



Estímulo da atividade das H⁺-ATPases por *Enterobacter* sp. em mudas de *Calophyllum brasiliense* Cambess (guanandi)

Bruno Rogério de Souza^{a*}, Jéssica de Sá Guimarães Peixoto^a, Shirley de Andrade Sousa Marinho^b, Samira Costa Braga^a, Romário Victor Pacheco Antero^a

^a Universidade de Brasília (UNB), Brasil

^b Faculdade Anhanguera de Brasília, Brasil

* Autor correspondente (brsvzp@hotmail.com)

INFO

Keywords

inoculants
agroforestry
guanandi
vegetable biostimulant

Palavras-chaves

inoculantes
agroflorestal
guanandi
bioestimulante vegetal

ABSTRACT

Stimulation of H⁺-ATPase activity by Enterobacter sp. in Calophyllum brasiliense Cambess (guanandi) seedlings

Plant biostimulants using microorganisms tend to increase nutritional efficiency, abiotic stress tolerance and are indicated as commercial inputs for production in agroforestry systems. Many forest species are nutritionally demanding and soils may not have sufficient nutrients to meet various plant metabolic demands. *Calophyllum brasiliense* Cambess (guanandi) is a tree species occurring in the Cerrado of interest for the development of forest systems. The production of seedlings of this species depends on the use of inputs such as microbial inoculated (IM). IM using bacteria of the genus *Enterobacter* have been studied as potential agents of plant development, as they are of the low cost of production, but are still little explored for tree seedlings production. The objective of this work was to verify if the use of isolated bacteria alters the development profile of guanandi seedlings during the nursery phase, as well as if there is stimulation of the production of H⁺-ATPases enzymes. For this, bacteria of the genus *Enterobacter* were previously isolated, and the seedlings underwent two applications of 50 mL of IM during 150 days of development in a forest nursery. After this period, these seedlings were submitted to enzymatic action evaluation by H⁺ proton extrusion through the acidification of the medium, and the biometric variables were measured. The results showed that the acidity provided by exposure of guanandi seedlings to the IM was 2.92% higher than the control and there was no difference for the biometric variables evaluated, but the IM treatment presented better yield for all variables, being the number of lateral roots, main root length, dry mass of the area and roots 16.35, 12.2, 7.35 and 11.12% greater than the control, respectively. Therefore, the existence of synergy between beneficial guanandi-associated bacteria can be exploited as microbial inoculants in agriculture.

RESUMO

Os bioestimulantes vegetais utilizando microrganismos tendem a aumentar a eficiência nutricional, tolerância ao estresse abiótico e são indicados como insumos comerciais para produção em sistemas agroflorestais. Muitas espécies florestais são exigentes quanto aos aspectos nutricionais e os solos podem não apresentar nutrientes suficientes para suprir diversas demandas metabólicas das plantas. O *Calophyllum brasiliense* Cambess (guanandi) é uma espécie arbórea com ocorrência no Cerrado de interesse para o desenvolvimento de sistemas florestais, a produção de mudas desta espécie depende do uso de insumos como por exemplo os inoculados microbianos (IM). Os IM usando bactérias do gênero *Enterobacter* têm sido estudados como potenciais agentes de desenvolvimento vegetal, por serem de baixo custo de produção, mas ainda são pouco explorados para a produção de mudas de espécies arbóreas. O trabalho objetivou verificar se o uso das bactérias isoladas altera o perfil de desenvolvimento das mudas de guanandi durante a fase de viveiro, bem como se ocorre estímulo da produção de enzimas H⁺-ATPases. Para isto as bactérias do gênero *Enterobacter* foram isoladas previamente, e as mudas sofreram duas aplicações de 50 mL de IM durante 150 dias de desenvolvimento em viveiro florestal. Após este período essas mudas foram submetidas a avaliação de ação enzimática por extrusão de prótons H⁺ por meio da acidificação do meio, sendo aferidas as variáveis biométricas. Os resultados mostraram que a acidez proporcionada pela exposição das mudas de guanandi ao IM foi de 2,92% maior que o controle e não houve diferença para as variáveis biométricas avaliadas, porém o tratamento IM apresentou melhor rendimento para todas as variáveis, sendo o número de raízes laterais, comprimento da raiz principal, massa seca da parte área e raízes 16,35; 12,2; 7,35 e 11,12% maiores que o controle, respectivamente. Portanto, a existência da sinergia entre bactérias benéficas associadas ao guanandi, podem ser exploradas como inoculantes microbianos na agricultura.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos possuem um papel fundamental nos ecossistemas, desempenhando funções críticas nas transformações bioquímicas de elementos nos diferentes compartimentos ambientais (Kumar et al., 2015). Quando atuam de maneira sinérgica com as plantas podem favorecer o seu crescimento, sendo então, denominados microrganismos promotores do crescimento vegetal (MPCV).

Exemplos de MPCV como fungos e bactérias incluem aqueles que possuem habilidade em aumentar a oferta de nutrientes provenientes de fontes pouco solúveis no solo. A interação do fósforo com outros constituintes do solo como o cálcio, o alumínio e o ferro diminuem a sua solubilidade e difusão, tornando-o menos disponíveis às plantas (Marra, 2012). Algumas espécies de fungos e bactérias são capazes de solubilizar compostos fosfatados, o que permite aumentar a oferta desses nutrientes em solos com baixa oferta natural de fósforo (Chagas et al., 2010). Diferentes grupos de bactérias solubilizadoras de fosfato têm sido identificadas, incluindo gêneros *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* e *Erwinia*. Esta habilidade decorre da capacidade desses microrganismos exsudar ácidos orgânicos, inorgânicos e prótons, estes últimos especialmente em decorrência da assimilação de NH_4^+ (Lozada, 2015).

