



Diocléa Almeida Seabra Silva  
(Organizadora)

# Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva 6



Diocléa Almeida Seabra Silva  
(Organizadora)

# Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva 6

**Atena**  
Editora

Ano 2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Natália Sandrini  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição Creative Commons. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí  
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
A281	<p>Agronomia [recurso eletrônico] : elo da cadeia produtiva 6 / Organizadora Diocléa Almeida Seabra Silva. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva; v. 6)</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-825-0 DOI 10.22533/at.ed.250190312</p> <p>1. Agricultura – Economia – Brasil. 2. Agronomia – Pesquisa – Brasil. I. Silva, Diocléa Almeida Seabra. II. Série.</p> <p style="text-align: right;">CDD 630.981</p>
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
[contato@atenaeditora.com.br](mailto:contato@atenaeditora.com.br)

## APRESENTAÇÃO

A cadeia produtiva é um termo amplo que define com clareza onde cada segmento tem seu grau de importância seja na produtividade de frutos, venda de semente de capineira, na pesca, na aquicultura, na formação de resíduos para a indústria, no controle determinado de vírus, bactérias, nematóides para a agricultura e até mesmo na comercialização de espécies florestais com potencial madeireiro. Na verdade, o termo cadeia produtiva é um conjunto de ações ou processos que fazem presente em estudos científicos que irá dar imagem para o avanço de um produto final.

A imagem de um produto final se torna possível quando trabalhamos todos os elos da cadeia, como por exemplo: para um produtor chegar a comercializar o feijão, ele precisará antes preparar seu solo, ter maquinários pra isso, além de correr o solo com corretivo, definindo a saturação de base ideal, plantar a semente de boa qualidade, adubar, acompanhar a produção fazendo os tratamentos culturais adequados, controlando pragas, doenças e ervas daninhas, além de encontrar mercados para que o mesmo possa vender sua produção. Esses elos são essenciais em todas as áreas, ao passo que na produção de madeira será necessário técnicas sofisticadas de manejo que começa na germinação de sementes, quebra de dormência para a formação de mudas, e além disso padronizar espaçamento, tratamentos silviculturais para a formação de madeira em tora para exportação.

Na pesca a cadeia produtiva segue a vertente do ganho de peso e da qualidade da carne do pescado, que está vinculada a temperatura, pH da água, oxigenação, alimentação e o ambiente para que haja produção. Também a cadeia se verticaliza na agregação de preço ao subproduto do pescado como o filetagem para as indústrias, mercado de peixe vivo e etc.

Na cadeia cujo foco são os resíduos da indústria açucareira, há mercados para a queima de combustível no maquinário da indústria, através da qualidade deste resíduo, além de mercados promissores para a fabricação de combustíveis, rações e até mesmo resíduo vegetal para incorporação nos solos, com a finalidade de manter ou melhorar as características químicas, físicas e biológicas, além de controlar erosão e elevar os níveis de produtividade nas áreas agrícolas, através da adição de nutrientes.

Contudo, sabemos que todos os elos que compõem a cadeia produtiva são responsáveis por agregar valor e gerar de maneira direta e indireta renda aos produtores e pescadores, possibilitando-os na melhoria da qualidade de vida, além da obtenção de produtos de alta qualidade. No entanto, aqui se faz presente a importância das pesquisas mostradas neste E-Book, v. 6 – Agronomia: Elo da Cadeia Produtiva para que o leitor possa perceber novidades que são contextualizadas, através dos trabalhos aqui publicados.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
CONTROLE DE <i>Meloidogyne javanica</i> EM JILOEIRO ( <i>Solanum gilo</i> ) COM RESÍDUO DO FRUTO DE PEQUI ( <i>Caryocar brasiliense</i> )	
Rodrigo Vieira da Silva João Pedro Elias Gondim Fabrício Rodrigues Peixoto Luam Santos Emmerson Rodrigues de Moraes José Humberto Ávila Júnior Luiz Leonardo Ferreira Silvio Luis de Carvalho	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2501903121</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>12</b>
FUNGOS COMO AGENTES DE CONTROLE BIOLÓGICO DE FITONEMATOIDES	
Valéria Ortaça Portela Juliane Schmitt Leticia Moro	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2501903122</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>22</b>
NEMATOIDES ENTOMOPATOGÊNICOS (NEPs)	
Raiana Rocha Pereira Josiane Pacheco de Alfaia Artur Vinícius Ferreira dos Santos Débora Oliveira Gomes Raphael Coelho Pinho Lyssa Martins de Souza Shirlene Cristina Brito da Silva Telma Fátima Vieira Batista	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2501903123</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>33</b>
ICTIOFAUNA DA PRAIA DE BERLINQUE, ILHA DE ITAPARICA, MUNICÍPIO DE VERA CRUZ - BA	
Edilmar Ribeiro Sousa Hortência Ramos Gomes Santos Fabrício Menezes Ramos	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2501903124</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>44</b>
PESCADORES E SUAS PERCEPÇÕES SOBRE A PESCA EM PEQUENA ESCALA: ESTUDO DE CASO NA VILA DOS PESCADORES, COMUNIDADE COSTEIRA NA AMAZÔNIA (BRAGANÇA-PARÁ)	
Maria Eduarda Garcia de Sousa Pereira Thaila Cristina Neves do Rosário Hanna Tereza Garcia de Sousa Moura Elizete Neres Monteiro Francisco José da Silva Santos	
<b>DOI 10.22533/at.ed.2501903125</b>	

**CAPÍTULO 6 ..... 57**

INFLUÊNCIA DE CULTIVAR E DO PERÍODO DE COLHEITA NA PRODUTIVIDADE E NO PADRÃO DE FRUTOS DE MAMOEIROS, INTRODUZIDOS DO ESTADO DO ESPÍRITO SANTO, EM CONDIÇÕES EDAFOCLIMÁTICAS DO AMAZONAS

Lucio Pereira Santos  
Enilson de Barros Silva  
Scheilla Marina Bragança

**DOI 10.22533/at.ed.2501903126**

**CAPÍTULO 7 ..... 71**

MÉTODOS QUÍMICOS NA SUPERAÇÃO DA DORMÊNCIA DE *Brachiaria brizantha* (Hochst ex A. Rich.) Stapf

Tiago de Oliveira Sousa  
Mahany Graça Martins  
Marcela Carlota Nery  
Marcela Azevedo Magalhães  
Thaís Silva Sales  
Letícia Lopes de Oliveira  
Letícia Aparecida Luiz de Azevedo  
Bruno de Oliveira Fernandes

**DOI 10.22533/at.ed.2501903127**

**CAPÍTULO 8 ..... 79**

MICROBIOMA BACTERIANO: EXTRAÇÃO E PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS

Juliano Oliveira Santana  
Karina Peres Gramacho  
Katiúcia Tícila de Souza de Nascimento  
Rachel Passos Rezende  
Carlos Priminho Pirovani

**DOI 10.22533/at.ed.2501903128**

**CAPÍTULO 9 ..... 106**

MODELO PARA A MELHORIA DO PROCESSO DE REGULARIZAÇÃO DA AQUICULTURA PRATICADA EM RESERVATÓRIOS DA UNIÃO BRASILEIRA

Sara Monaliza Sousa Nogueira  
Marco Aurélio dos Santos  
Sandro Alberto Vianna Lordelo  
José Rodrigues de Farias Filho

**DOI 10.22533/at.ed.2501903129**

**CAPÍTULO 10 ..... 123**

NOVA VARIIDADE SEMINAL DE *STEVIA REBAUDIANA*: OBTENÇÃO DE FRAÇÕES COM ALTO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FOLHAS

Paula Gimenez Milani  
Maysa Formigoni  
Antonio Sergio Dacome  
Livia Benossi  
Maria Rosa Trentin Zorzenon  
Simone Rocha Ciotta  
Cecília Edna Mareze da Costa  
Silvio Claudio da Costa

**DOI 10.22533/at.ed.25019031210**

**CAPÍTULO 11 ..... 136**

OS CENTROS DE TRATAMENTO DE RESÍDUOS E O PRISIONAL: REFLEXIBILIDADE AMBIENTAL E NA SAÚDE

Paulo Barrozo Cassol  
Edenilson Perufo frigo  
Alberto Manuel Quintana

**DOI 10.22533/at.ed.25019031211**

**CAPÍTULO 12 ..... 148**

PARÂMETROS DE RESISTÊNCIA PARA CARACTERIZAÇÃO DA FERRUGEM-ASIÁTICA DA SOJA TRATADA COM COMBINAÇÕES QUÍMICAS DE FUNGICIDAS SISTÊMICOS E DE CONTATO

Milton Luiz da Paz Lima  
Gleina Costa Silva Alves  
Matheus do Carmo Leite  
Andressa de Souza Almeida  
Rafaela Souza Alves Fonseca  
Cleberly Evangelista dos Santos  
Marciel José Peixoto  
Flavia de Oliveira Biazotto  
Lettícia Alvarenga  
Justino José Dias Neto  
Wesler Luiz Marcelino

