, H., Rolli, E. & Cherif, A. (2016). Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. *Plant and Soil*, 405(1-2), 357-370.
- Souza, R. C., Mendes, I. C., Reis-Junior, F. B., Carvalho, F. M., Nogueira, M. A., Vasconcelos, A. T. R., Vicente, V. A. & Hungria, M. (2016). Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: How fragile is the Brazilian Cerrado?. *BMC microbiology*, 16(1), 1-15.
- Sun, L., Qiu, F., Zhang, X., Dai, X., Dong, X. & Song, W. (2008). Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbial Ecology*, 55(3), 415-424.
- Szymańska, S., Płociniczak, T., Piotrowska-Seget, Z., Złoch, M., Ruppel, S., & Hryniewicz, K. (2016). Metabolic potential and community structure of endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Aster tripolium* L. *Microbiological Research*, 182(1), 68-79.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tikhonovich, I. A., & Provorov, N. A. (2011). Microbiology is the basis of sustainable agriculture: an opinion. *Annals of Applied Biology*, 159(2), 155-168.
- Truyens, S., Weyens, N., Cuypers, A., & Vangronsveld, J. (2015). Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environmental Microbiology Reports*, 7(1), 40-50.
- Verma, P., Yadav, A. N., Khannam, K. S., Panjiar, N., Kumar, S., Saxena, A. K., & Suman, A. (2015). Assessment of genetic diversity and plant growth promoting attributes of

- psychrotolerant bacteria allied with wheat (*Triticum aestivum*) from the northern hills zone of India. *Annals of Microbiology*, 65(4), 1885-1899.
- Vieira, R. F., Agostini-Costa, T., Silva, D. B., Ferreira, F. R., & Sano, S. M. (2010). *Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil*. Embrapa Informação Tecnológica.
- Yaish, M. W., Antony, I., & Glick, B. R. (2015). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting bacteria from date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.) and their potential role in salinity tolerance. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(6), 1519-1532.
- Yu, X., Yang, J., Wang, E., Li, B., & Yuan, H. (2015). Effects of growth stage and fulvic acid on the diversity and dynamics of endophytic bacterial community in *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Frontiers in Microbiology*, 6(867), 1-13.
- Walterson, A. M., & Stavrinides, J. (2015). Pantoea: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6), 968-984.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Zhang, G. X., Peng, G. X., Wang, E. T., Yan, H., Yuan, Q. H., Zhang, W. & Tan, Z. Y. (2008). Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov. *Archives of Microbiology*, 189(5), 431-439.
- Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G. & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2198-2208.

CAPÍTULO II

Traços funcionais de promoção do crescimento vegetal de bactérias endofíticas cultiváveis de *Anacardium othonianum* Rizzini

Resumo: Os micro-organismos constituem um universo pouco explorado na biodiversidade do Cerrado, representando grande potencial para estudos de aplicação biotecnológica. Bactérias endofíticas são aquelas que vivem dentro da planta sem causar sintomas de doenças no seu hospedeiro e podem atuar como promotoras do crescimento vegetal. Objetivou-se com este trabalho selecionar linhagens bacterianas endofíticas cultiváveis de *A. othonianum* com multifatores de promoção do crescimento vegetal *in vitro*. Linhagens endofíticas foram utilizadas nos testes *in vitro* de síntese de auxina (AIA), solubilização de fosfatos inorgânicos, síntese de fosfatase, sideróforo e ação de antibiose. Este trabalho é o primeiro relato sobre traços funcionais de comunidade bacteriana endofítica cultivável de *A. othonianum*. A síntese de AIA foi observada por todas as linhagens bacterianas testadas, variando de 8,74 a 5,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O CaHPO_4 foi a única fonte de fosfato insolúvel solubilizada. A partir destes testes cinco linhagens bacterianas foram selecionadas: *Acinetobacter* sp. Bac109, *Bacillus mycoides* Bac160, *Lysinibacillus sphaericus* Bac161, *Pantoea agglomerans* Bac131 e *Pseudomonas denitrificans* Bac55, para teste de síntese de sideróforo e antagonismo a fungos fitopatogênicos. A capacidade de sintetizar sideróforo foi detectada apenas em *Acinetobacter* sp. Bac109. A inibição do crescimento do fungo *Fusarium* sp. foi observada quando em co-cultura com *Pantoea agglomerans* Bac131 (48,48 %), seguido de *Lysinibacillus sphaericus* Bac161 (42,69 %) e *Acinetobacter* sp. Bac109 (35,00 %). Conclui-se que as bactérias estudadas têm traços funcionais importantes que direcionam para promoção de crescimento de plantas, dentre as quais se destacaram as linhagens *Acinetobacter* sp. Bac109, *Bacillus mycoides* Bac160, *Lysinibacillus sphaericus* Bac161 e *Pantoea agglomerans* Bac131 com multifatores de interesse para desenvolvimento de produtos biotecnológicos agrícolas.

Palavras-chave: Caju-de-árvore-do-cerrado; síntese de fitormônio; solubilização de fosfato; síntese de sideróforo; ação antagonista.

1 Introdução

Os micro-organismos são responsáveis pela manutenção da flora ao atuarem na degradação da matéria orgânica, reciclagem e disponibilização de nutrientes, decomposição de xenobióticos e controle biológico de doenças (Bresolin et al., 2010; Bulgarelli et al., 2013). Contudo, os micro-organismos do Cerrado constituem um universo pouco explorado, com grande potencial para estudos de aplicação biotecnológica (Mesquita et al., 2013).

Dentre as espécies vegetais do Cerrado, o *Anacardium othonianum* Rizzini, conhecido como caju-de-árvore-do-cerrado, é considerado um dos principais cajueiros de importância econômica para a região centro-oeste do Brasil, por diversas razões, entre elas, servir de fonte de alimento (Bessa et al., 2013; Fonseca et al., 2014; Souza et al., 2015), ter aplicação na medicina tradicional (Curado et al., 2016) e ser utilizado na implantação de pomares comerciais e na recuperação de áreas degradadas (Assis et al., 2014).

A cajucultura tem alguns desafios como períodos prolongados de estiagem e ataque de pragas e doenças que causam impactos negativos na produtividade (Melo et al., 1999). Neste sentido a busca por superar esses desafios aliadas a práticas sustentáveis vai ao encontro de novas tecnologias como a utilização de micro-organismos associados às plantas, que promovam vantagens frente às adversidades (Gaiero et al., 2013).

As bactérias endofíticas são conhecidas por habitar o interior dos tecidos vegetais, durante pelo menos parte do seu ciclo de vida, sem causar sintomas de doença em seu hospedeiro (Kogel et al., 2006). Nesta íntima associação, as bactérias promovem o crescimento de plantas através de três mecanismos: bioestimulação, biofertilização e biocontrole (Farrar et al., 2014; Hardoim et al., 2015; Abbamondi et al., 2016).

A bioestimulação aumenta o crescimento das plantas pela produção direta de fitormônios (Piccoli et al., 2011; Smith et al., 2015; Khan et al., 2016), aumentando o comprimento e número de pelos radiculares, permitindo ampliar a área de captação radicular (Piccoli et al., 2011; Khan et al., 2016). A biofertilização promove a disponibilidade de nutrientes como fósforo e nitrogênio que não estão prontamente disponíveis as plantas (Berg et al., 2014; Brader et al., 2014) e o biocontrole protege as plantas contra patógenos (Newman et al., 2013; Brader et al., 2014).

Nos últimos anos, muitos trabalhos demonstram o potencial de bactérias endofíticas na promoção do crescimento vegetal (Gaiero et al., 2013; Podolich et al.,

2015; Santoyo et al., 2016) o que pode resultar em produtos comerciais agrícolas, como os bioestimulantes: Companion - Bayer CropScience® (*B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. megaterium*) e Proradix - Growth Products® (*Pseudomonas* spp.) que foram desenvolvidos e são comercializados em grande escala (Berg 2009).

Dada à importância regional do caju-de-árvore-do-cerrado e ausência de estudos que investiguem as potencialidades da microbiota bacteriana que coloniza endofiticamente esta espécie, objetivou-se com este trabalho selecionar linhagens bacterianas endofíticas cultiváveis de *A. othonianum* com multifatores de promoção do crescimento vegetal *in vitro*, como síntese de auxina, solubilização de fosfatos inorgânicos, síntese fosfatase, sideróforo e ação de antibiose.

2. Material e métodos

Bactérias endofíticas de *A. othonianum* pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto Federal Goiano, foram submetidas a triagem funcional *in vitro* para identificação de linhagens com maior potencial de promoção de crescimento vegetal *in vitro* (Figura 1).