Os ácidos orgânicos atuam como agentes complexantes capazes também de aumentar a mobilidade de metais pouco móveis e solúveis na solução, ampliando a sua oferta para as plantas. Outra contribuição importante dos MPVC para a nutrição radicular é a estimulação de enzimas como as H^+ -ATPases da membrana plasmática, que convertem a energia livre liberada pela hidrólise do ATP em um potencial eletroquímico trans-membranar usado para a importação de nitrato e outros nutrientes (Du Jardin, 2015). Além da captação de nutrientes, o bombeamento de prótons pelas ATPases da membrana plasmática também contribui para o afrouxamento da parede celular e o aumento celular levando a maiores rendimentos por parte da planta (Zandonadi et al., 2010, 2016; Tavares et al., 2017).

Várias estratégias, incluindo métodos de engenharia tradicional e genética, têm sido utilizados para aumentar a resistência das culturas ao estresse abiótico e biótico, o uso de microrganismos para melhorar o crescimento das plantas e a tolerância ao estresse, é uma das estratégias mais promissoras (Shahzad et al., 2017). Os fitohormônios, como as auxinas clássicas, as citocininas, o etileno e as giberelinas, e os mais recentes, incluindo os brassinosteróides, jasmonatos e as strigolactonas podem

revelar-se importantes metas de engenharia metabólica para a produção de plantas abióticas resistentes ao stress (Wani et al., 2016). A identificação dos mecanismos desenvolvidos pelas plantas para neutralizar os estresses abióticos e manter seu crescimento e sobrevivência sob condições adversas, tem relação direta com as associações entre o meio e os microrganismos como, por exemplo, as bactérias do gênero *Enterobacter* (Wani et al., 2016).

Os estudos e inovações de técnicas que otimizem a produção de espécies florestais nativas como o *Calophyllum brasiliense* Cambess (*C. brasiliense*), mais conhecido como guanandi, podem auferir ganhos econômicos e ambientais significativos, de acordo com todos esses parâmetros analisados. A habilidade vigorosa de crescimento em áreas degradadas faz da espécie um potencial elemento chave para a recuperação de áreas antropizadas. Além disso, é uma espécie arbórea de grande plasticidade ecológica, presente em diferentes fitofisionomias (Marcos et al., 2007) e apresenta elevada capacidade de produção de biomassa (Lorenzi, 1998). Devido à sua preferência em colonizar solos com alta saturação hídrica, seu uso para a recuperação de matas ciliares também se mostra adequado. A espécie também apresenta flores o que promove a atração de abelhas, fomentando a possibilidade de exploração da meliponicultura e favorecendo a polinização de outras espécies vegetais. Os frutos do *C. brasiliense* podem também servir como alimento para a fauna nativa, tornando as agroflorestas abrigo de espécies animais selvagens (Lorenzi, 1998).

Ferretti e Britez (2006) observaram que o processo de restauração florestal envolve diversas etapas como: estudos do solo, levantamento de plantas nativas da região, planejamento de restauração por meio de um sistema de informação geográfica, produção de mudas, aplicação de diferentes técnicas de plantio (como plantio manual ou mecanizado com mudas e estacas) e monitoramento de biomassa e biodiversidade. No entanto, algumas espécies nativas são consideradas adequadas para o plantio direto, proporcionando uma maior variedade de produtos, conforme já observado na silvicultura nacional (Lorenzi, 1998; Ferretti e Britez, 2006). Estimular o reflorestamento de *C. brasiliense*, especialmente entre pequenos e médios agricultores com recursos financeiros limitados, é uma alternativa que se torna viável, perante as demandas atuais do mercado financeiro.

As bactérias que promovem o crescimento das plantas melhoram a absorção de nutrientes, o rendimento das culturas, reduzem o custo de fertilização e minimizam a poluição ambiental ao diminuir a lixiviação de formas de nitrogênio (Baldotto et al., 2010). Além de solubilizar fosfatos e óxido de

zinco, bactérias como *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Agrobacterium* sp., *Azotobacter* spp. e *Erwinia* sp. podem incentivar o crescimento de plantas em função da sua habilidade de fixação de N₂ atmosférico, sendo classificadas como diazotróficas (Hallmann et al., 1997; Gupta et al., 2013). Atuando de forma direta, essas bactérias podem alterar o metabolismo das plantas, afetando sua fisiologia e o seu crescimento (Silveira et al., 2016).

São considerados bioestimulantes vegetais, qualquer substância ou microrganismo aplicado a plantas com o objetivo de aumentar a eficiência nutricional, tolerância ao estresse abiótico e / ou traços de qualidade da cultura, independentemente do seu conteúdo de nutrientes; por extensão, os bioestimulantes das plantas também designam produtos comerciais contendo misturas de tais substâncias e / ou microrganismos (Du Jardin, 2015). Nesse trabalho, avaliou-se as alterações do perfil de desenvolvimento de mudas da espécie *C. brasiliense* durante a fase de viveiro, ao adicionar à cultura o bioinsumo obtido a partir do cultivo de bactérias do gênero *Enterobacter* sp. isoladas de plantas e solos já povoados com a *C. brasiliense* a mesma espécie florestal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Produção e padronização das mudas

Sementes de guanandi foram obtidas de viveiro comercial, sanitizadas com hipoclorito de sódio a 10%, enxaguadas abundantemente com água destilada e então acondicionadas em canteiros preenchidos com areia, sob incidência solar direta, para germinação. Após um período aproximado de 60 dias, plântulas, contendo de 4 a 6 pares de folhas e padronizadas por tamanho (Figura 1), foram transplantadas e utilizadas para testes posteriores com inoculação de bactérias potencialmente promotoras do crescimento vegetal.