**DOI 10.22533/at.ed.25019031212**

**CAPÍTULO 13 ..... 166**

PRODUÇÃO DA SOJA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES ÉPOCAS DE APLICAÇÃO DE BIOESTIMULANTE

Cristiano de Freyn  
Alexandre Luis Müller  
Dyogo Bortot Brustolin  
André Prechtlak Barbosa  
Martios Ecco  
Vitor Hugo Rosseto Belotto  
Luiz Henrique da Costa Figueiredo  
Vinícius Fernando Carrasco Gomes  
Matheus Henrique de Lima Raposo  
Anderson José Pick Benke  
Arlon Felipe Pereira  
Alan Benincá

**DOI 10.22533/at.ed.25019031213**

**CAPÍTULO 14 ..... 174**

BIOGAS PRODUCTION FROM SECOND GENERATION ETHANOL VINASSE

Manuella Souza Silverio  
Rubens Perez Calegari  
Gabriela Maria Ferreira Lima Leite  
Bianca Chaves Martins  
Eric Alberto da Silva  
José Piotrovski Neto  
Mario Wilson Cusatis  
André Gomig  
Antonio Sampaio Baptista

**DOI 10.22533/at.ed.25019031214**



**CAPÍTULO 15 ..... 185**

PRODUÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS EM SISTEMAS VEGETAIS: VÍRUS DE PLANTAS COMO REATORES DE FÁRMACOS

Nicolau Brito da Cunha  
Michel Lopes Leite  
Kamila Botelho Sampaio  
Simoni Campos Dias

**DOI 10.22533/at.ed.25019031215**

**CAPÍTULO 16 ..... 219**

PROGNOSE DO VOLUME DE MADEIRA EM FLORESTAS EQUIÂNEAS POR MEIO DE MODELOS AGROMETEOROLÓGICOS DE REDES NEURAIS ARTIFICIAIS

Mariana Rodrigues Magalhães Romeiro  
Aristides Ribeiro  
Leonardo Bonato Felix  
Aylen Ramos Freitas  
Mayra Luiza Marques da Silva  
Aline Edwiges Mazon de Alcântara

**DOI 10.22533/at.ed.25019031216**

**CAPÍTULO 17 ..... 232**

QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO AMENDOIM, TRATADAS COM FERTILIZANTE ORGANOMINERAL E SUBMETIDAS AO ESTRESSE SALINO

Thiago Figueiredo Paulucio  
Paula Aparecida Muniz de Lima  
Rodrigo Sobreira Alexandre  
José Carlos Lopes

**DOI 10.22533/at.ed.25019031217**

**CAPÍTULO 18 ..... 245**

QUALIDADE MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA DE SEMENTES DE FEIJÃO

Manoel Victor Borges Pedrosa  
Arêssa de Oliveira Correia  
Patrícia Alvarez Cabanez  
Allan de Rocha Freitas  
Rodrigo Sobreira Alexandre  
José Carlos Lopes

**DOI 10.22533/at.ed.25019031218**

**CAPÍTULO 19 ..... 256**

RELAÇÕES ENTRE A UMIDADE E ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE *PINUS SP.*, ANGELIM-PEDRA (*HYMENOLOBIMUM PETRAEUM*) E CAIXETA (*TABEBUIA CASSINOIDES*)

Vitor Augusto Cordeiro Milagres  
Jessyka Cristina Reis Vieira  
Luiz Carlos Couto  
Magno Alves Mota

**DOI 10.22533/at.ed.25019031219**

**CAPÍTULO 20 ..... 262**

TEOR DE NITROGÊNIO ORGÂNICO NAS FOLHAS E DE PROTEÍNA BRUTA NOS GRÃOS DE SOJA FERTILIZADA COM NITROGÊNIO E MOLIBDÊNIO

Lucio Pereira Santos  
Clibas Vieira

**DOI 10.22533/at.ed.25019031220**

<b>CAPÍTULO 21 .....</b>	<b>280</b>
TEORES DE MANGANÊS EM <i>Pereskia Grandfolia</i> Haw.	
Nelma Ferreira de Paula Vicente	
Erica Alves Marques	
Michelle Carlota Gonçalves	
Abraão José Silva Viana	
Adjaci Uchôa Fernandes	
Roberta Hilsdorf Piccoli	
<b>DOI 10.22533/at.ed.25019031221</b>	
<b>CAPÍTULO 22 .....</b>	<b>285</b>
THE HEIGHT OF CROP RESIDUES INFLUENCES INTAKE RATE OF SHEEP IN INTEGRATED CROP-LIVESTOCK SYSTEMS	
Delma Fabíola Ferreira da Silva	
Carolina Bremm	
Vanessa Sehaber	
Natália Marcondes dos Santos Gonzales	
Breno Menezes de Campos	
Anibal de Moraes	
Anderson M. S. Bolzan	
Alda Lucia Gomes Monteiro	
Paulo César de Faccio Carvalho	
<b>DOI 10.22533/at.ed.25019031222</b>	
<b>CAPÍTULO 23 .....</b>	<b>298</b>
USO DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE AÇÚCAR E ÁLCOOL: BENEFÍCIOS E PERDAS	
Camila Almeida dos Santos	
Leonardo Fernandes Sarkis	
Eduardo Carvalho da Silva Neto	
Luis Otávio Nunes da Silva	
Leonardo Duarte Batista da Silva	
<b>DOI 10.22533/at.ed.25019031223</b>	
<b>SOBRE A ORGANIZADORA.....</b>	<b>310</b>
<b>ÍNDICE REMISSIVO .....</b>	<b>311</b>

## MICROBIOMA BACTERIANO: EXTRAÇÃO E PREPARAÇÃO DE BIBLIOTECAS METAGENÔMICAS

### **Juliano Oliveira Santana**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus,  
Bahia

### **Karina Peres Gramacho**

Centro de Pesquisa do Cacau, Ceplac/Cepec,  
Itabuna, Bahia.

### **Katiúcia Tícila de Souza de Nascimento**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus,  
Bahia.

### **Rachel Passos Rezende**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus,  
Bahia.

### **Carlos Priminho Pirovani**

Universidade Estadual de Santa Cruz,  
Departamento de Ciências Biológicas, Ilhéus,  
Bahia.

**RESUMO:** O filoplano é constituído por uma superfície plana e paisagem uniforme delimitada pela cutícula. Neste ambiente ainda são observadas veias, sulcos, glândulas secretoras e estômatos. Vários microrganismos podem colonizar este espaço, sendo as bactérias os habitantes mais abundantes. Técnicas padrões em laboratório de microbiologia permitem identificar 1% ou menos da diversidade bacteriana na maioria das amostras ambientais. A criação de bibliotecas metagenômicas veem

oferecer oportunidade para a bioprospecção de genes de interesse de microrganismos não-cultiváveis. A metagenômica é um novo campo de investigação que utiliza ferramentas da biologia molecular e da bioinformática para investigar a diversidade microbiana e acessar o vasto potencial biotecnológico oculto no mundo microscópico. Várias metodologias de extração e preparo de bibliotecas metagenômicas já foram descritas como o microbioma de solo, águas oceânicas, órgãos humanos, cavernas, etc. Neste capítulo descrevemos uma extração de biblioteca metagenômica diretamente do filoplano de *Theobroma cacao*, como também todo procedimento laboratorial de preparo da biblioteca acompanhada de ilustrações dos cálculos para facilitar a replicação dos procedimentos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Bactéria, microbioma, folhas.

### BACTERIAL MICROBIOMA: EXTRACTION AND PREPARATION OF METAGENOMIC LIBRARIES

**ABSTRACT:** Phylloplane consists of a flat surface and uniform landscape delimited by the cuticle. In this environment veins, furrows, secretory glands and stomata are still observed. Several microorganisms can colonize this

space, with bacteria being the most abundant inhabitants. Standard microbiology laboratory techniques allow the identification of 1% or less of bacterial diversity in most environmental samples. The creation of metagenomic libraries offers an opportunity for bioprospecting genes of interest to non-cultivable microorganisms. Metagenomics is a new field of research that utilizes molecular biology and bioinformatics tools to investigate microbial diversity and access the vast biotechnological potential hidden in the microscopic world. Several methodologies for extraction and preparation of metagenomic libraries have already been described, such as soil microbiome, oceanic waters, human organs, caves. This chapter we describe a metagenomic library extraction directly from *Theobroma cacao* phylloplane, as well as all laboratory preparation procedures accompanied by calculus illustrations to facilitate the replication of the procedures.

**KEYWORDS:** Bacteria, microbiome, leaves.

## 1 | INTRODUÇÃO

A superfície das folhas, denominada de filoplano, representa a maior superfície biológica do planeta, ocupando uma área foliar de vegetação estimada em 509 bilhões de Km<sup>2</sup> [1,2]. Por serem abundantes no filoplano, os microrganismos possuem papéis cruciais na proteção e crescimento das plantas, entretanto, não são bem caracterizados, exceto para alguns patógenos causadores de epidemias e doenças de interesse econômico na agricultura e silvicultura [3,4,5].