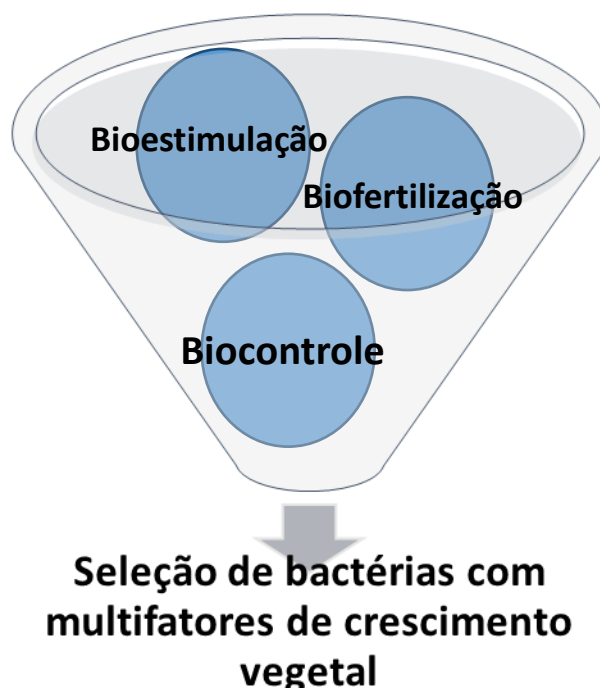


Figura 1 Figura representativa da triagem funcional *in vitro* de bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini.

2.1 Teste de bioestimulação: síntese de auxina

Alíquotas de 1 mL de cultura bacteriana com densidade óptica (DO_{600}) $\sim 0,1$ foram inoculadas em triplicata, em vidros de penicilina contendo 5 mL de meio caldo nutriente (extrato de carne 3 g L^{-1} e peptona 5 g L^{-1}), suplementado com $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de triptofano e permaneceram sob agitação constante em mesa agitadora pendular (TE-240/1 Tecnal[®]), com rotação a 90 rpm, durante 48 h a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e na ausência de luz.

A síntese de AIA foi avaliada por meio do método colorimétrico descrito por Gordon e Mitchell (1951). Foram centrifugados 2 mL da cultura a 12.000 rpm, por 5 minutos a $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida 1 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL do reagente Salkowski ($1,875 \text{ g FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100 mL H_2O e 150 mL H_2SO_4). Percorrido 15 minutos em ausência de luz, foi realizada a leitura a 530 nm em espectrofotômetro. As concentrações de síntese de AIA foram obtidas através da equação da curva padrão com AIA comercial e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott (5%).

2.2 Testes de biofertilização: solubilização de fosfato e síntese de fosfatase

Alíquotas de 1 mL de cultura bacteriana ($DO_{600} \sim 0,1$) foram inoculados em triplicata em vidros de penicilina contendo 5 mL meio. Foram testados três fontes insolúveis de fosfato: 5 g L^{-1} de fosfato de cálcio (CaHPO_4) ou 1 g L^{-1} de fosfato de ferro (FePO_4) ou 2 g L^{-1} de fosfato de alumínio (AlPO_4) com pH 7 (adaptado de Gadagi e Sa 2002) e mantidos sob agitação constante com auxílio de mesa agitadora pendular (TE-240/1 Tecnal[®]) em rotação a 90 rpm, por 72 h e a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Após o período de crescimento o pH foi aferido e a solubilização de fosfato avaliada por meio do método colorimétrico descrito por Braga e DeFelipo (1974) em que 2 mL da cultura foi centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos a $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida 1 mL do sobrenadante foi adicionado a 9 mL do reagente de trabalho [900mL de água destilada, 0,4 g de vitamina C e 100 mL da solução 725 (0,1 g de subcarbonato de bismuto, 6,8 mL de ácido sulfúrico, 30 mL de água destilada, 2,0 g de molibdato de amônio, 6,8 mL de ácido sulfúrico/completar para 100 mL em balão volumétrico)] percorrido 20 minutos foi realizada leitura a 725 nm em espectrofotômetro. A solubilização de fosfato foi determinada utilizando equação da curva padrão de ácido fosfórico e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott (5%).

Para detecção de síntese de fosfatase foi realizada a inoculação em triplicada com 5 μL de cada cultura bacteriana sobre o meio de cultura TSA (triptocaseína de soja), com pH ajustado para 7,3 e adicionado assepticamente $0,2 \text{ mL L}^{-1}$ de difosfato de

fenoltaleína (0,5%). As placas foram mantidas em estufa bacteriológica a 28 °C por 72 h e 3 mL de hidróxido de amônio (8,4%) foi adicionado na tampa das placas de petri, as quais foram mantidas por 15 minutos em estufa. Após esse período, a produção de fosfatase foi verificada pela coloração rósea entorno das colônias (Romeiro, 2007).

2.3 Testes de biocontrole: síntese de sideróforo e antibiose

Baseado nos resultados dos testes *in vitro* de bioestimulação e biofertilização as linhagens bacterianas endofíticas foram ranqueadas de acordo com o maior desempenho nos traços funcionais analisados.

As linhagens bacterianas selecionadas foram co-inoculadas com o fungo fitopatígeno *Fusarium* sp. Discos de micélio de 5 mm foram inoculados no centro da placa de petri com meio BDA (infusão de 200 g de batata, dextrose 20 g e ágar 15 g) e com distância de 2 cm foram inoculados 5 µL de cultura bacteriana. O tratamento controle foi considerado a placa contendo apenas o fitopatígeno, as placas foram incubadas em temperatura ambiente por 7 dias. O diâmetro do micélio foi medido com um paquímetro, e porcentagem de supressão para cada tratamento foi calculada através do índice relativo (IR):

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

RC= raio da colônia do patógeno no tratamento controle

RX= raio da colônia do patógeno pareada com o isolado endofítico

A síntese de sideróforo foi analisada utilizando a metodologia de Schwyn e Neilands (1987) o método consiste na utilização de um complexo corante-ferro. O sideróforo, quando sintetizado e secretado, sequestra o ferro, alterando seu perfil de oxidação, fazendo com que a solução presente no meio mude de cor. A solução do corante é formada por três soluções: primeira consiste em 0,06g de cromo azurol S (CAS) solubilizado em água destilada (50 mL); segunda na solubilização de 0,0027g de FeCl₃.6H₂O em HCl 10 mL; e a terceira na solubilização de 0,073g de HDTMA em água destilada (40 mL). As três soluções foram misturadas em um frasco e submetidas a autoclavação a 120°C por 15 minutos. O meio foi preparado separadamente, 100 mL de meio MM9 (1,28 g de Na₂HPO₄, 0,3 g de KH₂PO₄, 0,05 g de NaCl e 0,1 g de NH₄Cl)

adicionado em 120 mL PIPES (4,51g de piperazina e 2,25 g de Agar) e o pH ajustado a 6,8 (uma vez que esse composto não dissolve em pH abaixo de 5 e acima de 6,8 a solução fica verde). Autoclavou-se a 120°C por 15 minutos. Após atingir a temperatura inferior à 50 °C, adicionaram-se 50mL de solução de glicose 40%. Verteu-se o meio azul em placa após a solidificação as bactérias foram inoculadas em estrias e mantidas por 72 horas a 30 ° C, a produção de sideróforo foi detectada pela formação de um alo amarelo em volta do crescimento bacteriano.

3 Resultados

A síntese de AIA foi observada por todas as linhagens bacterianas testadas, variando de 8,74 a 5,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as maiores sínteses foram de *Bacillus mycoides* Bac160 (8,74 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *Pantoea agglomerans* Bac131 (8,70 $\mu\text{g mL}^{-1}$), conforme tabela 1.

O CaHPO_4 foi a única fonte de fosfato insolúvel solubilizada. *Enterobacter cloacae* Bac176 (30,82 mg L^{-1}) foi a linhagem com maior potencial de solubilização, seguido de *Bacillus mycoides* Bac160 (20,00 mg L^{-1}), *Acinetobacter* sp Bac109 (17,29 mg L^{-1}) e *Pantoea agglomerans* Bac131 (15,20 mg L^{-1}). A linhagem *Enterobacter cloacae* Bac 176 foi a única capaz de solubilizar CaHPO_4 em meio básico, devido a capacidade de produzir fosfatases, já *Pantoea agglomerans* Bac131 (15,20 mg L^{-1}), *Pseudomonas denitrificans* Bac55 (11,80 mg L^{-1}) e *Serratia marcescens* Bac252 (6,15 mg L^{-1}) têm os dois mecanismos de solubilização, redução de pH e síntese de enzima fosfatase (Tabela 1).

Tabela 1 Síntese de auxina (AIA), solubilização de fosfato de cálcio (CaHPO₄) por bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini. Rio Verde – GO, 2017.