A



B

Figura 01 - (A) Produção das mudas de *C. brasiliense*. (B) Transplante e padronização das mudas.

As mudas transplantadas permaneceram em viveiro, expostas diretamente ao sol, por um período de 150 dias, sendo regadas diariamente.

Obtenção e adição de bactérias às mudas de Guanandi

As bactérias com potencial para emprego como MPCV foram previamente isoladas e identificadas por Souza et al. (2019). Para os testes com as mudas de guanandi, foi selecionado isolados pertencentes ao gênero *Enterobacter* devido à sua habilidade de solubilização de fosfato de cálcio e óxido de zinco, capacidade de fixação biológica de nitrogênio atmosférico e de produção de ácido indol-acético.

As bactérias selecionadas foram crescidas em meio LB (Luria Bertani), seguindo a proporção (g L⁻¹): Triptona (10); Extrato de Levedura (5); Cloreto de Sódio (5) e pH final de 7,0 (±0,2). O IM foi padronizado com a concentração de bactérias em 10⁸ UFC.mL, e o ajuste dessa concentração foi realizado por meio da leitura da densidade óptica cuja densidade ficou entre 600 a 640 nm, de acordo com a curva de crescimento da solução contendo as bactérias e o meio de cultura. Foi utilizado o volume de 50 mL das soluções de IM para as aplicações da solução meio/bactérias (contendo as bactérias e o meio de cultura). Uma segunda aplicação das soluções contendo as bactérias foi realizada 60 dias após a primeira aplicação.

Medida de acidez em solução possivelmente associada à atividade das bactérias sobre as H⁺-ATPases

Para as análises da acidificação rizosférica, utilizou-se a metodologia descrita por Aguiar et al. (2013), com adaptações. A estimativa da atividade da H⁺-ATPase foi realizada pela medição de acidez

de soluções de cultivo contendo mudas de *C. brasiliense* inoculadas ou não com bactérias. Três mudas de cada tratamento foram transferidas para um recipiente contendo 400 mL de solução de CaCl_2 2 mol L^{-1} com pH 7,0 em triplicata. A medida da acidez (pH) da solução de CaCl_2 foi realizada com um pHmetro (Hanna Instruments, HI 221, Chile). A determinação do pH da solução foi realizada a cada 10 minutos, até o final do período de 140 minutos. As raízes foram então secas em estufa de circulação fechada (Ethik Technology, ASP – 420/TD), e a quantidade de H^+ foi expressa em extrusão de H^+ por grama de massa seca de raízes, podendo-se associar, portanto, ao gradiente de prótons gerado pela atividade da H^+ -ATPase.

Avaliações biométricas das mudas

As mudas foram coletadas e avaliadas as seguintes características: número de raízes (NR), número de raízes laterais (NRL), (comprimento da parte aérea (CPA), com régua graduada, considerando-se da base do vaso (substrato) até a última ramificação foliar; comprimento raiz principal (CRP) da base do vaso (substrato) até o final da raiz principal; diâmetro do caule (DC) e diâmetro da raiz principal (DRP), com paquímetro digital; índice de área foliar (IAF), a partir da obtenção de imagens fotográficas e processamento no programa digital imageJ®; massa fresca aérea (MFA), massa fresca raiz (MFR), massa seca raiz (MSR) e massa seca parte aérea (MAS) em balança analítica, sendo MSR e MAS obtidos após um período de 72h em estufa a 65°C (TE-394/4, Tecnal, São Paulo, Brasil). A densidade de raízes laterais foi também obtida a partir da relação entre NRL e CRP.

Análise estatística

A avaliação biométrica foi realizada empregando-se 20 repetições, seguindo um DIC. Após atestada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, realizou-se o teste F e, quando significativo, empregou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias. Para a medição de acidez em meio mínimo, foi feita a média de três mudas por tratamento e, quando significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados não apresentaram uma correlação significativa com a atividade da fração das raízes tratadas no tempo 150 dias (Figura 2). O aumento da acidez do meio pode ser principalmente associado a dois fatores principais: i) produção de CO_2

pela respiração radicular, ou seja, durante a respiração há a produção de CO_2 que ao se dissolver no meio causa redução do pH, e ii) aumento da extrusão de H^+ , possivelmente associado à atividade dos AH sobre as H^+ -ATPases (Aguiar et al., 2013).

A acidez proporcionada pela exposição das plântulas *C. brasiliense* aos microrganismos foi de 2,92% maior que o controle, não sendo exclusivamente devido ao estímulo nas bombas de H^+ Siqueira et al. (2008). Esse resultado sugere que o método simplificado pode ser usado no estudo de exsudatos fisiologicamente ativos.

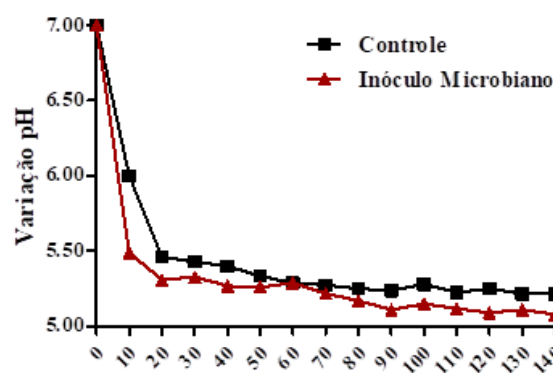


Figura 2- Medida de pH da solução contendo mudas de *C. brasiliense* demonstram extrusão de prótons H^+ pelas raízes.