No filoplano, as comunidades microbianas são diversas e variam entre espécies de plantas [6,7,8,9], incluindo muitos gêneros diferentes de bactérias, leveduras, fungos filamentosos, algas, protozoários, oomicetos e nematoides [10,11,12,13]. As bactérias são as colônias mais numerosas no filoplano, sendo encontrado uma média de 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> células/cm<sup>2</sup> [14,15]. Algumas técnicas microscópicas demonstraram que as bactérias não são distribuídas uniformemente em toda superfície da folha [2,16], mas que estão localizadas em aglomerados particulares, como na base dos tricomas glandulares [2,17,18], estômatos [19,20], junções celulares [1,2,21] e estrias das veias [2,16,18].

As comunidades bacterianas apresentam padrões distintos de colonização no filoplano em diferentes estações do ano e idade da folha. A diversidade é menor durante os meses quentes e secos e maior durante as estações chuvosas e frias [22]. Em folhas jovens, as comunidades são compostas de um maior número de microrganismos em qualquer estação do ano em relação às folhas maduras e senescente [22,23].

Os microrganismos são transferidos para o filoplano principalmente pela ação das chuvas, ventos, insetos, e pelo intercâmbio ambiental [10,24,25], enfrentando um ambiente variável ocasionado por temperaturas, umidade e radiação ultravioleta [1,2,26,27]. No entanto, alguns estudos mostram que os microrganismos comensais

não são apenas um conjunto aleatório aderido ao filoplano, mas podem ser regulados pelas plantas [28,29].

As populações microbianas epifíticas habitam e se reproduzem no filoplano à custa dos exsudatos (fenilpropanoides, flavonoides, taninos, quinonas) do hospedeiro e podem ser capazes de influenciar o processo de infecção das espécies patogênicas [15,18,30,31], sendo que a disponibilidade de nutrientes na superfície foliar varia, ocasionando alterações nas populações [2,32]. Além disso, as comunidades epifíticas neutralizam fatores de estresse físico-químico, tais como luz ultravioleta, sal, temperatura, entre outros [33,34].

Entre as barreiras físicas na superfície foliar, encontra-se a cutícula e tricomas. A cutícula é descrita como uma cobertura impermeável (hidrofóbica) de cera produzida pelas células epidérmicas foliares. Ela atua na aderência para colonização microbiana e impedimento à penetração de patógenos [35,36,37,38]. Os tricomas são células especializadas da epiderme encontradas em diversas partes das plantas nas angiospermas, inclusive no filoplano, exercendo papéis na absorção de água, temperatura da folha e defesa contra insetos [39,40].

O *Theobroma cacao* L. é uma planta nativa da Amazônia, pertencente à família das Malváceas [41]. Possui dois grandes grupos de origem de acordo com suas características morfológicas, genética e localização geográfica [42,43]. O cacau possui grande importância industrial e alimentícia, uma vez que de suas amêndoas fermentadas e torradas, são obtidas o líquido, manteiga e torta, que são consideradas matérias-primas, para obtenção do chocolate [44].

Com a finalidade de se analisar as comunidades microbianas do filoplano do cacau utilizando técnicas moleculares de última geração (metagenômica) [45], o lavado aquoso foliar de dois genótipos do *T. cacao* contrastantes para resistência à vassoura-de-bruxa, foram utilizados como amostras biológicas para desenvolver uma metodologia de extração eficiente e preparo da biblioteca.

## 2 | O FILOPLANO

As superfícies planares das folhas são denominadas de filoplano [46] e são delimitadas pela cutícula [1]. O microbioma presente neste habitat é vasto, com uma área foliar global estimada em 508 milhões km<sup>2</sup>, que corresponde a 1 trilhão km<sup>2</sup> de superfície foliar, se incluir as faces abaxial e adaxial, uma área de aproximadamente o dobro da superfície terrestre [1,2]. Pela sua extensão, a área foliar representa sozinha a maior superfície biológica do planeta e cada Km<sup>2</sup> estima-se abrigar 10<sup>18</sup> bactérias, superando em número as células das próprias plantas, hospedando ainda uma comunidade diversificada ainda não estimada de invertebrados, fungos e outros microrganismos [3]. Esta superfície ainda apresenta um ambiente oligotrófico que passa por frequentes mudanças devido à exposição ao ciclo diurno e a condições extremas, incluindo radiação ultravioleta (UV), mudanças frequentes na

disponibilidade de nutrientes e água, além de mudanças na temperatura [1,2].

No filopiano são encontradas estruturas como os tricomas glandulares, cutícula e estômatos (Figura 01), que fornecem um primeiro ponto de contato entre os microrganismos e defesa para as muitas plantas [47,48]. Essas estruturas pré-formadas atuam como barreiras físicas à penetração e ou, colonização por fitopatógenos [49].

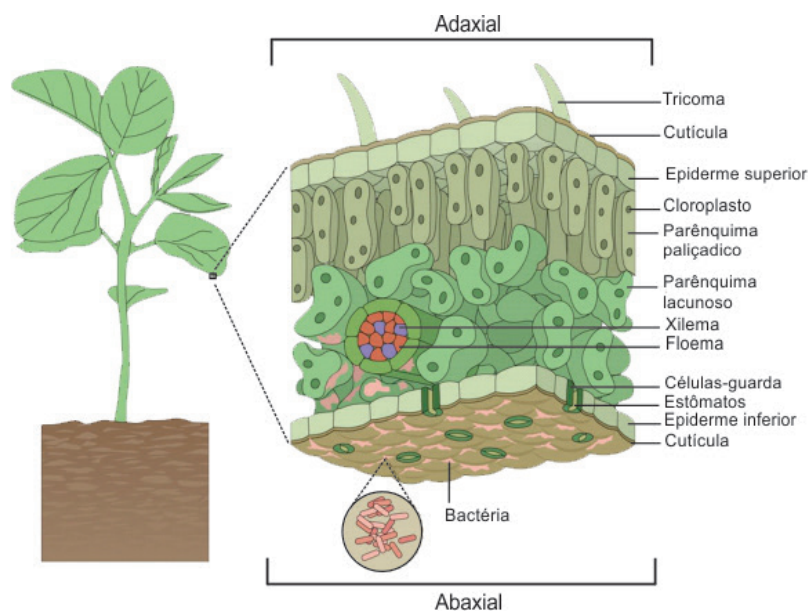


Figura 01: Representação esquemática do filopiano. Fonte: adaptada de Vorholt, 2012.

Os tricomas podem interferir nas funções da planta em virtude de suas propriedades físicas (tamanho e densidade), na absorção de água, defesa contra insetos e nutrição de larvas [50], secreção de metabólitos secundários [51,52] e proteínas antipatogênicas [53,54,55]. Atuam ainda na homeostase de íons e no sequestro e compartimentação dos metais pesados [56,57]. Alguns estudos sugerem que os tricomas desenvolvem mecanismos de defesa dependentes de enxofre [58,59] e glutatona [60] contra as respostas ao estresse oxidativo e para controle redox.

A cutícula, que cobre a epiderme, é composta por cutina e cera [15] que separa a folha do ar circundante do meio ambiente e contribui para proteger e impedir a desidratação do filopiano [35,61]. A cutina é rica em polissacarídeo que forma a camada cuticular, por outro lado, a cera constrói uma camada subjacente menos abundante em polissacarídeos [37]. Essas estruturas formam uma barreira lipofílica com baixa permeabilidade que limita a difusão de nutrientes na superfície da folha controlando o crescimento de microrganismos [62]. Poucos estudos abordaram a presença de estruturas de superfície e proteínas específicas que permitem a adesão de microrganismos à cutícula hidrofóbica. As proteínas da família de hemaglutininas em *Dickeya dadantii* [63] e *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* [64] demonstraram ser importantes para a ligação e agregação nessas espécies.