Linhagens	Síntese de AIA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solubilização de CaHPO ₄		
		Fósforo livre (mg.mL^{-1})	pH	Fosfatase
<i>Acinetobacter oleivorans</i> Bac52	5,65 E	15,22 C	3,85 G	-
<i>Acinetobacter</i> sp. Bac109	5,67 E	17,29 B	4,16 G	+
<i>Bacillus cereus</i> Bac116	5,45 F	14,13 C	4,20 G	-
<i>Bacillus licheniformis</i> Bac124	5,68 E	3,57 E	7,4 B	-
<i>Bacillus megaterium</i> Bac165	6,25 C	8,40 D	3,85 G	-
<i>Bacillus mycoides</i> Bac160	8,74 A	20,00 B	4,56 F	-
<i>Bacillus pumilus</i> Bac93	6,41 C	3,36 E	5,90 D	-
<i>Brevibacillus agri</i> Bac199	6,92 B	0,14 E	6,38 D	-
<i>Burkholderia nodosa</i> Bac17	5,78 E	1,93 E	6,55 D	-
<i>Citrobacter farmeri</i> Bac12	6,47 C	0,14 E	6,77 C	-
<i>Enterobacter cloacae</i> Bac176	6,00 D	30,82 A	8,51 A	+
<i>Enterobacter oryzae</i> Bac224	6,40 C	1,72 E	5,58 E	-
<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> Bac172	6,00 D	2,34 E	4,00 G	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Bac56	5,90 D	0,14 E	8,75 A	-
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> Bac161	5,74 E	17,50 B	8,72 A	-
<i>Paenibacillus vortex</i> Bac123	5,37 F	1,60 E	4,78 F	-
<i>Pantoea agglomerans</i> Bac131	8,70 A	15,20 C	5,07 F	+
<i>Pseudomonas denitrificans</i> Bac55	6,56 C	11,80 C	4,28 G	+
<i>Rhizobium tropici</i> Bac117	6,34 C	1,59 E	4,72 F	-
<i>Serratia marcescens</i> Bac252	6,14 C	6,15 D	6,22 D	+
<i>Stenotrophomonas nitritireduce</i> Bac236	6,34 C	1,95 E	6,20 D	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> Bac11	6,06 D	1,41 E	6,76 C	-

^zMédias seguidas pela mesma letra maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott (5%). (-) Ausência da atividade e (+) Presença da atividade.

A partir destes testes cinco linhagens bacterianas, que possuíram atividade de bioestimulação e biofertilização combinado que não têm ação patogênica a humanos ou plantas foram selecionadas: *Acinetobacter* sp Bac109, *Bacillus mycoides* Bac160, *Lysinibacillus sphaericus* Bac161, *Pantoea agglomerans* Bac131 e *Pseudomonas denitrificans* Bac55, para avaliar ação de biocontrole.

A capacidade de sintetizar sideróforo foi detectada apenas em *Acinetobacter* sp. Bac109. A inibição do crescimento do fungo *Fusarium* sp. foi observada quando em co-cultura com todas as linhagens bacterianas testadas, mas maior porcentagem de inibição foi observado por *Pantoea agglomerans* Bac131 (48,48 %), seguido de *Lysinibacillus sphaericus* Bac161 (42,69 %) e *Acinetobacter* sp Bac109 (35,00 %) (Tabela 2).

Tabela 2 Bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini com síntese de sideróforo e antibiose contra *Fusarium* sp. Rio Verde – GO, 2017.

Linhagens	Síntese de Sideróforo	Índice relativo de inibição ao <i>Fusarium</i> sp. (%)
<i>Acinetobacter</i> sp. Bac109	+ ^z	35,00
<i>Bacillus mycoides</i> Bac160	ND	32,48
<i>Lysinibacillus sphaericus</i> Bac161	ND	42,69
<i>Pantoea agglomerans</i> Bac131	ND	48,48
<i>Pseudomonas denitrificans</i> Bac55	ND	2,98

^z (+) Presença da atividade, (-) Ausência da atividade e (ND) atividade não detectada.

As bactérias *Acinetobacter* sp. Bac109, *Bacillus mycoides* Bac160, *Lysinibacillus sphaericus* Bac161 e *Pantoea agglomerans* Bac131 têm traços funcionais importantes, como: síntese de AIA, solubilização de CaHPO₄ e antibiose aos fungos *Fusarium* sp. o que indica potencial ação na promoção do crescimento vegetal *in vivo* (Figura 2).

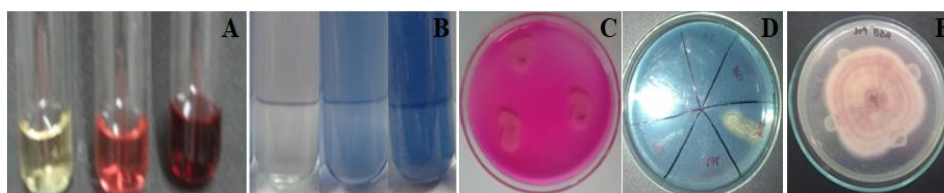


Figura 2 Traços funcionais de bactérias endofíticas de *Anacardium othonianum* Rizzini: síntese de auxina (A), solubilização de fosfato (B), síntese de fosfatase (C), síntese de sideróforo (D) e antibiose a *Fusarium* sp. (E).

4 Discussão

A descrição dos traços funcionais de uma comunidade endofítica permite compreender os laços que sustentam a relação, bem como, elucidar possíveis aplicações

biotecnológicas. Este trabalho é o primeiro relato sobre os traços funcionais *in vitro* da comunidade bacteriana endofítica cultivável em *A. othonianum* e indica o potencial destas bactérias na promoção do crescimento vegetal.

As linhagens bacterianas podem ter mais de um traço funcional, então a escolha e comparação sistemática de vários traços possibilita a escolha das linhagens com múltiplas funções. Mas vale resaltar que a presença de um dos traços funcionais testados já implica a linhagem bacteriana uma vantagem, e podem ser testadas isoladamente para fins específicos. A capacidade de sintetizar AIA por micro-organismos proporciona vantagens ao seu hospedeiro, pois este fitormônio atua diretamente no alongamento celular, aumentando o comprimento e número de pelos radiculares, o que conseqüentemente aumenta a área de captação radicular e permite explorar novas regiões do solo (Piccoli et al., 2011; Khan et al., 2016).

A síntese de AIA já foi relatada nas espécies endofíticas como em *Bacillus pumilus* (Andrade et al., 2014), *Bacillus megaterium* (Rajkumar e Freitas, 2013), *Acinetobacter sp* (Andrade et al., 2014; Joe et al 2016), *Lysinibacillus sphaericus* (Sharma e Saharan, 2015), *Stenotrophomonas maltophilia* (Almeida Lopes et al., 2016), *Pantoea agglomerans* (Sergeeva et al., 2007), *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae* (Afzal et al., 2015), demonstrando que este traço funcional é inerente a espécie, o que corrobora com a utilização dos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Rhizobium* e *Stenotrophomonas* como inoculantes microbianos comerciais (Berg, 2009).

Outro traço funcional importante é a solubilização e mineralização do fósforo por bactérias: a solubilização ocorre como consequência da ação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (ácido glucônico e cítrico) e a mineralização ocorre através da síntese enzimas fosfatases, sendo que estes dois traços funcionais podem coexistir na mesma bactéria (Glick, 2012; Berg et al., 2014; Brader et al., 2014). No solo a maior parte do fósforo está insolúvel e forma complexos como fosfato de ferro (FePO_4), alumínio (AlPO_4) e cálcio (CaHPO_4), sua indisponibilidade geralmente é fator limitante para o crescimento vegetal, pois esta relacionado a energia e ao anabolismo celular, essencial para o crescimento das plantas (Glick, 2012; Berg et al., 2014).

As linhagens bacterianas de *A. othonianum* com capacidade de solubilizar fosfato corroboram com dados de outros trabalhos, nos quais *Serratia marcescens* (Afzal et al., 2015), *Bacillus megaterium* (Rajkumar e Freitas, 2013), *Acinetobacter oleivorans*, *Lysinibacillus sphaericus* (Sharma e Saharan, 2015), *Enterobacter cloacae*,

Pantoea agglomerans, *Stenotrophomonas maltophilia* (Almeida Lopes et al., 2016), *Bacillus* sp e *Acinetobacter* sp (Andrade et al., 2014; Joe et al 2016) já foram descritas com este traço funcional. Infelizmente, a aplicação comercial de bactérias solubilizadoras tem sido bastante limitada associada a outros traços como capacidade de fixação de nitrogênio e síntese de fitormônios (Glick, 2012).

Micro-organismos com traços funcionais relacionados ao biocontrole protegem as plantas principalmente pela síntese de substâncias que agem inibindo o crescimento do patógeno (Newman et al., 2013; Brader et al., 2014) e são empregados como prática agrícola sustentável (Lin et al., 2014). A síntese de sideróforos ocorre em condição limitada de ferro e forma-se após a complexação do ferro insolúvel, permitindo a restrição nutricional deste nutriente ao patógeno e seu transporte à célula, sendo considerada uma das maiores fontes de ferro nas plantas (Sujatha & Ammani, 2013).

O emprego de micro-organismos não patogênicos em seus hospedeiros tem se mostrado eficazes no controle de fitopatógenos e atualmente, a partir de vários gêneros bacterianos desenvolveram uma gama de produtos para esta finalidade: com o gênero *Bacillus* (Avogreen[®], Amylo-X, Biosubtilin, Botrybell, Cease[®], Companion[®]/Kodiak[®], EcoGuard[®], FZB24[®], HiStick N/T[®], Subtilex[®], Pro-Mix[®], Nacillus[®], Rhapsody[®], Rhizo Plus[®], RhizoVital[®], Serenade[®], Sonata[®], Sublic[®] e Yield Shield[®]), *Burkholderia* (Botrycid[®]), *Pantoea* (Bloomtime Biological[®] e Blossom Bless[™]), *Pseudomonas* (Biomonas, Biosave[®] 100/110, BlightBan A506[®], Cedomon[®], Cerall[®], BlightBan A506[®], Cedomon[®] e Cerall[®]) e *Serratia* (Rhizo Star[®]) (Bettiol et al., 2012). Estes micro-organismos desempenham atividades antagônicas e estão associados com a promoção do crescimento da planta (Lin et al., 2014).