Os resultados obtidos (Figura 2 e 3) apontam as auxinas como principal contribuinte na transcrição de genes codificando ATPases, promoção do crescimento celular e a ativação dessas proteínas (Zandonadi et al., 2018). O ambiente propício para obter eficácia destes bioestimulantes, aquisição de nutrientes e crescimento das raízes está fortemente relacionado com o grau de acidificação radicular (Zandonadi et al., 2016). A extrusão de prótons relaciona-se ao mecanismo de promoção do crescimento celular é mediado pelas H^+ -ATPases em um processo conhecido como “a teoria do crescimento ácido” (Aguiar et al., 2013).

Para Rayle e Cleland (1992); Aguiar et al. (2009) a indução da expressão das enzimas representa o sistema primário de transporte de H^+ do interior da célula para o apoplasto e, para a formação do gradiente de H^+ , gerado através da membrana plasmática. Zandonadi et al. (2018), contribui com esses resultados ao afirmar que a presença de moléculas orgânicas pode ser um diferencial importante dos biofertilizantes em relação aos fertilizantes minerais, sendo que todos os biofertilizantes apresentaram em sua composição o ácido 3-indolil acético (AIA), um hormônio vegetal da classe das auxinas, extremamente importante para o desenvolvimento.

Para Aguiar et al. (2013) tal processo proporciona as condições fisiológicas ótimas para o funcionamento de enzimas do tipo hidrolases e fenol-oxidasas, enzimas com habilidade de romper ligações da parede celular, onde a expansão celular é favorecida pela ação de algumas enzimas específicas como, por exemplo, as expansinas, que em pH menor ou igual a 4,5, promovendo o aumento da plasticidade da parede celular pela liberação momentânea de pequenos segmentos da matriz de glucanos ligados às microfibrilas de celulose (Rayle e Cleland, 1992; Aguiar et al., 2009; Aguiar et al., 2013).

Nardi et al. (1996), em seus trabalhos comprovaram que os efeitos positivos das alterações no pH pela ação dos microrganismos no crescimento das plantas de centeio, têm um efeito maior sobre o desenvolvimento radicular do que no desenvolvimento de folhas e caules, estabelecendo assim o efeito positivo, isto é, contato físico superficial, ou efeito direto, onde quer que as substâncias e enzimas fossem absorvidas e translocadas nas plantas. Em complemento a essas observações Canellas et al. (2005) e Aguiar et al. (2013) afirmam que o relaxamento da parede celular e o aumento do turgor culminam com o alongamento celular, assim esses dados encontrados aqui para o tratamento com bactérias do gênero *Enterobacter* inoculadas confirmam pelo menos em parte, que a medida da acidez da solução contendo plantas tratadas com IM está relacionada com a atividade da H⁺-ATPase (aumento da extrusão de H⁺) de membrana plasmática.

Façanha (2002) confirmou a bioatividade, avaliada pela ação de substâncias sobre o transporte de prótons através da membrana plasmática de células. Esse autor confirma ainda que ocorreu estímulo da área superficial radicular, ou seja, estimularam a H⁺-ATPase de membrana plasmática em plântulas de café e milho, revelando que a interação planta-IM promoveu uma redistribuição das massas moleculares dessas substâncias, sugerindo uma dinâmica de mobilização de subunidades funcionais por exsudatos das raízes.

Baldotto e Baldotto, (2014) associam que estes incrementos são ocasionados pelo aumento da atividade de H⁺-ATPases radiculares, acompanhado em mudanças na distribuição de nitrato entre raiz e parte aérea. Os autores observaram que o aumento da concentração de nitrato na parte aérea está relacionado com o aumento da concentração dos fitoreguladores citocininas e poliaminas (principalmente putrecina), levando aos incrementos no crescimento.

Os resultados observados na figura 2 confirmam a hipótese de que o efeito de estimulação sobre o crescimento vegetal é benéfico para o desenvolvimento da espécie aumentando o seu rendimento durante os 150 dias de avaliação. Esses resultados

apontam para uma estimulação da atividade e promoção da síntese das enzimas H⁺-ATPases da membrana plasmática, num efeito tipicamente auxínico (Quaggiotti et al., 2004; Aguiar et al., 2009; Busato et al., 2017). Essa sequência de eventos bioquímicos, que resulta em maior número de células e crescimento de tecidos radiculares mais finos, é conhecida como teoria do crescimento ácido (Rayle e Cleland, 1992).

O estudo desenvolvido é inédito, existindo poucas comparações com demais estudos, mas pode-se citar Bertolazi et al., (2010) que comenta o aumento da atividade da H⁺-ATPase em presença de fungos ectomicorrízicos (fungos ectomicorrízico), destacando-se um maior entendimento sobre a regulação das bombas de prótons e transportadores na membrana fúngica. Bago et al., (1997) revelaram que a atividade da ATPase sensível ao vanadato (associada à membrana plasmática) dos microsomas da raiz do girassol aumentou com a colonização micorrízica., atividade aumentada das atividades de ATPase é sensível a nitrato (associado a tonoplastos) e azida (relacionada à membrana mitocondrial) em extratos obtidos de plantas de cebola micorrízica com 45 e 60 dias de idade. Além disso, as H⁺ATPases da membrana plasmática são codificadas por famílias multigênicas que incluem genes no tomate, em *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana plumbaginifolia* e em *Saccharomyces cerevisiae* (Schlesser et al., 1988). Dessa forma é necessário a realização de mais estudos a fim de elucidar e aprofundar sobre espécies florestais envolvidas aos mecanismos de bioestimuladores vegetais utilizando microrganismos para dar continuidade ao estudo realizado.