Os estômatos, outra estrutura do filopiano, desempenham papéis fundamentais

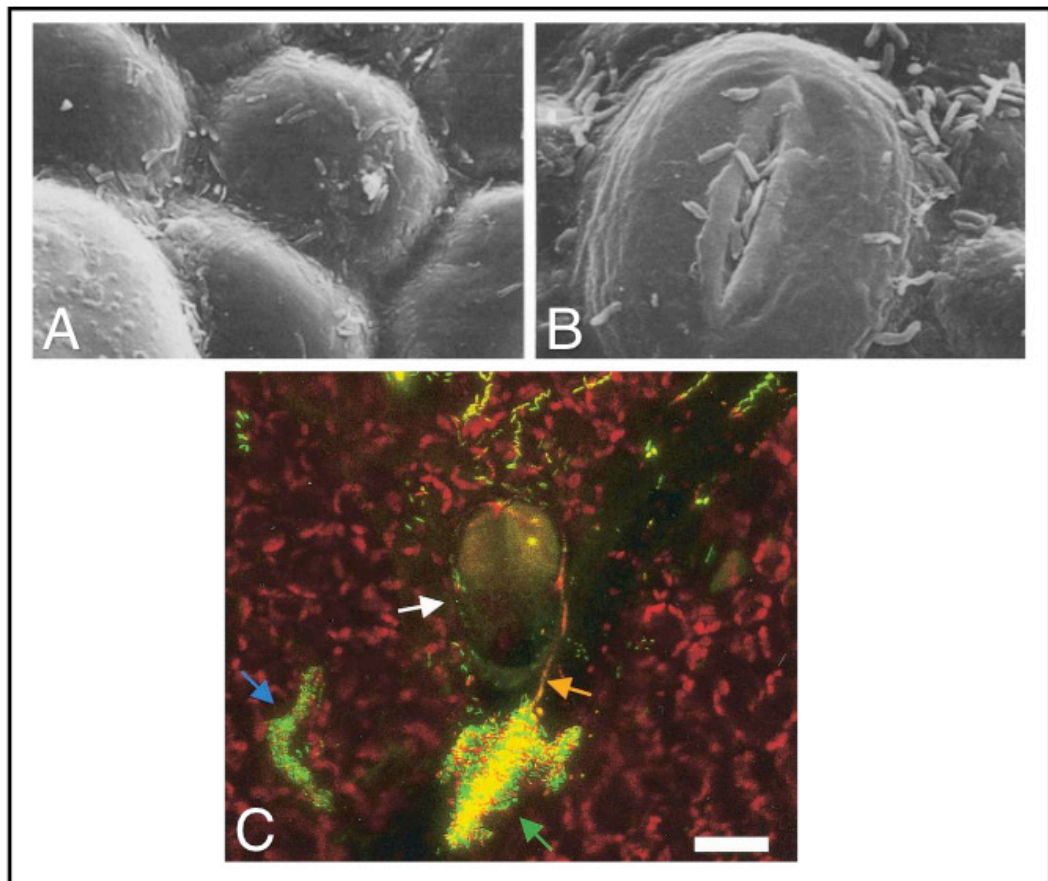
no controle de água e trocas gasosas entre a planta e o ambiente [65]. O vapor de água que difunde através de estômatos se condensa e cria filmes de água microscópicos na superfície da folha [66]. A depender da quantidade de estômatos distribuídos no filoplano, dos seus tamanhos e das aberturas, os patógenos podem ter dificuldade no processo de penetração e interação parasitária com o hospedeiro [67]. As células-guarda, que circundam o estômato, possuem a capacidade de detectar PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) perto do poro estomático em resposta à infecção. Algumas cepas bacterianas produzem um fator de virulência, denominado coronatina, que reabre os estômatos [68] e permite a entrada de patógenos e trocas gasosas [65].

## 2.1 Origem e localização do microbioma

O filoplano está exposto a uma notável diversidade de microrganismos [69,70,71]. Essas comunidades microbianas são depositadas no plano foliar pela ação do vento [25], ciclo da chuva, contato com animais [72] e insetos [73]. Após a exposição inicial, alguns desses microrganismos são capazes de colonizar o filoplano [3,74] e ocuparem nichos recém-formados enquanto as folhas se expandem [1].

Outro modo de transmissão de uma comunidade microbiana simbiótica para planta, baseia-se na teoria hologenômica, na qual o holobionte com todos seus microrganismos são considerados como uma unidade evolutiva [75]. Um fragmento de uma planta que cai no solo, pode se enraizar e transformar em uma planta com alguns dos simbiontes da planta original e ainda incorporar outros microrganismos do solo [72]. Em um estudo realizado com duas espécies diferentes de *Hydra* colonizadas por diferentes comunidades de microrganismos, as duas espécies de *Hydra* foram povoadas com microrganismos semelhantes, tanto no laboratório, quanto na natureza, mesmo após mais de 30 anos de manutenção dos cnidários no laboratório [76].

O microbioma diversificado pode localizar-se em diferentes lugares do filoplano [28,69]; imagens obtidas com microscopia eletrônica e de fluorescência (Figura 02), mostram que os microrganismos estão presentes nas depressões entre células epidérmicas, na base dos tricomas, veias e em torno dos estômatos [2,18]. Essa variabilidade na distribuição espacial dos microrganismos simbiontes na superfície foliar pode ser influenciada pela presença de nutrientes e metabólitos secretados ou depositados no filoplano [77], provocando um crescimento microbiano seletivo [78].



**Figura 02: Microrganismos distribuídos no filoplano.** (A) Bactérias nas depressões entre células epidérmicas do filoplano de tomate. (B) Bactérias ao redor de um estômago do filoplano de tomate. (C) Microscopia de fluorescência da flora microbiana do filoplano de feijão. Flecha verde: agregado bacteriano misto. Flecha laranja: hifa fúngica. Flecha branca: bactérias na base de um tricoma glandular. Flecha azul: bactérias nas junções das células. Fonte: Mariano e McCarter, 1993 [18] e Lindow e Brandl, 2003 [2].

## 2.2 Nutrientes e metabólitos

Os microrganismos podem se desenvolver no filoplano, pois este ambiente pode proporcionar uma variedade de nutrientes e metabólitos secundários, sendo encontrados exsudados foliares, resíduos orgânicos, grãos de pólen, secreções produzidas por afídeos e outras substâncias inorgânicas [9,79,80]. Os exsudados são importantes para sustentar a comunidade microbiana, no qual são encontradas substâncias orgânicas como, açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, fenóis e vitaminas [81].

Os nutrientes inorgânicos encontrados no filoplano, como o potássio, cálcio, magnésio, sódio e manganês, geralmente são lixiviados com maior facilidade, com perda de 25% de nutrientes em folhas jovens [82]. Os minerais que são lixiviados com dificuldade (menos de 1 %) são o ferro, zinco, cloro e fósforo [81]. Contudo, substâncias orgânicas, principalmente carboidratos, também representam a maior quantidade de materiais que podem ser lixiviados.

A água é formada e propagada no filoplano influenciadas pelas protuberâncias e calhas produzidas pelas células epidérmicas que determinam a forma e o tamanho das áreas baixas na superfície [83]. A disponibilidade de nutrientes contendo carbono



nas folhas é o principal determinante da colonização das comunidades epifíticas [84], sendo os açúcares simples, como glicose, frutose e sacarose, as fontes de carbono dominantes no filoplano [77, 81]. Esses abundantes nutrientes estão disponíveis devido a vazamentos localizados secretados pelos tricomas glandulares ou extravasados nos locais de lesões, influenciando grandes agregados bacterianos [85].

O metanol está presente em superfícies de folhas de plantas como um subproduto da desmetilação da pectina durante o metabolismo da parede celular da planta [80]. O perfil proteico da metaproteômica do filoplano das plantas *Glycine max*, *Trifolium repens* e *Arabidopsis thaliana* mostram que as proteínas pertencentes ao *Methylobacterium* spp. estão envolvidas na assimilação do metanol e são encontradas em abundância na filosfera [28].

### 2.3 Adaptação microbiana

A composição do microbioma do filoplano pode ser influenciada por fatores ambientais, incluindo radiação UV [26], clima [86,87], poluição [88] e adubação nitrogenada [89], bem como fatores bióticos, como a idade da folha [22] e a presença de outros microrganismos [2,90]. A luz UV pode ameaçar a sobrevivência dos microrganismos no filoplano ao danificar seu DNA, como também o aparelho fotossintético e os lipídios da membrana da planta [37,91].

Estudos em laboratório com bactérias associadas a folhas, examinaram a tolerância a UV na faixa de 254 nm. O gene *recA*, que está envolvido no reparo de dano no DNA, contribui para a tolerância UV. A inativação de *recA* em *Pseudomonas syringae*, residente do filoplano, diminuiu a sua tolerância a UV em cultura em várias ordens de grandeza [92]. Outro mecanismo de proteção nas bactérias, é a produção de carotenoides, no qual são sintetizados 80 carotenoides diferentes por bactérias fotossintéticas [93]. Estes neutralizam os derivados de oxigênio reativos que são gerados por radiação visível e próxima à UV [15].

### 2.4 Composição das comunidades microbianas

Utilizando técnicas independentes de cultivo, no filoplano, são observadas uma ampla variedade de gêneros, incluindo bactérias, fungos, oomicetos, vírus, protozoários, leveduras e algas [10,12,13,94]. As bactérias são numericamente dominantes no filoplano e a formação de agregados bacterianos pode constituir entre 30 a 80% da população total [85,95]. Esses agregados são particularmente comuns nas depressões formadas nas junções de células epidérmicas, ao longo das veias e nas bases dos tricomas [96].

Embora uma variedade de microrganismos possa ser associada ao filoplano, como residentes transitórios, as condições ambientais selecionam alguns que persistem, multiplicam-se e representam os verdadeiros moradores do filoplano [74]. Enquanto o solo parece ser uma das fontes mais prováveis de microbiota, a

comparação de comunidades bacterianas na superfície foliar e do solo, revelou que uma fração muito pequena (0,5%) de unidades taxonômicas operacionais compartilhadas entre os dois ambientes [7]. Análise do ar que circunda acima da vegetação, mostrou que as plantas são fontes locais de microrganismos existentes no ar. As análises do microbioma revelaram que 50% das bactérias presentes no ar, são de origem vegetal local [25].