A identificação dos traços funcionais de uma coleção de micro-organismos endofíticos cultiváveis permite a seleção de linhagens promissoras e possibilita futuras pesquisas *in vivo* para confirmar a atividade de promoção de crescimento vegetal. Zinniel et al. (2002) apontam que a maioria dos endófitos de plantas podem recolonizar o hospedeiro original e promover crescimento.

5. Conclusão

As bactérias endofíticas cultiváveis de *A. othonianum* têm traços funcionais importantes que direcionam para promoção de crescimento de plantas, dentre as quais se destacaram as linhagens *Acinetobacter* sp. Bac109, *Bacillus mycoides* Bac160,

Lysinibacillus sphaericus Bac161 e *Pantoea agglomerans* Bac131 com multifatores de interesse para desenvolvimento de produtos biotecnológicos agrícolas.

6. Referências

- Abbamondi, G. R., Tommonaro, G., Weyens, N., Thijs, S., Sillen, W., Gkorezis, P., Odice, C., Rangel, W. M., Nicolaus, B., & Vangronsveld, J. (2016). Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1-10.
- Almeida Lopes, K. B., Carpentieri-Pipolo, V., Oro, T. H., Stefani Pagliosa, E., & Degrassi, G., 2016. Culturable endophytic bacterial communities associated with field grown soybean. *Journal of Applied Microbiology*, 120(3), 740-755.
- Andrade, L. F., de Souza, G. L. O. D., Nietsche, S., Xavier, A. A., Costa, M. R., Cardoso, A. M. S., & Pereira, D. F. G. S. 2014. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(1), 27-34.
- Assis, K. C., Pereira, F. D., Alberto, P. S., Silva, F. G., Silva, J. W., & de Menezes, C. C. E. (2014). *In vitro* cultivation of *Anacardium othonianum* Rizz.: Effects of growth regulator, explant orientation and lighting. *African Journal of Biotechnology*, 11(7), 1559-1566.
- Afzal, I. M. R. A. N., Shinwari, Z. K., & Iqar, I. (2015). Selective isolation and characterization of agriculturally beneficial endophytic bacteria from wild hemp using canola. *Pakistan Journal of Botany*, 47(5), 1999-2008.
- Bessa, N. G. F., Borges, J. C. M., Beserra, F. P., Carvalho, R. H. A., & Pereira, M. A. B. (2013). Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde–Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(4), 692-707.
- Bettiol, W., Morandi, M. A. B., Pinto, Z. V., Júnior, P., Correa, E. B., Moura, A. B., Lucon, C. M. M., Costa, J. C. B & Bezerra, J. L. (2012). Produtos comerciais à base de agentes de biocontrole de doenças de plantas. *Embrapa Meio Ambiente- Documentos (INFOTECA-E)*.
- Braga, J. M.; Defelipo, B. V., 1974. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. *Revista Ceres*, 113(21), 73-85.

- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in microbiology*, 5(148), 1-7.
- Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, 30-37.
- Berg, G., Grube, M., Schloter, M., & Smalla, K. (2014). Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 5(148), 1-7.
- Bresolin, J. D., Bustamante, M. M. C., Krüger, R. H., Silva, M. R. S. S., & Perez, K. S. (2010). Structure and composition of bacterial and fungal community in soil under soybean monoculture in the Brazilian Cerrado. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(2), 391-403.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P., 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 807-838.
- Curado, F. A. M. L. I. M. J., Gazolla, A. P., Pedroso, R. C. N., Pimenta, L. I. P., de Oliveira, P. F., Tavares, D. C., Silva, M. L. A., Cunha, W. R., Pietro, R. C. L. R., Januário, A. H., Pauletti, P. I. M. J. Sales, J. F. & Silva, F. G. (2016). Antifungal and cytotoxicity activities of *Anacardium othonianum* extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(29), 450-456.
- Farrar, K., Bryant, D., & Cope-Selby, N. (2014). Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant Biotechnology Journal*, 12(9), 1193-1206.
- Fonseca, C. M., Boari, C. A., Domingues, P. H. F., Meira, D. P., Fernandes, L. S. F., & Dumont, M. A. (2014). Iogurte produzido com cajuí (*Anacardium othonianum* Rizz). *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4), 1829-1836.
- Gadagi, R. S., & Sa, T. (2002). New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. *Soil Science and Plant Nutrition*, 48(4), 615-618.

- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9), 1738-1750.
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 1-16.
- Gibson, B. R., & Mitchell, D. T. (2004). Nutritional influences on the solubilization of metal phosphate by ericoid mycorrhizal fungi. *Mycological Research*, 108(8), 947-954.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Doring, M & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.
- Joe, M. M., Devaraj, S., Benson, A., & Sa, T. (2016). Isolation of phosphate solubilizing endophytic bacteria from *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn: Evaluation of plant growth promotion and antioxidant activity under salt stress. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(2), 71-77.
- Khan, A. L., Halo, B. A., Elyassi, A., Ali, S., Al-Hosni, K., Hussain, J., Al-Harrasi, A. & Lee, I. J. (2016). Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21(1), 58-64.
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hüchelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite—what decides?. *Current opinion in Plant Biology*, 9(4), 358-363.
- Lin, Y., Du, D., Si, C., Zhao, Q., Li, Z., & Li, P. (2014). Potential biocontrol *Bacillus* sp. strains isolated by an improved method from vinegar waste compost exhibit antibiosis against fungal pathogens and promote growth of cucumbers. *Biological Control*, 71(1), 7-15.
- Melo, Q. M. S., Teixeira, L. M. S., Bleicher, E., & Rodrigues, S. M. M. (1999). *Artropodes e microrganismos de importancia quarentenaria associados ao cajueiro. EMBRAPA-CNPAT.*
- Mesquita, V. A., Magalhães, K. T., Batista, C. F. S., & Schwan, R. F. (2013). The molecular phylogenetic diversity of bacteria and fungi associated with the cerrado soil from different regions of Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Microbiology Research*, 4(2), 119-131.

- Newman, M. A., Sundelin, T., Nielsen, J. T., & Erbs, G. (2013). MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4(139), 1-14.
- Piccoli, P., Travaglia, C., Cohen, A., Sosa, L., Cornejo, P., Masuelli, R., & Bottini, R. (2011). An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A1 and A3 and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regulation*, 64(2), 207-210.
- Podolich, O., Ardanov, P., Zaets, I., Pirttilä, A. M., & Kozyrovska, N., 2015. Reviving of the endophytic bacterial community as a putative mechanism of plant resistance. *Plant and Soil*, 388(1-2), 367-377.
- Rajkumar, M., Ma, Y., & Freitas, H., 2013. Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. *Journal of Environmental Management*, 128(1), 973-980.
- Romeiro, R.S. 2007. Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos. Viçosa, MG: UFV, 172p.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R., 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183(1), 92-99.
- Schwyn, B., Neilands, J. B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56.
- Sergeeva, E., Hirkala, D. L., & Nelson, L. M., 2007. Production of indole-3-acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by pantoeaagglomerans rhizosphere isolates. *Plant and Soil*, 297(1-2), 1-13.
- Sharma, N., & Saharan, B. S., 2015. Role of *Lysinibacillus sphaericus* SNCh5 Bacterial Strain as Bio-inoculant for Agriculture Practice. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(12), 484-499.
- Smith, D. L., Praslickova, D., & Ilangumaran, G. (2015). Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. *Frontiers in plant science*, 6(722), 1-6
- Souza, P. L. C., & Silva, M. R. (2015). Quality of granola prepared with dried caju-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) and baru almonds (*Dipteryx alata* Vog). *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1712-1717.
- Sujatha, N., & Ammani, K. (2013). Siderophore production by the isolates of fluorescent Pseudomonads. *International Journal of Current Research and Review*, 5(20), 1-7.

Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmariski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G. & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(5), 2198-2208.

CAPÍTULO III

Promoção do crescimento inicial de *Anacardium othonianum* Rizzini por bactérias endofíticas

Resumo: As plantas são repletas de micro-organismos endofíticos, que tem grande potencial em promover o crescimento vegetal e são definidos como aqueles que habitam o interior dos tecidos vegetais, sem causar danos visíveis a seu hospedeiro. Nesta íntima associação, as bactérias podem promover o crescimento das plantas através da síntese de substâncias promotoras do crescimento, da aquisição de nutrientes e do controle biológico de doenças. Mas para comprovar o efeito benéfico do micro-organismos, testes *in vivo* de reinoculação em seu hospedeiro devem ser realizados para avaliar a indução de crescimento. Os micro-organismos endofíticos de *Anacardium othonianum* Rizzini, apresentam traços funcionais de promoção de crescimento de plantas e por isso, têm potencial em ser utilizados como inoculantes microbianos. Neste sentido, objetivou-se com este trabalho confirmar que linhagens bacterianas endofíticas, isoladas ou em mistura, tem atividade de promoção do crescimento vegetal inicial de *A. othonianum*. Quatro acesso de aquênios foram microbiolizados com os isolados endofíticos *Acinetobacter* sp. (Bac109), *Pantoea agglomerans* (Bac131), combinação de ambos e o controle para posteriormente serem semeados em bandejas plásticas contendo areia. Este é o primeiro trabalho de reinoculação de bactérias endofíticas em *A. othonianum* visando a promoção do crescimento vegetal. A presença dos inóculos bacterianos e os 4 acessos testados afetaram o crescimento inicial de plântulas de *A. othonianum*, sendo que o comprimento médio da parte aérea (CPA), massa fresca e seca da raiz (MFR-MSR), massa fresca e seca da parte aérea (MFPA - MSPA), relação massa fresca da raiz (RMF), e relação massa fresca da raiz (RMs) foram beneficiados pelos tratamentos na presença dos micro-organismos. Conclui-se que diferentes acessos de *A. othonianum* respondem diferentemente a microbiolização de aquênios e que bactérias endofíticas de *A. othonianum* re-inoculadas em aquênios têm atividade de promoção de crescimento inicial.