Notou-se que não houve diferença para as variáveis biométricas avaliadas (Figura 3). Sendo o tratamento com bactérias do gênero *Enterobacter* aquele com melhor rendimento para todas as variáveis.

O NRL para o IM foi 16,35% superior ao controle (Figura 3A). Estes resultados podem estar associados ao fato de que o crescimento vegetal pode variar conforme sua origem, e seus efeitos indiretos mediados pela ação das bactérias na rizosfera (porosidade, textura de agregação, respiração, pool de nutrientes biodisponíveis, atividade da microbiota e assim por diante), enquanto que os efeitos diretos são aqueles ligados à ação no desenvolvimento da planta a partir de sua interação com as membranas celulares na superfície da raiz (Olaetxea et al., 2017).

Assim como ocorre na presença de auxinas, a aplicação do IM resulta em indução de raízes e expansão celular, associada ao aumento da atividade bioquímica e expressão dos genes que codificam

para as ATPases (Zandonadi et al., 2007). Os resultados confirmam a hipótese de que o efeito de estimulação sobre o crescimento vegetal é, pelo menos em parte, benéfico para o desenvolvimento da espécie aumentando o seu rendimento durante os 150 dias de avaliação. Nery et al. (2016), ao analisarem a distribuição percentual da alocação de biomassa nos diferentes órgãos das plantas, verificaram que,

em média, 45% de fotoassimilados foram alocados para as raízes em todos os níveis de sombreamento por eles avaliados. Para esses autores, cerca de 20% a 25% da biomassa seca produzida pelas plantas foi alocada para o caule, não havendo diferenças entre os tratamentos em tratamentos para a mesma espécie aqui avaliada (Nery et al., 2016).

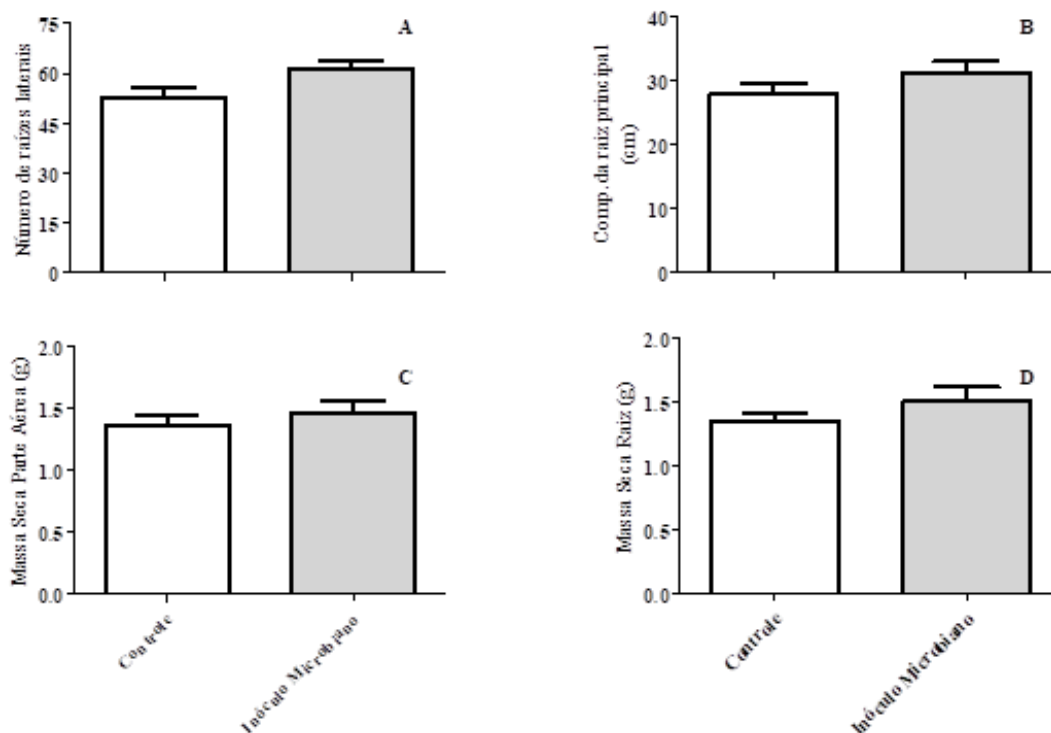


Figura 3 - Efeito da adição de inóculo microbiano contendo bactérias do gênero *Enterobacter* sobre o desenvolvimento de mudas de *C. brasiliense*. (A) número de raízes laterais, (B) comprimento da raiz principal, (C) massa seca parte aérea, (D) massa seca raízes. Barras representando a média de 20 mudas e o desvio-padrão. Ausência de letras representa ausência de significância pelo teste de F.

Para a variável CRP o IM resultou em incremento de 12,2% quando comparada ao controle. Esses resultados devem considerar as observações feitas por Baldotto e Baldotto (2014) que consideram os IM atuam na bioatividade que estimulam o crescimento das plantas, aumentando a eficiência na produção vegetal. A aplicação de IM resultou em efeitos benéficos na inoculação micorrízica e na produção de biomassa de brotação e raiz nos experimentos de Bettoni et al. (2014). García et al. (2016) utilizaram plantas de arroz para determinar a acumulação de espécies reativas de oxigênio, em função da aplicação de bioestimulantes e observaram que a sua aplicação resultou em aumento no crescimento das raízes.