#### 2.4.1 Bactérias do filoplano

Entre os principais microrganismos bacterianos presentes no filoplano, destacam-se: Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria e Cyanobacteria [8,28,97,98,99]. Alguns fatores como o clima, localização geográfica e tipos de espécies de plantas, vem demonstrando ser importantes na distribuição das frequências dos filos.

A proteobacteria é o grupo comumente encontrado no filoplano de várias espécies de plantas e regiões geográficas [28,97,100,101]. Este filo é composto por bactérias gram-negativas, a maioria anaeróbias, e é dividido em seis classes, sendo a Alfaproteobactéria o grupo mais abundante no filoplano, conforme estudos realizados em algumas florestas de diferentes continentes. Em folhas de várias árvores de uma floresta localizada no Canadá, as alfaproteobactérias foram dominantes em 68% entre as classes caracterizadas [98], como também na Malásia com 27% [7] e no Panamá, com 22,8% [102]. O grupo das betaproteobactérias é relatado como responsável pela oxidação da amônia. Quatro gêneros já foram relatados em *Prunus* L., sendo o gênero *Massilia* dominante na superfície foliar neste tipo de classe [8].

No grupo da gamaproteobacteria, alguns gêneros e espécies são bem estudados e descritos na literatura. A *Pseudomonas syringae*, um patógeno bacteriano que causa doenças de importância econômica para uma ampla gama de espécies de plantas, é capaz de crescer epifiticamente e entrar nos tecidos das folhas através de estômatos ou feridas, causando doenças através da multiplicação em espaços intercelulares [103]. *P. syringae* tem sido amplamente utilizada para elucidar os mecanismos das interações planta-patógeno [68,104].

A *Candidatus Portiera aleyrodidarum*, outra espécie que pertence ao grupo da gamaproteobacteria, é uma bactéria endossimbionte da *Bemisia tabaci*, e possui habilidade de fornecer ao seu hospedeiro, aminoácidos e carotenoides [105]. Os carotenoides são compostos que a *B. tabaci* geralmente obtêm da dieta, contudo, estes são limitantes na seiva do floema [106]. Por sua vez, os aminoácidos que a *C. Portiera aleyrodidarum* tem a habilidade de sintetizar para seu hospedeiro, são a treonina, triptofano e a serina [73,105].

As espécies do gênero *Lysobacter*, incluída no grupo da gamaproteobacteria, é um grupo de bactérias ambientais que estão emergindo como uma nova fonte de antibióticos [107,108,109]. A *Lysobacter enzymogenes*, por exemplo, é uma bactéria

ubíqua, benéfica, associada à planta, emergente como um novo agente de controle biológico. Essa bactéria apresentou respostas transcricionais e antagônicas a *P. aphanidermatum*, um Oomycete patogênico de plantas [110], como também ação na degradação em paredes celulares de fungos em *Cucumis sativus* e *Solanum lycopersicum* [107,111]. Recentemente, a espécie *Stenotrophomonas pavanii*, inserida também do grupo da gamaproteobacteria, isolada de planta do arroz (*Oryza sativa* L.), demonstrou capacidade de reduzir clorpirifos nas plantas e grãos de arroz e ainda atuar na promoção do crescimento da planta [112].

No grupo da alphaproteobacteria, a espécie *Sphingomonas azotifigens*, foi relatada com habilidade de fixação de nitrogênio [113]. Outras espécies deste gênero possuem a capacidade de expressar proteínas transportadoras TonB, que são capazes de auxiliar no transporte de substratos grandes como as vitaminas, açúcares e sideróforo [28] e ainda atua como reguladores de respostas relacionadas ao estresse ou transporte, como PhyR e EcfG [3]. O PhyR é composto por um domínio amino-terminal que exibe identidade de sequência com fatores sigma de Função Extracitoplasmática (ECF) [114]. Por sua vez, o EcfG é um fator sigma de resposta geral a estresses, cuja atividade é regulada por um mecanismo de mimetização de fator sigma [3].

Firmicutes é um grupo diverso de bactérias que apresenta alta resistência ao stress provocado por ambiente oligotrófico e de baixa umidade. Várias cepas de *Paenibacillus* [115], pertencente a este filo, foram propostas como agentes de biocontrole potencialmente efetivos contra *Verticillium longisporum* [116]. *Paenibacillus* spp. podem produzir um biofilme em torno de raízes de plantas funcionando como uma camada protetora impedindo que os agentes patogênicos tenham acesso ao tecido vegetal [117]. Também são capazes de proteger as plantas contra organismos patogênicos incluindo a produção de uma variedade de antimicrobianos e inseticidas e ainda desencadeia uma resistência sistêmica induzida [118].

### 3 | CACAUEIRO

O cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.) é uma planta que pertence ao gênero *Theobroma*, família *Malvaceae* e a ordem *Malvales* e apresenta características morfológicas variadas dentro da espécie [119]. O cacau, o fruto, ganhou importância pelas questões alimentares e industriais, já que as amêndoas são matéria-prima para a produção de chocolates e derivados [44]. O avanço da doença vassoura-de-bruxa, causada pelo fungo *Moniliophthora perniciosa* [120], juntamente com fatores climáticos e desvalorização do produto, favoreceram o declínio da lavoura cacaueteira.

O fitopatógeno *M. perniciosa* é um fungo basidiomiceto que possui duas fases: saprofítica e parasítica [120]. As plantas infectadas desencadeiam mudanças morfológicas, histológicas e fisiológicas nos frutos, brotações vegetativas e nas as almodadas florais, sofrendo hipertrofia e hiperplasia, tornando-as inviáveis

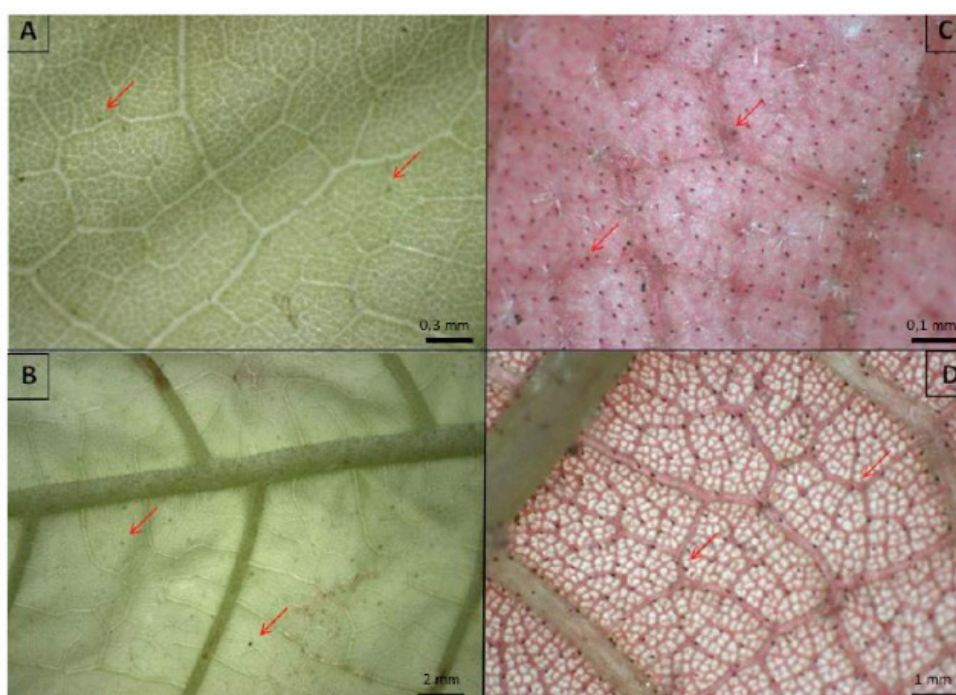
para produção de frutos, provocando necrose e morte dos tecidos infectados [44,121,122,123].

Entre os genótipos do *T. cacao* mais comercializados no mercado, o CCN51, possui como características frutos amarelo-alaranjados quando maduros, sementes com coloração interna púrpura clara [124] e apresenta resistência à vassoura-de-bruxa [53,125,126]. O genótipo Catongo, por sua vez, apresenta frutos amarelos quando maduros, despigmentação no interior das sementes e de folhas tenras [127,128], sendo uma variedade suscetível à doença vassoura-de-bruxa [129].

### 3.1 Filoplano do *Theobroma cacao*

O filoplano do *T. cacao* é formado por estruturas físicas como os tricomas glandulares, cutícula e os estômatos que juntos fornecem o primeiro ponto de contato entre os microrganismos e capacidade de defesa para o cacauzeiro. Diferenças anatômicas entre os genótipos CCN51 e Catongo, foram observadas durante a quantificação da densidade de tricomas glandulares curtos (SGTs) [53]. O filoplano do genótipo CCN51 apresenta maior índice de tricomas glandulares em relação ao genótipo Catongo (Figura 03). A variedade Catongo apresenta nas folhas jovens, uma média de aproximadamente 700 SGTs/cm<sup>2</sup>, enquanto a variedade CCN51, uma média de aproximadamente 1600 SGTs/cm<sup>2</sup>.