Palavras-chave: Microbiolização; *Acinetobacter* sp.; *Pantoea agglomerans*; inoculante microbiano.

1 Introdução

Nas regiões dos Cerrados campo sujo e cerradão encontra-se *Anacardium othonianum* Rizzini considerado um ecótipo do *Anacardium occidentale*, e caracterizado por ter folhas mais coriáceas, onduladas e subsésseis, pseudofruto menor e mais ácido que o ecótipo típico das áreas de restinga (Garcia, 2009; Luz e Pirani, 2017; Mitchell e Mori, 1987). Sendo amplamente utilizado como fonte de alimento (Bessa et al., 2013; Fonseca et al., 2014; Souza et al., 2015) e na medicina tradicional pelas comunidades nativas (Curado et al., 2016).

A. othonianum é conhecido popularmente como caju-de-árvore-do-cerrado ou cajuí, com grande variação de coloração e massa do pseudofruto, contém elevado valor nutritivo, relacionado principalmente ao alto teor de vitamina C, fibras e compostos fenólicos, em especial taninos que lhe confere adstringência (Alves et al., 2013; Alves et al., 2016; Silva et al., 2008). Nas populações nativas de *A. othonianum* há grande variedade morfológica, tanto nos órgãos reprodutivos quanto nos vegetativos, isto se dá principalmente por serem plantas alógamas e devido à ausência de seleção de plantas elites e trabalhos de melhoramento genético.

Neste sentido, a busca para superar estes desafios aliada a práticas sustentáveis vai ao encontro de novas tecnologias como a utilização de micro-organismos associados às plantas, que promovam vantagens frente às adversidades (Gaiero et al., 2013). As bactérias endofíticas têm grande potencial em promover o crescimento vegetal (Gaiero et al., 2013; Podolich et al., 2015; Santoyo et al., 2016) e são definidas como aquelas que habitam o interior dos tecidos vegetais, durante pelo menos parte do seu ciclo de vida, sem causar danos visíveis a seu hospedeiro (Kogel et al., 2006). Nesta íntima associação as bactérias podem promover o crescimento de plantas através de três mecanismos: fitoestimulação, biofertilização e biocontrole (Abbamondi et al., 2016; Farrar et al., 2014; Hardoim et al., 2015).

Nas últimas décadas estudos investigam a eficiência deste grupo de micro-organismos, através do isolamento, cultivo e triagem funcional da comunidade microbiana associada ao vegetal. Entretanto, na maioria dos estudos a atividade de promoção do crescimento vegetal só pôde ser confirmada em testes *in vivo* com a inoculação na planta (Afzal et al., 2015; Andrade et al., 2014).

A inoculação de micro-organismos pode acontecer na espécie vegetal em que foi isolado (Szilagyi-zecchin et al., 2015) ou em outra de interesse – inoculação cruzada (Gomoung et al., 2017; Hassan et al., 2017; Knoth et al., 2013), e uma vez confirmada a

promoção do crescimento, segue-se com o desenvolvimento de inoculantes microbianos comerciais com recomendação conforme testes realizados (inoculantes microbianos específicos ou generalistas) (Berg 2009). Entre os micro-organismos explorados comercialmente encontram-se os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Serratia* e *Pantoea* (Berg, 2009; Bashan et al., 2014).

Objetivou-se com este trabalho selecionar linhagens bacterianas endofíticas isoladas ou em combinação atividade de promoção do crescimento vegetal inicial de *A. othonianum*.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

Frutos de *A. othonianum* foram coletados no município de Montes Claros de Goiás – Goiás, Brasil em quatro acessos distintos: 13 (16°06'57.2"S 051°16'38.3"W 407 m), 36 (16°08'02.2"S 051°17'38.7"W 588 m), 82 (16°08'04.4"S 051°17'38.1"W 585m) e 95 (16°08'05,1" S 051°17'52,5"W 582 m), sendo observada em cada acesso variação morfológica, quanto ao tamanho e coloração do pseudofruto, conforme Figura 1.



Figura 1. Frutos de *Anacardium othonianum* Rizzini. Acesso 13 (A), 36 (B), 82 (C) e 95 (D). Barra de 5 cm.

Após, os aquênios foram separados manualmente dos pseudofrutos, lavados em água corrente e colocados sobre folhas de papel toalha em temperatura ambiente para retirada da umidade superficial. Posteriormente foram tratados com os micro-organismos e plantados.

2.2 Microbiolização dos aquênios

As bactérias endofíticas de *A. othonianum*, *Acinetobacter* sp. (Bac109) e *Pantoea agglomerans* (Bac131) pertencentes à coleção de micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde foram selecionadas para teste de microbiolização, por terem traços funcionais de promoção do crescimento.

As duas bactérias foram cultivadas em caldo nutriente em incubadora a 30 °C com agitação de 120 rpm por \pm 8 h. Posteriormente, centrifugadas por 10 minutos, a 4.000 rpm e 4 °C, o sobrenadante foi descartado e realizadas lavagens com solução salina 0,85% no pellet de células, que foi re-suspendido de modo que atingisse densidade ótica (DO) \sim 1,5 de absorbância em 600 nm.

Os aquênios foram microbiolizados com os isolados endofíticos *Acinetobacter* sp. (Bac109), *Pantoea agglomerans* (Bac131), combinação de ambos e controle (solução salina 0,85%), segundo metodologia de Dourado, et al. (2013) modificada. Foram utilizados 12,5 mL de inóculos padronizados [contendo $54,7 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ *Acinetobacter* sp. (Bac109), $32,3 \times 10^6$ UFC *Pantoea agglomerans* (Bac131), $60,3 \times 10^6$ UFC Bac109 + Bac131 e ausência de crescimento bacteriano no controle] em 25 aquênios por tratamento e durante 20 minutos foi realizado homogeneização em sacos de plásticos.

Após os tratamentos os aquênios foram semeados em bandejas plásticas (50x35x8cm), contendo areia peneirada e autoclavada 2 vezes por 30 minutos, como substrato, e mantidas em condições controladas em Fitotron[®] com fotoperíodo de 16 h a 25 °C, 70% de umidade e intensidade luminosa de $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Três vezes na semana foram irrigados com água destilada.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4x4 (4 acessos e 4 tratamentos de microbiolização), contendo em cada tratamento 5 repetições, cada uma com 5 aquênios.

2.3 Avaliações biométricas

Os dados numéricos de comprimento médio da raiz (CMR) e parte aérea (CMPA), massa fresca da raiz (MFR) e parte aérea (MFPA), relação de massa fresca da raiz pela parte aérea (RMF), massa seca da raiz (MSR) e parte aérea (MSPA), relação de massa seca da raiz pela parte aérea (RMS) e número de folhas (NF) foram

submetidos a análise de variância, testando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, com auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2011).

2.4 Sobrevivência do inóculo

Para verificar a sobrevivência dos inóculos foi utilizada a técnica de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) por meio do plaqueamento das bactérias totais do substrato. Um dia após o plantio (24 h) e ao final (45 dias) foram retirados 100 mg de amostra composta do substrato de cada tratamento, e realizada diluições seriadas até 10^{-6} e plaqueamento em meio ágar nutriente (3 g de extrato de carne, 5 g de peptona e 15 g de ágar). A inferência da sobrevivência dos inóculos foi realizada pela diferença de UFC encontrada entre no tratamento controle e dos tratamentos com inóculos bacterianos.

3 Resultados

A sobrevivência dos inóculos bacterianos foi afetada ao logo do tempo, iniciando a perda da viabilidade logo após 24 h da microbiolização. Entretanto, mesmo após 45 dias do plantio, ainda foi detectado crescimento diferencial de UFC totais entre os tratamentos com inóculo bacteriano e controle (Tabela 1).

Tabela 1 Sobrevivência dos inóculos bacterianos após 24h e 45 dias da microbiolização em aquênios de *Anacardium. othonianum* Rizzini.

Microbiolização	Sobrevivência do inóculo	
	24 h	45 dias
<i>Acinetobacter</i> sp. (Bac109)	52 x 10 ⁵ UFC	8 x 10 ³ UFC
<i>Pantoea agglomerans</i> (Bac131)	17 x 10 ⁵ UFC	13 x 10 ³ UFC
Bac109 + Bac131	17 x 10 ⁵ UFC	5x 10 ³ UFC
Controle	7 x 10 ² UFC	3 x 10 ² UFC

A presença dos inóculos bacterianos e os 4 acessos testados afetaram o crescimento inicial das plantas de *A. othonianum*, com padrões de crescimento diferenciais entre os tratamentos analisados, sendo que, CMR, CMPA, MFR, MFPA, RMF e MSR foram influenciados pela interação dos tratamentos: acessos e microbiolização. Já MSPA foi afetada pelo acesso e pela microbiolização

separadamente, RMS foi influenciada pela microbiolização isoladamente e NF foi afetado pela variação apenas do acesso.