A intensificação da agricultura atingiu um ponto crítico em que os impactos negativos derivados

desta atividade estão resultam em alterações climáticas irreversíveis bem como a perda em muitos serviços ecossistêmicos, sendo a variável CRP de fundamental interesse para implementação de sistemas agroflorestais (Canellas et al., 2015). Uma solução potencial para ajudar nesta transição é o uso de bioestimulantes de plantas baseados em bactérias como as do gênero *Enterobacter* sp.. Essas informações de acordo com os resultados apresentados podem ser expandidas para o contexto silvicultural.

Essas diferenças revelam que a espécie apresenta plasticidade anatômica, adaptando-se a diferentes condições ambientais, como observado anteriormente para outras espécies florestais (Lima Jr. et al., 2006; Nery et al., 2016). Os valores de MSA e MSR (Figura 3C e 3D) para o tratamento com IM foram 7,35 e 11,12% maiores quando comparados

ao controle. Melo et al. (2012) ao avaliarem bactérias em eucalipto afirmam que a bactéria não interferiu na massa seca, segundo estes autores uma das explicações para o comportamento diferencial seriam fatores relacionados ao meio ambiente e constituição genética da árvore testada. Lana et al. (2008) são autores que também encontram insignificância na massa seca ao no crescimento de estacas de eucalipto. As atividades dos IM são recalcitrantes, sendo possível usá-las para introduzir microrganismos benéficos no campo (Canellas et al., 2015). Considerando-se o *C. brasiliense*, este apresenta lento desenvolvimento por se tratar de uma espécie florestal, este tipo de trabalho favorece as tecnologias silviculturais com benefícios na tecnologia de produção.

Além da indústria madeireira, *C. brasiliense* pode ser empregado como fonte de compostos com eficiência no tratamento de doenças humanas. O látex exsudado é usado no tratamento da úlcera gástrica na medicina popular e vários compostos ativos já foram isolados da casca de seu tronco (Lemos et al., 2012). A atuação de compostos produzidos pela contra leishmaniose já foi comprovada (Brenzan et al., 2008), assim como seu papel no tratamento de Diabetes mellitus, uma disfunção metabólica crônica e grave que interfere diretamente no metabolismo dos carboidratos, gorduras e proteínas (Oliveira et al., 2016). Extratos hexânicos da folha da espécie apresentam-se enriquecidos em calanólido, substância que inibe a transcriptase reversa do tipo 1 do vírus da imunodeficiência humana (RT do HIV-1) (César et al., 2011). Com o intuito de obter suporte a programas de recomposição de ambientes degradados favorecendo a preservação da espécie, possibilitando a amenização das características onerosas na produção florestal do *C. brasiliense* é viável do desenvolvimento de estudos de base fisiológica, sobretudo no que diz respeito à germinação de sementes e crescimento inicial de mudas (Lisboa et al., 2012), pois a partir disso, permite aos produtores ganhos significativos e favorecem a preservação da espécie.

CONCLUSÕES

As mudas de *C. brasiliense* inoculadas com bactérias do gênero *Enterobacter* sp. apresentaram maior crescimento biométrico e aumento na atividade das ATPases, estimulando assim o uso desse microrganismo em sistemas agroflorestais de espécies nativas. Os resultados obtidos evidenciam que bactérias associadas a espécie florestal estudada, podem ser exploradas para uso como IM visando auxiliar as plantas na obtenção de nutrientes de solos pobres do Cerrado, assim como na oferta de reguladores de crescimento para as plantas.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, N. DE O., CANELLAS, L.P., DOBBS, L.B., ZANDONADI, D.B., OLIVARES, F.L., FAÇANHA, A.R. Distribuição de massa molecular de ácidos húmicos e promoção do crescimento radicular. Rev. Bras. Ciência do Solo 33, 1613–1623, 2009. doi:10.1590/S0100-06832009000600010
- AGUIAR, N.O., OLIVARES, F.L., NOVOTNY, E.H., DOBBS, L.B., BALMORI, D.M., SANTOS-JÚNIOR, L.G., CHAGAS, J.G., FAÇANHA, A.R., CANELLAS, L.P. Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. Plant Soil 362, 161–174, 2013. doi:10.1007/s11104-012-1277-5
- BAGO, B.; DONAIRE, J. P.; AZCON - AGUILAR, C. ATPase activities of root microsomes from mycorrhizal sunflower (*Helianthus annuus*) and onion (*Allium cepa*) plants. New phytologist, v. 136, n. 2, p. 305-311, 1997.
- BALDOTTO, M.A., BALDOTTO, L.E.B. Ácidos húmicos. Rev. Ceres 61, 856–881, 2014. doi:10.1590/0034-737x201461000011
- BERTOLAZI, A. A. et al. O papel das ectomicorrizas na biorremediação de metais pesados no solo. Natureza on line, Santa Teresa, v. 8, n. 1, p. 24-31, 2010.
- BETTONI, M.M., MOGOR, Á.F., PAULETTI, V., GOICOECHEA, N. Growth and metabolism of onion seedlings as affected by the application of humic substances, mycorrhizal inoculation and elevated CO₂. Sci. Hortic. (Amsterdam). 180, 227–235, 2014. doi:10.1016/j.scienta.2014.10.037
- BRENZAN, M.A., NAKAMURA, C.V., DIAS FILHO, B.P., UEDA-NAKAMURA, T., YOUNG, M.C.M., CÔRREA, A.G., JÚNIOR, J.A., DOS SANTOS, A.O., CORTEZ, D.A.G. Structure–activity relationship of (–) mamea A/BB derivatives against *Leishmania amazonensis*. Biomed. Pharmacother. 62, 651–658, 2008. doi:10.1016/j.biopha.2008.08.024
- BUSATO, J.G., LIMA, L.S., AGUIAR, N.O., CANELLAS, L.P., OLIVARES, F.L. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. Bioreour. Technol. 110, 390–395, 2012. doi:10.1016/j.biortech.2012.01.126
- BUSATO, J.G., ZANDONADI, D.B., MÓL, A.R., SOUZA, R.S., AGUIAR, K.P., JÚNIOR, F.B.R., OLIVARES, F.L. Compost biofortification with diazotrophic and P-solubilizing bacteria improves maturation process and P availability. J. Sci. Food Agric. 97, 949–955, 2017. doi:10.1002/jsfa.7819
- CANELLAS, L.P., OLIVARES, F.L., AGUIAR, N.O., JONES, D.L., NEBBIOSO, A., MAZZEI, P., PICCOLO, A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture.