A inoculação de suspensão de basidiósporos de *M. pernicioso* nos genótipos CCN51 e Catongo, mostrou que o grupo de plantas que tem somente o solo molhado (por gotejamento) a taxa de infecção pelo fungo e severidade da doença é menor em relação às plantas irrigadas por aspersão. Este estudo concluiu que no filoplano do *T. cacao*, existem componentes hidrossolúveis importantes para a defesa da planta [53].



**Figura 03. Distribuição de tricomas glandulares curtos em folhas jovens.** A e B, superfície foliar adaxial e abaxial, respectivamente, da variedade Catongo. C e D, folha de CCN51 com sua superfície adaxial e abaxial, respectivamente. As setas apontam os tricomas glandulares curtos (SGTs). Fonte: Almeida et al., 2017.

## 4 | METAGENÔMICA

A grande maioria dos microrganismos não são cultiváveis em condições padrão de laboratório, e quase todo o conhecimento da vida microbiana até pouco tempo era baseada em métodos de isolamento e cultivo em laboratórios. Muitas espécies procariontas e eucariotas não podem ser isoladas facilmente de amostras ambientais ou não podem ser cultivadas “*in vitro*” [130]. Estimativas indicam que apenas 1-5% dos microrganismos do ambiente são cultivados [131]. A grande variedade não cultivada veio ampliar o conhecimento da interação entre o microbioma e seu hospedeiro. Através de técnicas utilizando a biologia molecular, a metagenômica surgiu como uma ferramenta para caracterizar comunidades complexas e descrever a diversidade biológica sem a necessidade de isolamento ou cultivo microbiano. O método da metagenômica implica a extração de DNA total de uma comunidade para que todos os genomas sejam sequenciados e classificados [132].

As tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) possibilitaram a aplicação de duas estratégias em metagenômica: os dependentes de *primers* e amplificação, como o sequenciamento do gene do RNAr 16S que se compara o resultado contra um banco de dados, e os independentes de *primers*, como a técnica sem seleção de alvos (*shotgun*) [133].

Atualmente os novos kits de extração de DNA total e as plataformas NGS permitem a construção de bibliotecas com alta cobertura, proporcionando uma maior representatividade taxonômica das amostras [134]. As plataformas NGS, como 454 GS FLX Sequencing (Roche) [135], MiSeq e HiSeq (Illumina) [134], e Ion Torrent (Life Technologies) [136], compreendem equipamentos com capacidade de sequenciamento da ordem de milhões ou bilhões de bases.

Os resultados obtidos pela plataforma Illumina aumenta a profundidade do sequenciamento por amostras. Esta plataforma produz elevado número de sequências, porém seus reads eram relativamente curtos e representava limitações para o estudos do microbioma, o que foi resolvido com o surgimento da plataforma MiSeq com reads pareados de 250 a 300 pb resultando em informações taxonômicas mais precisas e confiáveis [137].

### 4.1 Amplificação do gene do RNAr de 16S

O estudo do gene 16S ribossomal (16S RNAr) envolve a maioria dos métodos moleculares empregados no estudo do microbioma. As características do gene 16S o tornaram um dos marcadores moleculares mais utilizados. Este gene contém uma região altamente conservada, as quais permitem o desenho de primers específicos

para inferir relações filogenéticas, ecológicas e evolutivas [133].

A análise filogenética do gene 16S rRNA, também tem sido aplicada para a determinação de distribuição taxonômica. Essa atribuição requer dados de referência disponíveis em bancos de dados, para classificações ao nível de gênero e espécie [138]. Esta região codificadora ainda apresenta diversas porções, dentre elas algumas conservadas e outras hipervariáveis numeradas de 1 a 9 (V1 a V9), sendo para bactérias a região V2 ou V3 as mais indicadas para análise de microbioma bacteriano para distinguir a nível de gênero [139]. Assim, essas sequências se tornaram também um padrão na detecção e quantificação de populações [140].

As ferramentas de bioinformática atualmente mais utilizadas para processar os dados do sequenciamento do rRNA 16S são o Qiime (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) [141] e o *pipeline* do Uparse [142]. Através dessas ferramentas, as sequências são agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) para realização das análises filogenéticas e de diversidade. As OTUs são classificadas de acordo com os bancos de dados de DNA ribossomal, como os do SILVA [143] e Greengenes [144].

## 5 | MATERIAL VEGETAL E EXTRAÇÃO DO MICROBIOMA

As plantas de interesse devem ser cultivadas em casa de vegetação, mantidas em temperatura ambiente e irrigação controlado por gotejamento para evitar a lavagem das superfícies foliares. Conforme a metodologia do projeto de pesquisa, as plantas devem ser selecionadas aleatoriamente escolhendo as amostras biológicas e as triplicatas experimentais para posterior extração do DNA metagenômico.

As folhas jovens devem ser coletadas no período de 15 a 20 dias após a formação do primórdio foliar. A obtenção do microbioma total do filoplano é obtido através de lavagem de folhas com água de acordo com o método descrito por Shepherd [46], no qual cada folha deverá ser lavada com agitação e imersão por 15 segundos em um béquer contendo 200 ml de água destilada (autoclavada) mantida sobre refrigeração, em seguida retirar a folha da água e escorrer até a última gota (Figura 05). Este procedimento evita a perda de água durante as lavagens subsequentes. As folhas que apresentarem alguma lesão no filoplano não deverão ser expostas à lavagem, pois o objetivo é apenas capturar microrganismos do filoplano.



Figura 04. Lavagem das folhas. Obtenção do lavado foliar.

Foto: Acervo do autor

O microbioma dissolvido no lavado foliar será capturado através de filtração utilizando uma seringa com membrana de celulose de 0,22  $\mu\text{m}$  para reter os microrganismos. Posteriormente, a membrana deverá ser distribuída em tubos eppendorf, congelados em nitrogênio líquido e liofilizados até a completa eliminação da água. Uma quantidade de 0,5 g de membrana liofilizada deverá ser pesada e na sequência realiza a maceração até a obtenção do pó. A extração do DNA metagenômico é utilizando o Kit PowerSoil® DNA Isolation (MoBio Laboratories, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade do DNA deverá ser observada em gel de agarose a 0,8% (p / v) como também sua concentração e pureza utilizando o Nanodrop (Thermo Scientific, EUA).

## 6 | PREPARAÇÃO DAS BIBLIOTECAS

### 6.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para amplificação de fragmento do gene ribossomal 16S rRNA (Klindworth et al., 2013) de bactérias deverá ser realizada PCR em reação com volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 2  $\mu\text{L}$  de DNA, 12,5  $\mu\text{L}$  de HiFi HotStart ReadyMixPCR Kit (Kapa Biosystems), 10  $\mu\text{L}$  (5  $\mu\text{L}$  do *F* e 5  $\mu\text{L}$  do *R*) dos oligonucleotídeos universais (Tabela 01) em concentração final de 10 pM.

Primer	Sequência 5' – 3'	Tamanho Amplicon
16SMetagF	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTA CGGGNGGCWGCAG	550 pb
16SMetagR	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGG ACTACHVGGGTATCTAATCC	

Tabela 01 – Oligonucleotídeos universais utilizados na reação de PCR

Para melhor validação utilizando métodos estatísticos, a reação deverá ser realizada em triplicata nas seguintes condições: desnaturação inicial do DNA molde por 3 min a 95 °C, seguida de 25 ciclos compostos de 30 s a 95 °C de desnaturação, 55 °C para anelamento dos oligonucleotídeos, 72 °C de extensão do primer e 5 min a 72 °C de extensão final. Após a reação de PCR, deverá ser realizada uma corrida de eletroforese em gel de agarose 1% para avaliar a amplificação.

## 6.2 Purificação

Todo o volume das amostras biológicas obtidas a partir do PCR deverá ser purificada utilizando o Kit AMPure® XP, composta por esferas e uma placa magnéticas (Figura 05). As lavagens deverão ser realizadas em duas etapas com Etanol 80% preparado na hora. Após a secagem das esferas com os fragmentos amplificados pela PCR, adicionará 52,5 µL de Tris 10 mM (pH 8,5), incubado à temperatura ambiente durante 2 minutos e em seguida transferido cuidadosamente o sobrenadante para uma nova placa.

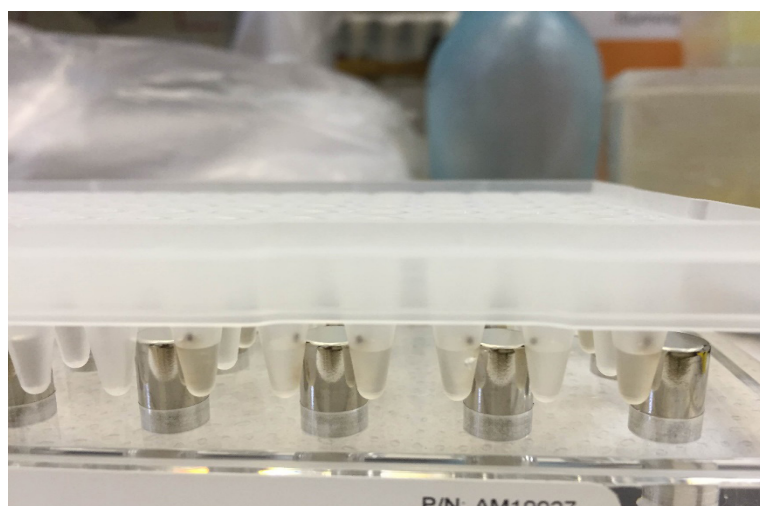


Figura 05: Placa magnética. Placa de 96 poços acoplada a uma placa magnética durante a purificação dos PCR's. Fonte: Acervo do Autor.