Quando observado o comportamento do crescimento inicial de plantas de *A. othonianum*, a microbiolização não promove acréscimo no CMR em nenhum dos acessos testados (Tabela 2). O CMPA nos acessos 36, 82 e 95 não foi favorecido pelo tratamento de microbiolização, apenas no acesso 13 a combinação Bac109 + Bac131 estimulou o crescimento da parte aérea (Tabela 2).

Tabela 2 Comprimento médio da raiz (cm) e parte aérea (cm) de plântas de *Anacardium. othonianum* Rizzini provenientes de aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.

Microbiolização	Acessos			
	13	36	82	95
Comprimento médio da raiz (cm)				
<i>Acinetobacter</i> sp. (Bac109)	5,10 bA ^z	4,43 bA	4,78 abA	5,32 aA
<i>Pantoea agglomerans</i> (Bac131)	6,72 abA	5,53 abA	4,45 abA	5,87aA
Bac109 + Bac131	6,71 aA ^z	6,19 aA	3,97 bB	6,19 aA
Controle	6,66 aA	6,14 aAB	5,45 aAB	4,87 aB
Comprimento médio da parte aérea (cm)				
<i>Acinetobacter</i> sp. (Bac109)	8,09 cA	6,67 aA	7,82 aA	7,08 aA
<i>Pantoea agglomerans</i> (Bac131)	10,32 abA	7,43 aBC	6,50 abC	8,58 aAB
Bac109 + Bac131	10,37 aA ^z	5,96 aB	5,80 bB	8,74 aA
Controle	8,40 bcA	6,10 aB	6,96 abAB	8,54 aA

^zMédias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

A MFR nos acessos 13, 36 e 95 foi maior quando tratados com a co-inoculação Bac109 + Bac131, seguido do tratamento com *Pantoea agglomerans* (Bac131) e no acesso 82 não foi detectado influência dos tratamentos. Não houve efeito da inoculação da *Acinetobacter* sp. (Bac109) em nenhum dos acessos testados (Tabela 3). Maior acúmulo de MFPA foi observado no acesso 13 na presença de *Pantoea agglomerans* (Bac131), os acessos 36, 82 e 95 não tiveram influência da microbiolização (Tabela 3).

Tabela 3 Massa fresca da raiz e massa fresca da parte aérea de *Anacardium othonianum* Rizzini de plantas de *Anacardium othonianum* Rizzini provenientes de aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.

Microbiolização	Acessos			
	13	36	82	95
Massa fresca da raiz (g)				
<i>Acinetobacter</i> sp. (Bac109)	0,78 bcA ^z	0,38 bA	0,49 aA	0,41 bA
<i>Pantoea agglomerans</i> (Bac131)	0,96 bA	0,53 abB	0,54 aAB	0,59 abAB
Bac109 + Bac131	1,64 aA ^z	0,81 aB	0,79 aB	0,89 aB
Controle	0,47 cAB	0,31 bB	0,89 aA	0,38 bB
Massa fresca da parte aérea (g)				
<i>Acinetobacter</i> sp. (Bac109)	2,16 bA	1,11 aB	1,53 aAB	1,17 aA
<i>Pantoea agglomerans</i> (Bac131)	2,88 aA	1,58 aB	1,83 aB	1,38 aB
Bac109 + Bac131	1,66 bA	1,53 aA	1,60 aA	1,47 aA
Controle	1,75 bAB	1,12 aB	1,86 aA	1,43 aAB

^zMédias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Não foi acréscimo na RMF nos tratamentos de microbiolização nos acessos 36 e 82, já no acesso 13 houve estimulação pela inoculação da Bac109 + Bac131 e no acesso 95 os tratamentos com micro-organismos foram superiores ao controle (Tabela 4).

Tabela 4 Relação da massa fresca da raiz pela parte aérea de plantas de *Anacardium othonianum* Rizzini provenientes de aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.

Microbiolização	Acesso			
	13	36	82	95
Relação da massa fresca da raiz pela parte aérea				
<i>Acinetobacter</i> sp. (Bac109)	0,37 bA	0,33 aA	0,33 abA	0,39 abA
<i>Pantoea agglomerans</i> (Bac131)	0,34 bA	0,36 aA	0,25 bA	0,43 abA
Bac109 + Bac131	0,98 aA	0,53 aB	0,55 aB	0,58 aB
Controle	0,28 bA	0,28 aA	0,47 abA	0,27 bA

^zMédias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Nos acessos 13 e 95 a microbiolização promoveu maiores acúmulos de MSR na co-inoculação Bac109 + Bac131, enquanto que nos acessos 36 e 82 não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5 Massa seca da raiz de plantas de *Anacardium. othonianum* Rizzini provenientes de aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.

Microbiolização	Acesso			
	13	36	82	95
Massa seca da raiz (g)				
<i>Acinetobacter sp. (Bac109)</i>	0,20 abA	0,13 aA	0,11 aA	0,09 bA
<i>Pantoea agglomerans (Bac131)</i>	0,22 abA	0,13 aA	0,11 aA	0,11 bA
Bac109 + Bac131	0,26 aAB	0,22 aAB	0,17 aB	0,38 aA
Controle	0,07 bA	0,07 aA	0,19 aA	0,10 bA

^zMédias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

A MSPA foi influenciada pelo acesso e pela microbiolização separadamente, tendo maior acúmulo quando os aquênios foram microbiolizados com a combinação Bac109 + Bac131, o menor acúmulo foi observado no tratamento com *Acinetobacter sp.* (Bac109) e o controle, já o tratamento com *Pantoea agglomerans* (Bac131) foi igual aos demais. A MSPA foi superior no acesso 13 (Tabela 6).

Tabela 6 Massa seca da parte aérea de plantas de *Anacardium. othonianum* Rizzini provenientes de diferentes acessos, com aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.

Microbiolização	Massa seca da parte aérea (g)
<i>Acinetobacter sp. (Bac109)</i>	0,30 b ^z
<i>Pantoea agglomerans (Bac131)</i>	0,39 ab
Bac109 + Bac131	0,46 a
Controle	0,34 b

Acesso	Massa seca da parte aérea (g)
13	0,50 a
36	0,32 b
82	0,37 b ^z
95	0,30 b

^zMédias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

A RMS foi influenciada apenas pelos tratamentos de microbiolização isoladamente e obteve maior relação de massa seca quando os aquênios foram microbiolizados com a combinação Bac109 + Bac131, já o controle teve a menor relação e os tratamentos de microbiolização com bactérias isoladas foram iguais aos demais (Tabela 7).

Tabela 7 Relação massa seca da raiz pela parte aérea de plantas de *Anacardium. othonianum* Rizzini provenientes de aquênios microbiolizados com inóculos bacterianos endofíticos.

Microbiolização	Relação da massa seca da raiz pela parte aérea
<i>Acinetobacter</i> sp. (Bac109)	0,47 ab ^z
<i>Pantoea agglomerans</i> (Bac131)	0,40 ab
Bac109 + Bac131	0,68 a
Controle	0,33 b

^zMédias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

A característica NF teve resposta apenas para os acessos isolados e o acesso 82 resultou em maior número de folhas, já o acesso 36 teve o menor número e os acessos 95 e 13 foram iguais aos demais (Tabela 8).

Tabela 8 Número de folhas de plantas *Anacardium. othonianum* Rizzini provenientes de diferentes acessos.

Acesso	Número de folhas
82	5,6 a ^z
95	5,44 ab
13	5,36 ab
36	4,97 b

^zMédias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey 5%.

Este é o primeiro trabalho que evidencia bactérias endofíticas potencialmente promotoras de crescimento vegetal reinoculadas em *A. othonianum*, confirmando a atuação das linhagens *Acinetobacter* sp. (Bac109) e *Pantoea agglomerans* (Bac131), isoladas ou em combinação, no crescimento de seu hospedeiro.

4 Discussão

Tratamento de sementes com micro-organismos é amplamente utilizado na agricultura por disponibilizar para a planta uma população benéfica de micro-organismos (Philippot et al., 2013). Entretanto, diversos fatores podem interferir na eficiência da interação entre planta e micro-organismos e, conseqüentemente, nos efeitos benéficos que esta interação pode trazer.

As linhagens bacterianas inoculadas interagem com condições consideradas estressantes para os micro-organismos, como a oscilação constante da temperatura (Romero-Olivares et al., 2017), pH (Bárceñas-Moreno et al., 2016), nutrientes (Edwards et al., 2015) e umidade (Rein et al., 2016) além da competição com micro-organismos nativos (Bulgarelli et al., 2015), e estes fatores podem afetar a sobrevivência do inóculo. Entretanto, verificar a sobrevivência dos inóculos nos permite certificar o sucesso da interação e quais os resultados disto.