- Sci. Hortic. (Amsterdam). 196, 15–27, 2015. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.013
- CÉSAR, G.-Z.J., ALFONSO, M.-G.G., MARIUS, M.-M., ELIZABETH, E.-M., ÁNGEL, C.-B.M., MAIRA, H.-R., GUADALUPE, C.-L.M., MANUEL, J.-E., RICARDO, R.-C.. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase, toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas, Mexico. *Fitoterapia* 82, 1027–1034, 2011. doi:10.1016/j.fitote.2011.06.006
- CHAGAS, A.F., DE OLIVEIRA, L.A., DE OLIVEIRA, A.N., WILLERDING, A.L.. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. *Acta Sci. - Agron.* 32, 359–366, 2010. doi:10.4025/actasciagron.v32i2.3185
- DU JARDIN, P.. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 196, 3–14, 2015. doi:10.1016/j.scienta.2015.09.021
- FERRETTI, A.R., DE BRITIZ, R.M.. Ecological restoration, carbon sequestration and biodiversity conservation: The experience of the Society for Wildlife Research and Environmental Education (SPVS) in the Atlantic Rain Forest of Southern Brazil. *J. Nat. Conserv.* 14, 249–259, 2006. doi:10.1016/j.jnc.2006.04.006
- GARCÍA, A.C., SANTOS, L.A., DE SOUZA, L.G.A., TAVARES, O.C.H., ZONTA, E., GOMES, E.T.M., GARCÍA-MINA, J.M., BERBARA, R.L.L.. Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants. *J. Plant Physiol.* 192, 56–63, 2016. doi:10.1016/j.jplph.2016.01.008
- KUMAR, A., GULERIA, S., MEHTA, P., WALIA, A., CHAUHAN, A., SHIRKOT, C.K.. Plant growth-promoting traits of phosphate solubilizing bacteria isolated from *Hippophae rhamnoides* L. (Sea-buckthorn) growing in cold desert Trans-Himalayan Lahul and Spiti regions of India. *Acta Physiol. Plant.* 37, 48, 2015. doi:10.1007/s11738-015-1793-z
- LANA, R.M.Q.; LANA, A.M.Q.; BARREIRA, S.; MORAIS, T.R.; FARIA, M.V. Doses do ácido indolbutírico no enraizamento e crescimento de estacas de eucalipto (*Eucalyptus urophylla*). *Bioscience Journal*, Uberlândia, v.24, n.3, p. 13-18, 2008.
- LEMOES, L.M.S., MARTINS, T.B., TANAJURA, G.H., GAZONI, V.F., BONALDO, J., STRADA, C.L., SILVA, M.G. DA, DALL’OGLIO, E.L., DE SOUSA JÚNIOR, P.T., MARTINS, D.T. DE O.. Evaluation of antiulcer activity of chromanone fraction from *Calophyllum brasiliense* Camb. *J. Ethnopharmacol.* 141, 432–439, 2012. doi:10.1016/j.jep.2012.03.006
- LIMA JR., É. DE C., ALVARENGA, A.A. DE, CASTRO, E.M. DE, VIEIRA, C.V., BARBOSA, J.P.R.A.D.. Aspectos fisiológicos de plantas jovens de *Cupania vernalis* submetidas a diferentes níveis de sombreamento. *Rev. Árvore* 30, 33–41, 2006. doi:10.1590/S0100-67622006000100005
- LISBOA, A.C., SANTOS, P.S. DOS, OLIVEIRA NETO, S.N. DE, CASTRO, D.N. DE, ABREU, A.H.M. DE. Efeito do volume de tubetes na produção de mudas de *Calophyllum brasiliense* e *Toona ciliata*. *Rev. Árvore* 36, 603–609, 2012. doi:10.1590/S0100-67622012000400003
- LORENZI, H.. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. Nov. Odessa Plant, 1998.
- LOZADA, J.A.R.. Prospecção de bactérias do lodo de esgoto de abatedouro de aves com potencial degradador de substâncias orgânicas e promotor do crescimento de plantas. Ano de obtenção: 2015. (Dissertação de Mestrado) Univ. Fed. Viçosa – Minas Gerais.
- MARCOS, A., DULCINÉIA, D.S., FÁBIO, D.C., VIEIRA, D.A., HELENA, L., CRISTINA, D.. Estrutura genética e espacial de populações naturais de *Calophyllum brasiliense* CAMB. em mata de galeria. *CERNE* 13, 239–247, 2007.
- MARRA, L.M.. Solubilização de fosfatos por bactérias e sua contribuição no crescimento de leguminosas e gramíneas. Ano de obtenção 2012. (Tese em Microbiologia e Bioquímica do Solo). 141 o. Univ. Fed. Lavras – Minas Gerais.
- MELO, L.C. DE, OLIVEIRA, C.V. DE, MANFREDI, C., BALDANI, V.L.D., FERREIRA, J.S.. Efeito de bactérias na promoção do enraizamento em clone de eucalipto. *Enciclopédia Biosf.* 8, n.15; 737, 2012.
- NARDI, S., CONCHERI, G., DELL’AGNOLA, G.. Biological Activity of Humus, in: *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Elsevier, pp. 361–406, 1996. doi:10.1016/B978-044481516-3/50010-4
- NERY, F.C., PRUDENTE, D.D.O., ALVARENGA, A.A. DE, PAIVA, R., NERY, C.. Desenvolvimento de mudas de guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess.) sob diferentes condições de sombreamento. *Rev. Bras. Biociências* v. 14, n.3, 187–192, 2016.
- OLAETXEA, M., DE HITA, D., GARCIA, C.A., FUENTES, M., BAIGORRI, R., MORA, V., GARNICA, M., URRUTIA, O., ERRO, J., ZAMARREÑO, A.M., BERBARA, R.L., GARCIA-MINA, J.M.. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root- and shoot- growth. *Appl. Soil Ecol.* 2017. doi:10.1016/J.APSSOIL.2017.06.007
- OLIVEIRA DE C., H., FARIAS E SOUZA, B.S., DOS SANTOS, I.V.F., RESQUE, R.L., KEITA, H., FERNANDES, C.P., CARVALHO, J.C.T.. Hypoglycemic effect of formulation containing hydroethanolic extract of *Calophyllum brasiliense* in diabetic rats induced by streptozotocin. *Rev. Bras. Farmacogn.* 26, 634–639, 2016. doi:10.1016/j.bjp.2016.04.004
- RAYLE, D.L., CLELAND, R.E.. The Acid Growth Theory of Auxin-induced Cell Elongation Is Alive and Well! *Plant Physiol* 99, 1271–1274, 1992.
- SCHLESSER, A., ULASZEWSKI, S., GHISLAIN, M., AND GOFFEAU, A. (1988). *J. Biol. Chem.* 263, Sentenac, H., Bonnaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.-M., Gaymard, F., Grignon, Serrano, R. (1983).
- SHAHZAD, R., KHAN, A.L., BILAL, S., WAQAS, M., KANG, S.-M., LEE, I.-J.. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*. *Environ. Exp. Bot.* 136, 68–77, 2017. doi:10.1016/j.envexpbot.2017.01.010.
- SILVEIRA, A.P.D. DA, SALA, V.M.R., CARDOSO, E.J.B.N., LABANCA, E.G., CIPRIANO, M.A.P.. Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic

- endophytic bacteria inoculation. *Appl. Soil Ecol.* 107, 313–319, 2016. doi:10.1016/j.apsoil.2016.07.005.
- SIQUEIRA, A.F., CRUZ, Z.M.A., QUEIROZ, S., ROCHA, O.J.A.M., SOARES, D.N.E.S. Desvendando a H⁺ -Pirofosfatase vacuolar e o seu papel na biotecnologia vegetal. *Plant Physiol.* 6, 9–15, 2008.
- SOUZA, B. R. , BALDOTTO, L. E. B., PAULA, A. M., CAMPOS, F. S. , SILVEIRA, K. C.; MARINHO, P. V. , SODRE, F. F., BUSATO, JADER GALBA . Screening of beneficial bacteria associated with *Calophyllum brasiliense* Cambess so as to develop microbial inoculants for agriculture. *Plant Omics Journal*, v.12-02, p. 93-101, 2019. doi: 10.21475/POJ.12.02.19
- TAVARES, O.C.H., SANTOS, L.A., FERREIRA, L.M., SPERANDIO, M.V.L., DA ROCHA, J.G., GARCÍA, A.C., DOBBSS, L.B., BERBARA, R.L.L., DE SOUZA, S.R., FERNANDES, M.S. Humic acid differentially improves nitrate kinetics under low- and high-affinity systems and alters the expression of plasma membrane H⁺-ATPases and nitrate transporters in rice. *Ann. Appl. Biol.* 170, 89–103, 2017. doi:10.1111/aab.12317
- WANI, S.H., KUMAR, V., SHRIRAM, V., SAH, S.K. Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J.* 4, 162–176, 2016. doi:10.1016/j.cj.2016.01.010
- ZANDONADI, D.B., CANELLAS, L.P., FAÇANHA, A.R.. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. *Planta* 225, 1583–1595, 2007. doi:10.1007/s00425-006-0454-2
- ZANDONADI, D.B., SANTOS, M.P., CAIXETA, L.S., MARINHO, E.B., PERES, L.E.P., FACANHA, A.R. Plant proton pumps as markers of biostimulant action. *Sci. Agric.* 73, 24–28, 2016. doi:10.1590/0103-9016-2015-0076
- ZANDONADI, D.B., SANTOS, M.P., DOBBSS, L.B., OLIVARES, F.L., CANELLAS, L.P., BINZEL, M.L., OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L., FAÇANHA, A.R. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta* 231, 1025–1036, 2010. doi:10.1007/s00425-010-1106-0
- ZANDONADI, D.B., SOUZA, R.B. DE, SILVA, J., FONTENELLE, M. Produção orgânica de alface romana com biofertilizantes em cultivo protegido. *Embrapa Hortaliças*, 2018.