## 6.3 Index

Índices deverão ser adicionados nas amostras para diferenciar cada biblioteca



durante o sequenciamento utilizando o kit “NexTera XT Index”. Uma nova PCR é realizada com volume final de 50  $\mu$ L, contendo 5  $\mu$ L da primeira purificação (biblioteca), 25  $\mu$ L de HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems), 5  $\mu$ L do “Nextera XT Index 1 Primers (N7XX)”, 5  $\mu$ L do “Nextera XT Index 2 Primers (S5XX)” e 10  $\mu$ L de água ultra pura. Os indexs (Index 1 Primers e Index 2 Primers) devem ser previamente selecionados (Tabela 02) pelo software MiSeq Control v2.6. É recomendamos o uso de um rack de processamento de PCR (Figura 06), como o dispositivo de fixação para auxiliar na combinação adequada dos Index durante a etapa de preparo das bibliotecas.

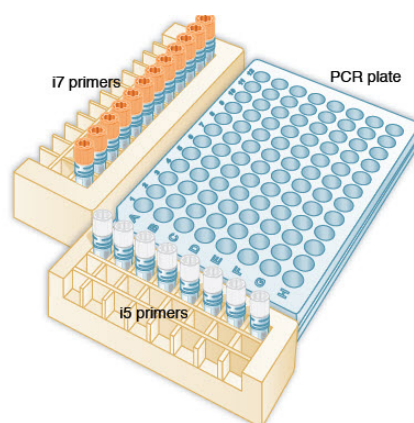


Figura 06: Rack de organização dos Index. Dispositivo de fixação da placa de índice TruSeq.  
Fonte: <https://international.neb.com>.

Seguindo recomendações do protocolo da Illumina (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation), a PCR deve ser realizada com número específico de ciclos para garantir que as bibliotecas produzam resultados de alta qualidade. A reação deverá ser realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial do DNA molde por 3 min a 95 °C, seguida de 8 ciclos compostos de 30 s a 95 °C de desnaturação, 55 °C para anelamento, 72 °C de extensão do primer e 5 min a 72 °C de extensão final. Após a reação, as bibliotecas deverão ser novamente purificadas (Kit AMPure® XP) e a verificação do comprimento esperado das sequências são aproximadamente 630 pb, e deverão validadas em gel de agarose 1%.

Biblioteca	Index (I7)	Index (I5)
01	TAAGGCGA	CTCTCTAT
02	CGTACTAG	CTCTCTAT
03	AGGCAGAA	CTCTCTAT
04	TCCTGAGC	CTCTCTAT
05	GGA CTCCT	CTCTCTAT
06	TAGGCATG	CTCTCTAT

Tabela 02 – Exemplos de seleção dos Index que podem ser sugeridos pelo software MiSeq Control v2.6

## 6.4 Quantificação e sequenciamento das bibliotecas

As bibliotecas de DNA podem ser quantificadas por um ensaio de RT-qPCR utilizando o kit “Kapa Library Quantification” para plataformas de sequenciamento Illumina. As amostras deverão ser diluídas para 1:1.000.000 em solução Tris-HCl + 0,05% Tween 20 e preparadas para quantificação com volume final de 20  $\mu\text{L}$ , contendo 12  $\mu\text{L}$  de MasterMix, 4  $\mu\text{L}$  da biblioteca diluída e 4  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. Seis padrões de concentrações variadas (20 pM, 2pM, 0,2pM, 0,02pM, 0,002pM e 0,0002pM) também devem ser adicionados para compor a curva de referência da quantificação. Na placa de 96 poços todas as amostras deverão ser aplicadas em triplicatas, seguindo-se a seguinte ordem: os padrões, as bibliotecas diluídas e os brancos.

Uma curva padrão de quantificação absoluta deverá ser construída a partir dos valores encontrados no RT-qPCR, sendo inseridos os 6 padrões com seus valores conhecidos e os valores das bibliotecas. As concentrações das amostras são calculadas através de fórmulas gerando uma biblioteca mãe em nM. Posteriormente deverá ser criado um “pool” de 4nM de todas as bibliotecas sendo este também quantificado pela técnica de RT-qPCR.

Após a segunda quantificação do “pool” a biblioteca deverá ser deixada em uma concentração final de 2nM. Num tubo limpo adicionará 5 $\mu\text{L}$  do “pool”, no qual deverá ser desnaturado com 5 $\mu\text{L}$  de NaOH 0,2 M e incubando em temperatura ambiente por 10 minutos. Após incubação deverá ser adicionado ao tubo que contém o pool das bibliotecas 990  $\mu\text{L}$  da solução de HT1 (Tampão de hibridação) do kit Miseq Reagent NanoKit Illumina®. O PhiX deverá ser diluído para 10pM com o tampão HT1. Com o volume de 1 mL (10  $\mu\text{L}$  da desnaturação e 990  $\mu\text{L}$  de HT1), 480  $\mu\text{L}$  deverão ser diluídos em 120  $\mu\text{L}$  de PhiX 10 pM (PhiX Control Kit v3) totalizando um volume final de 600  $\mu\text{L}$ . Para iniciar o sequenciamento, o “pool” da biblioteca finalmente deverá ser transferido para o cartucho de reagentes do MiSeq® Reagente Kit V3 no equipamento MiSeq Illumina® juntamente com a flowcell.

## 6.5 Calculando a concentração da biblioteca

Para calcular a concentração final da biblioteca um dos resultados provenientes do software do RT-qPCR será utilizado nos cálculos. Outros valores também são utilizados nos cálculos, como o tamanho das bandas do controle e das bibliotecas indicados pelos marcadores nos géis de agarose. Por outro lado, os valores como: ajuste, concentração em pM, concentração em nM, volume de trabalho ( $V_t$ ) e volume de diluição ( $V_d$ ), são calculados posteriormente (Quadrado 01).

$$\text{Ajuste} = \frac{\text{Abundância} \times \text{pb do Controle (gel)}}{\text{pb da biblioteca (gel)}}$$


---


$$\text{Concentração em pM} = \text{Ajuste} \times \text{Diluição utilizada}$$


---

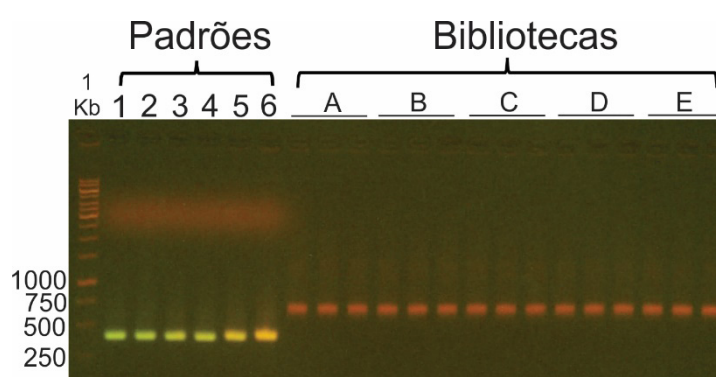

$$\text{Vt (2 nM)} = \frac{4 \times 30}{\text{Concentração em nM}}$$


---


$$\text{Vd} = 30 - \text{Vt (2 nM)}$$

Quadrado 01 – Ilustração dos cálculos para diluição final da biblioteca

O ajuste é calculado multiplicando a “Abundância” pelo tamanho da banda do controle fornecido pelo marcador no do gel de agarose, depois dividir o valor encontrado pelo tamanho da banda da biblioteca também fornecido pelo marcador (Figura 07). A Abundância (Quantity) é um parâmetro fornecido após o término da quantificação pelo aparelho de RT-qPCR.



**Figura 07: Gel de agarose – Quantificação das bibliotecas.** Padrões com aproximadamente 452 pb e as bibliotecas (A,B,C,D e E) com aproximadamente 630 pb.

A diluição da biblioteca mãe é referente as sucessivas diluições que são realizadas para não ocasionar “over-cluster” durante o sequenciamento no equipamento (Tabela 03). Antes de calcular o volume da alíquota que precisará ser retirada da biblioteca para o sequenciamento, a mesma deverá ser convertida de pM para nM e finalmente diluir para 2 nM. Essa diluição final de 2 nM é sugerida se na última quantificação as bibliotecas ficaram fora da curva dos padrões.

Volume retirado	Biblioteca utilizada	Volume de H <sub>2</sub> O adicionado	Diluição
1 µL	Mãe	99 µL	1:100
10 µL	1:100	90 µL	1:1.000
5 µL	1:1000	95 µL	1:20.000
2 µL	1:20.000	98 µL	1:1.000.000

Tabela 03 – Diluição da biblioteca antes de realizar o sequenciamento.