A permanência de uma população ativa do inoculante bacteriano no substrato, até o momento da emissão da radícula da plântula, é considerado um fator fundamental para se estabelecer com sucesso a interação planta x bactéria. De acordo com Edwards et al. (2015), a interação planta e micro-organismos inicia após 24 horas da semeadura e aproxima-se de um estado estacionário dentro de 2 semanas. No presente estudo, apesar da diminuição das UFC após 45 dias, a capacidade em re-colonizar os tecidos internos da planta hospedeira e desenvolver novamente a associação simbiótica benéfica é um fator que destaca os micro-organismos endofíticos na seleção de linhagens potenciais. Neste sentido, acredita-se que após a inoculação se restabeleceu a relação endofítica das linhagens testadas, como observado por Zhou et al., 2016, o qual testou *Bacillus cereus* AR156 com *Arabidopsis thaliana* e verificou a interação endofítica mesmo após 21 dias de tratamento das sementes.

Apesar de não terem sido realizados estudos para verificar a sobrevivência específica das linhagens bacterianas testadas, com base nos resultados alcançados de crescimento diferencial na presença dos inoculantes bacterianos, acredita-se que houve interação entre planta-micro-organismos testados.

Certamente as comunidades microbianas de um ambiente rizosférico se modificam ao longo do crescimento vegetal, em determinadas situações (estressantes ao hospedeiro), principalmente populações introduzidas, visto que inicialmente há um momento de adaptação ao novo ambiente e competição com populações locais, seguido de sinalizações para a interação com hospedeiro (Lareen et al., 2016).

Neste estudo, apesar de ser utilizado o método de microbiolização, acredita-se que a sinalização entre bactérias e planta tenha ocorrido somente na emissão da radícula, devido a liberação ao solo do “líquido da castanha de caju”, o qual já foi comprovado ser tóxico para micror-organismos (Monteiro et al., 2017). Após germinação da plântula, observa-se o deslocamento de recursos baseados em reservas para nutrição, o que requer modificações intensas do metabolismo. Neste momento, o direcionamento de recursos para vias metabólicas específicas pode atrasar os custos associados à maturação da imunidade, ou outras vias de defesa da plântula (Lareen et al., 2016; Zhao et al., 2016.) Neste cenário, a presença de bactérias benéficas podem auxiliar no equilíbrio metabólico e na manutenção de diferentes traços funcionais para maior eficiência de crescimento vegetal.

A microbiolização por estirpes potenciais promotoras de crescimento vegetal vem sendo testada em várias espécies vegetais, como canola (*Brassica napus*) (Padda, et al., 2016), pinheiro (*Pinus contorta*) (Tang et al., 2017), tomate (*Lycopersicon esculentum*) (Patel et al., 2017) e trigo (*Triticum sativu*) (Zhao et al., 2015) e confirmam que a simbiose com bactérias resulta em melhores e mais saudáveis mudas.

Neste estudo, a interação estabelecida após a germinação, permitiu que as plantas de *A. othonianum* tivessem incremento nos parâmetros iniciais de crescimento de *A. othonianum*: CPA, MFR, MFPA, RMF, MSR, MSPA e RMS. Esse incremento pode ser resultado do uso da inoculação combinada de mais de uma linhagem bacteriana que pode atuar em rotas múltiplas e conseqüentemente em várias características de promoção de crescimento vegetal, como o aumento do número de pelos radiculares, capacidade de absorção de nutrientes, (Khan et al., 2016), a disponibilização de nutrientes (Berg et al., 2014) e antagonismos a patógenos (Brader et al., 2014) visto que as linhagens testadas tem este traços funcionais *in vitro*.

As estirpes testadas neste trabalho são reconhecidas na literatura como agentes de promoção de crescimento vegetal, *Pantoea agglomerans* possuem efeito benéfico quando associado a plantas, estudos como de Feng et al, (2006) demonstra que a microbiolização de sementes de arroz (*Oriza sativa* L.) com a linhagem *P. agglomerans* YS19 teve efeito benéfico no crescimento do hospedeiro atuando na alocação dos fotoassimilados. Amellal et al. (1998) apontam que *P. agglomerans* NAS206 pode desempenhar um papel importante na regulação do teor de água (excesso ou déficit) da rizósfera do trigo, melhorando a agregação do solo (Amellal et al., 1998).

Já estirpes do gênero *Acinetobacter* tem grande atuação na degradação de compostos xenobiontes (Ahmad et al., 2017), entretanto alguns estudos associam este gênero bacteriano a atividade de promoção de crescimento vegetal. Kang et al. (2009) demonstra que *Acinetobacter calcoaceticus* SE370 promoveu o crescimento em pepino, repolho chinês e margarida da coroa.

Um importante aspecto testado no presente experimento foi a diferença do material biológico vegetal, representativo da diversidade de fenótipos encontrados de caju-do-cerrado. Os 4 acessos de *A. othonianum* pesquisados tiveram perfil de crescimento inicial distintos entre si, visto que fazem parte de uma população nativa heterogênia, isto corrobora com estudos de variabilidade genética no gênero *Anacardium*: entre clones comerciais de *A. occidentale* (Silva et al., 2012; Silva et al., 2014) e em *Anacardium humile* (Carvalho et al., 2012). Estes resultados são relevantes pois trazem informações iniciais a cerca da diferença de eficiência de interação entre plantas da mesma espécie, porém que apresentam diversidade genética.

De acordo com Szilagyizecchin et al. (2015), o genótipo do hospedeiro pode influenciar o estabelecimento da interação entre planta x micro-organismos, principalmente pela secreção diferencial de exsudados radiculares particulares de cada genótipo, assim, a qualidade e a composição desses exsudados radiculares pode determinar a preferência das bactérias por determinadas plantas (Soussi et al., 2016; Zhou et al., 2016).

O presente estudo aponta para a necessidade de mais investigações para compreensão dos mecanismos e moléculas sinalizadoras envolvidas na interação, com vistas a compreender fatores envolvidos na interação, e conseqüentemente, no sucesso da promoção de crescimento vegetal por bactérias. A identificação de micro-organismos promotores de crescimento vegetal e a compreensão do papel destes micro-organismos benéficos na melhoria da qualidade da planta permitem aplicações práticas para uma agricultura mais sustentável (Zhao et al., 2016).

5 Conclusão

A metodologia de microbiolização de aquênios permitiu avaliar a potencialidade de bactérias para promoção de crescimento em *A. othonianum*. A co-inoculação de bactérias endofíticas *Acinetobacter* sp. (Bac109) e *Pantoea agglomerans* (Bac131), promoveu incremento no crescimento inicial vegetal, a partir de resultados biométricos realizados até 45 dias após a germinação.

O estudo corroborou com estudos anteriores que mostram que o genótipo pode interferir na eficiência da interação entre planta-inoculante bacteriano.

6 Referências

- Abbamondi, G. R., Tommonaro, G., Weyens, N., Thijs, S., Sillen, W., Gkorezis, P., Odice, C., Rangel, W. M., Nicolaus, B., & Vangronsveld, J. (2016). Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3(1), 1-10.
- Afzal, I. M. R. A. N., Shinwari, Z. K., & Iqar, I. (2015). Selective isolation and characterization of agriculturally beneficial endophytic bacteria from wild hemp using canola. *Pakistan Journal of Bototany*, 47(5), 1999-2008.
- Ahmad, S. A., Shamaan, N. A., Syed, M. A., Dahalan, F. A., Khalil, K. A., Ab Rahman, N. A., & Shukor, M. Y. (2017). Phenol degradation by *Acinetobacter* sp. in the presence of heavy metals. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 45(3), 247-253.
- Almeida, L. H. F., Cordeiro, S. A., Pereira, R. S., Couto, L. C., & Lacerda, K. D. S. (2017). Viabilidade econômica da produção de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Nativa: Pesquisas Agrárias e Ambientais*, 5(1), 9-15.
- Alves, M. S. O., Alves, A. M., & Naves, M. M. V. (2013). Compostos bioativos e atividade antioxidante de pseudofrutos de caju arbóreo do Cerrado. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 72(4), 327-331.
- Alves, A. M., Fernandes, D. C., Borges, J. F., Sousa, A. G. D. O., & NaveS, M. M. V. (2016). Oilseeds native to the Cerrado have fatty acid profile beneficial for cardiovascular health. *Revista de Nutrição*, 29(6), 859-866.
- Amellal, N., Burtin, G., Bartoli, F., & Heulin, T. (1998). Colonization of Wheat Roots by an Exopolysaccharide-Producing *Pantoea agglomerans* Strain and Its Effect on Rhizosphere Soil Aggregation. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 3740-3747.
- Andrade, L. F., de Souza, G. L. O. D., Nietsche, S., Xavier, A. A., Costa, M. R., Cardoso, A. M. S., & Pereira, D. F. G. S. 2014. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. *Journal of Microbiology*, 52(1), 27-34.

- Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, 378(1-2), 1-33.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(1), 11-18.
- Bessa, N. G. F., Borges, J. C. M., Beserra, F. P., Carvalho, R. H. A., & Pereira, M. A. B. (2013). Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento Vale Verde–Tocantins. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(4), 692-707.
- Bárcenas-Moreno, G., Bååth, E., & Rousk, J. (2016). Functional implications of the pH-trait distribution of the microbial community in a re-inoculation experiment across a pH gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 93, 69-78.
- Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., ... & Schulze-Lefert, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host & Microbe*, 17(3), 392-403.
- Carvalho, R. S., PINTO, J. F. N., Reis, E. F., SANTOS, S. C., & Dias, L. A. S. (2012). Variabilidade genética de cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile* St. Hill) por meio de marcadores RAPD. *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, 34(1), 1-7.
- Curado, F. A. M. L. I. M. J., Gazolla, A. P., Pedroso, R. C. N., Pimenta, L. I. P., de Oliveira, P. F., Tavares, D. C., Silva, M. L. A., Cunha, W. R., Pietro, R. C. L. R., Januário, A. H., Pauletti, P. I. M. J. Sales, J. F. & Silva, F. G. (2016). Antifungal and cytotoxicity activities of *Anacardium othonianum* extract. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(29), 450-456.
- Dantas, T., Oliveira, N. F., & Leal, R. S. (2015). The importance of the cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) coat: a review. *American International Journal of Contemporary Scientific Research*, 2(8), 09-41.
- Dendena, B., & Corsi, S. (2014). Cashew, from seed to market: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(4), 753-772.
- Dourado, M. N., Martins, P. F., Quecine, M. C., Piotto, F. A., Souza, L. A., Franco, M. R., Tezotto, t. & Azevedo, R. A. (2013). *Burkholderia* sp. SCMS54 reduces

- cadmium toxicity and promotes growth in tomato. *Annals of Applied Biology*, 163(3), 494-507.
- Farrar, K., Bryant, D., & Cope-Selby, N. (2014). Understanding and engineering beneficial plant–microbe interactions: plant growth promotion in energy crops. *Plant biotechnology journal*, 12(9), 1193-1206.
- Feng, Y., Shen, D., & Song, W. (2006). Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 938-945.
- Ferreira, D. F. (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e agrotecnologia*, 35(6), 1039-1042.
- Fonseca, C. M., Boari, C. A., Domingues, P. H. D., Meira, D. P., Fernandes, L. S. F., & Dumont, M. A (2014). Iogurte produzido com cajuí (*Anacardium othonianum* Rizz). *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4).
- Garcia, A. F. Análise Filogenética no Gênero *Anacardium*. 2009. 72f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, SP.
- Gaiero, J. R., McCall, C. A., Thompson, K. A., Day, N. J., Best, A. S., & Dunfield, K. E. (2013). Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. *American Journal of Botany*, 100(9), 1738-1750.
- Gomoung, D., Mbailao, M., Toukam, S. T., & Ngakou, A. (2017). Influence of Cross-Inoculation on Groundnut and Bambara Groundnut-Rhizobium Symbiosis: Contribution to Plant Growth and Yield in the Field at Sarh (Chad) and Ngaoundere (Cameroon). *American Journal of Plant Sciences*, 8(08), 1953.
- Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., ... & Schulze-Lefert, P. (2015). Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host & Microbe*, 17(5), 603-616.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., Doring, M & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320.
- Hassan, S. E. D. (2017). Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. *Journal of Advanced Research*, 6(8), 1 -9.

- Kang, S. M., Joo, G. J., Hamayun, M., Na, C. I., Shin, D. H., Kim, H. Y., ... & Lee, I. J. (2009). Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology letters*, 31(2), 277-281.
- Knoth, J. L., Kim, S. H., Ettl, G. J., & Doty, S. L. (2013). Effects of cross host species inoculation of nitrogen-fixing endophytes on growth and leaf physiology of maize. *Gcb Bioenergy*, 5(4), 408-418.
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hüchelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite—what decides? *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 358-363.
- Lareen, A., Burton, F., & Schäfer, P. (2016). Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. *Plant molecular biology*, 90(6), 575-587.
- Luz, C.L.S.; Pirani, J.R. Anacardiaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB77853>>. Acesso em: 06 Set. 2017.
- Massalha, H., Korenblum, E., Malitsky, S., Shapiro, O. H., & Aharoni, A. (2017). Live imaging of root–bacteria interactions in a microfluidics setup. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(17), 4549-4554.
- Mitchell, J. D., & Mori, S. A. (1987). The cashew and its relatives (*Anacardium: Anacardiaceae*). El marañón y sus parientes (*Anacardium: Anacardiaceae*). *Memoirs of the New York Botanical Garden*, 42, 1-76.
- Monteiro, A. S., Rodrigues, R. C. E., Silva, G. F. D., & Albuquerque, P. M. (2017). Estudo da atividade antimicrobiana da casca da castanha de caju (*Anacardium occidentale*). *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 3(4), 0705-0710.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Padda, K. P., Puri, A., & Chanway, C. P. (2016). Plant growth promotion and nitrogen fixation in canola (*Brassica napus*) by an endophytic strain of *Paenibacillus polymyxa* and its GFP-tagged derivative in a long-term study. *Botany*, 94(12), 1209-1217.
- Patel, K. S., Naik, J. H., Chaudhari, S., & Amaresan, N. (2017). Characterization of culturable bacteria isolated from hot springs for plant growth promoting traits and effect on tomato (*Lycopersicon esculentum*) seedling. *Comptes Rendus Biologies*, 340(4), 244-249.

- Philippot, L., Raaijmakers, J.M., Lemanceau, P. and Van Der Putten, W.H., 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 789-799.
- Piccoli, P., Travaglia, C., Cohen, A., Sosa, L., Cornejo, P., Masuelli, R., & Bottini, R. (2011). An endophytic bacterium isolated from roots of the halophyte *Prosopis strombulifera* produces ABA, IAA, gibberellins A1 and A3 and jasmonic acid in chemically-defined culture medium. *Plant Growth Regulation*, 64(2), 207-210
- Rein, I., Gessler, A., Premke, K., Keitel, C., Ulrich, A., & Kayler, Z. E. (2016). Forest understory plant and soil microbial response to an experimentally induced drought and heat - pulse event: the importance of maintaining the continuum. *Global Change Biology*, 22(8), 2861-2874.
- Romero-Olivares, A. L., Allison, S. D., & Treseder, K. K. (2017). Soil microbes and their response to experimental warming over time: A meta-analysis of field studies. *Soil Biology and Biochemistry*, 107, 32-40.
- Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183(1), 92-99.
- Silva, A. V. C., dos Santos, A. R. F., Muniz, E. N., & Léo, A. S. (2012). Diversidade genética entre cajueiros comerciais. *Scientia Plena*, 8(6).
- Silva, A. V. C., MUNIZ, E. N., Ledo, A. S., Rabbani, A. R. C., Amorim, J. A. E., & Vitória, M. F. (2014). Diversidade genética em germoplasma de *Anacardium occidentale*. *Scientia Plena*, 10(11), 1-8.
- Silva, M. R., Lacerda, D. B. C. L., Santos, G. G., & de Oliveira Martins, D. M. (2008). Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Ciência Rural*, 38(6), 1790-1793
- Soussi, A., Ferjani, R., Marasco, R., Guesmi, A., Cherif, H., Rolli, E. & Cherif, A. (2016). Plant-associated microbiomes in arid lands: diversity, ecology and biotechnological potential. *Plant and Soil*, 405 (1-2), 357-370.
- Souza, P. L. C., & Silva, M. R. (2015). Quality of granola prepared with dried caju-do-cerrado (*Anacardium othonianum* Rizz) and baru almonds (*Dipteryx alata* Vog). *Journal of Food Science and Technology*, 52(3), 1712-1717.
- Szilagyi-zecchin, V. J.; Klosowki, A. C.; Ikeda, A. C.; Hungria, M.; Galli-terasawa, L. V.; Kava-cordeiro, V.; Glienke, C.; Morgor, A. F. (2015) Potential inoculant strains of Brazilian endophytic bacteria for maize (*Zea mays* L.) growth

- promotion. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, 7 (1), 128-134.
- Tang, Q., Puri, A., Padda, K. P., & Chanway, C. P. (2017). Biological nitrogen fixation and plant growth promotion of lodgepole pine by an endophytic diazotroph *Paenibacillus polymyxa* and its GFP-tagged derivative. *Botany*, 95(6), 611-619.
- Vieira, R. F., Agostini-Costa, T., Silva, D. D., Sano, S. M., & Ferreira, F. R. (2006). Frutas nativas da região Centro-Oeste do Brasil. *Embrapa Informação Tecnológica: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*
- Zhao, L., Xu, Y., Lai, X. H., Shan, C., Deng, Z., & Ji, Y. (2015). Screening and characterization of endophytic Bacillus and Paenibacillus strains from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 977-989.
- Zhao, S., Zhou, N., Zhao, Z. Y., Zhang, K., Wu, G. H., & Tian, C. Y. (2016). Isolation of Endophytic Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with the Halophyte *Salicornia europaea* and Evaluation of their Promoting Activity Under Salt Stress. *Current Microbiology*, 73(4), 574-581.
- Zhou, D., Huang, X. F., Chaparro, J. M., Badri, D. V., Manter, D. K., Vivanco, J. M., & Guo, J. (2016). Root and bacterial secretions regulate the interaction between plants and PGPR leading to distinct plant growth promotion effects. *Plant and Soil*, 401(1-2), 259-272.

5. CONCLUSÃO GERAL

As bactérias endofíticas cultiváveis de *A. othonianum* têm traços funcionais importantes que direcionam para promoção de crescimento de plantas, dentre as quais se destacaram as linhagens *Acinetobacter* sp. Bac109, *Bacillus* e *Pantoea agglomerans* Bac131 com multifatores de interesse para desenvolvimento de produtos biotecnológicos agrícolas.