## 7 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse trabalho foi descrito pela primeira vez uma metodologia para a extração de DNA da microbiota do filoplano de *Theobroma cacao* L. como também o preparo das bibliotecas. Esta metodologia possibilitou a extração de DNA microbiano com minimização da contaminação de DNA proveniente de estruturas do apoplasto. A partir do DNA metagenômico extraído foi construída uma biblioteca e descrita uma metodologia de realização dos cálculos para preparo do sequenciamento e quantificação da biblioteca. A metodologia utilizada obteve grande rendimento, o sequenciamento produziu um total de 27,2 milhões de reads [145] da região variável V3-V4 do RNAr 16S. Uma biblioteca metagenômica bem montada ajudará a elucidar a seletividade de microrganismos no filoplano e compreender a interação entre o microbioma e seu hospedeiro.

## REFERÊNCIAS

Vorholt J. A. **Microbial life in the phyllosphere**. Nat. Rev. Microbiol. 2012; 10:828-840.

Lindow S. E. & Brandl M. T. **Microbiology of the phyllosphere**. Appl. Environ. Microbiol. 2003; 69:1875-1883.

Rastogi G., Coaker G.L., Leveau J.H. **New insights into the structure and function of phyllosphere microbiota through high-throughput molecular approaches**. FEMS Microbiol. Lett. 2013; 348:1-10.

Pane C, Zaccardelli M. **Evaluation of *Bacillus* strains isolated from solanaceous phylloplane for biocontrol of *Alternaria* early blight of tomato**. Biological Control. 2015; 84:11-18.

Pinho D, Sousa S, Pinheiro M, Egas C, Gomes AC. **Unravelling the diversity of grapevine microbiome**. PloS One. 2014; 9(1):e85622.

Yang C.-H., Crowley D.E., Borneman J., Keen N.T. **Microbial phyllosphere populations are more complex than previously realized**. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001; 98:3889-3894.

Kim M., Singh D., Lai-Hoe A., Go R. et al. **Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees**. Microb. Ecol. 2012; 63:674-681.

Jo Y., Cho J.K., Choi H., Chu H., Lian S., Cho W.K. **Bacterial communities in the phylloplane of *Prunus* species**. J. Basic Microbiol. 2015; 55(4):504-508.

Junker R.R., Loewel C., Gross R., Dötterl S., Keller A., Blüthgen N. **Composition of epiphytic bacterial communities differs on petals and leaves**. Plant Biology. 2011; 13(6):918-924.

Andrews J.H., and R. F. Harris. **The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces.** Annu. Rev. Phytopathol. 2000; 38:145-180.

Agler T.A., Ruhe J., Kroll S., Morhenn C., Kim S.T., Weigel D., et al. **Microbial hub taxa link host and abiotic factors to plant microbiome variation.** PLoS Biol. 2016; 14(1):e1002352.

Mora-Ruiz Mdel R, Font-Verdera F, Díaz-Gil C., Urdiain M., Rodríguez-Valdecantos G., González B., Orfila A., Rosselló-Móra R. **Moderate halophilic bacteria colonizing the phylloplane of halophytes of the subfamily *Salicornioideae* (*Amaranthaceae*).** Syst Appl Microbiol. 2015; 38(6):406-416.

Singh R.P., Reddy R.K. **Unraveling the function of the macroalgal microbiome.** Front Microbiology. 2016; 6:1-8.

Beattie G. A., Lindow S.E. **The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves.** Annu. Rev. Phytopathol. 1995. 33:145-172.

Hirano S. S., Upper C.D. **Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte.** Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000; 64:624-653.

Leben C. **Relative humidity and the survival of epiphytic bacteria with buds and leaves of cucumber plants.** Phytopathology. 1988; 78:179-185.

Bashan Y., Sharon E., Oleon Y., Henis Y. **Scanning electron and light microscopy of infection and symptom development in tomato leaves infected with *Pseudomonas* tomato.** Physiol. Plant Pathol. 1981; 19:139-144.

Mariano R.L.R., McCarter S.M. **Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and selected weed species.** Microb. Ecol. 1993; 26:47-58.

Mansvelt E.L., Hattingh M.J. **Scanning electron microscopy of invasion of apple leaves and blossoms by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.** Can. J. Bot. 1989; 55(2):533-538.

Miles W.G., Daines R.H., Rue I.W. **Presymptomatic egress of *Xanthomonas pruni* from infected peach leaves.** Phytopathology. 1977; 67:895-897.

Davis C.L., Brlamky R.H. **Use of immunogold labelling with scanning electron microscopy to identify phytopathogenic bacteria on leaf surfaces.** Appl. Environ Microbiol. 1991; 57:3052-3055.

Ercolani G. L. **Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time.** Microb. Ecol. 1991; 21:35-48.

Thompson I. P., Bailey M. J., Fenlon J. S., Fermor T. R., Lilley A. K., Lynch J. M., McCormack P. J., McQuilken M. P., and Purdy K. J. **Quantitative and qualitative seasonal changes in the microbial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*).** Plant Soil. 1993; 150:177-191.

Berlec A. **Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: search for plant probiotics.** Plant Sci. 2012; 193-194:96-102.

Lymperopoulou D.S., Adams R.I., Lindow S.E. **Contribution of vegetation to the microbial composition of nearby outdoor air.** Appl Environ Microbiol. 2016; 82(13):3822-3833.

Kadivar H., Stapleton A.E. **Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity.** Microb. Ecol. 2003; 45(4): 353-361.

Lindemann J., and Upper C. D. **Aerial dispersal of epiphytic bacteria over bean plants.** Appl.

Environ. Microbiol. 1985; 50:1229-1232.

Delmotte N., Knief C., Chaffron S., Innerebner G., Roschitzki B., Schlapbach R., von Mering C., Vorholt J.A. **Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria.** PNAS. 2009; 106:16428-16433.

Redford A.J., Bowers R.M., Knight R., Linhart Y., Fierer N. **The ecology of the phyllosphere: geographic and phylogenetic variability in the distribution of bacteria on tree leaves.** Environ Microbiol. 2010; 12(11):2885-2893.

Wilson M., Hirano S.S., Lindow S.E. **Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf.** Appl. Environ. Microbiol. 1999; 65:1435-1443.

Ryffel F., Helfrich E.J., Kiefer P., Peyriga L., Portais J.C., Piel J., Vorholt J.A. **Metabolic footprint of epiphytic bacteria on *Arabidopsis thaliana* leaves.** ISME J. 2016; 10(3):632-643.

Winter C., Moeseneder M.M, Herndl G.J. **Impact of UV radiation on bacterioplankton community composition.** Appl Environ Microbiol. 2001; 67(2):665-672.

Gourion B., Francez-Charlot A., Vorholt J.A. **PhyR is involved in the general stress response of *Methylobacterium extorquens* AM1.** J Bacteriol. 2008; 190:1027-1035.

Kaczmarczyk A., Hochstrasser R., Vorholt J.A., Francez-Charlot A. **Complex two-component signaling regulates the general stress response in Alphaproteobacteria.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014; 111:E5196-E5204.

Nawrath C. **Unraveling the complex network of cuticular structure and function.** Curr Opin Plant Biol. 2006; 9(3):281-287.

Buschhaus C., Jetter R. **Composition and physiological function of the wax layers coating *Arabidopsis* leaves:  $\beta$ -amyirin negatively affects the intracuticular water barrier.** Plant Physiol. 2012; 160(2):1120-1129.

Yeats T.H., Rose J.K. **The formation and function of plant cuticles.** Plant Physiol. 2013; 163(1):5-20.

Ueda H., Mitsuhashi I., Tabata J., Kugimiya S., Watanabe T., Suzuki K., Yoshida S., Kitamoto H. **Extracellular esterases of phylloplane yeast *Pseudozyma antarctica* induce defect on cuticle layer structure and water-holding ability of plant leaves.** Appl Microbiol Biotechnol. 2015; 99(15):6405-6415.

Harada E., Kim J.A., Meyer A.J., Hell R., Clemens S., Choi Y.E. **Expression profiling of tobacco leaf trichomes identifies genes for biotic and abiotic stresses.** Plant and Cell Physiology. 2010; 51(10):1627-1637.

Karioti A. Tooulakou G., Bilia A.R., Psaras G.K., Karabourniotis G., Skaltsa H. **Erinea formation on *Quercus ilex* leaves: anatomical, physiological and chemical responses of leaf trichomes against mite attack.** Phytochemistry. 2011; 72(2-3):230-237.

Sounigo O., Lachenaud P., Bastide P., Cilas C., N'Goran J., Lanaud C. **Assessment of the value of doubled haploids as progenitors in cocoa (*Theobroma cacao* L.) breeding.** J Appl Genet. 2003; 44(3):339-353.

Almeida A.F., Valle R.R. **Ecophysiology of the cacao tree.** Braz. J. Plant Physiol. 2007; 19(4):425-448.

Rosário M., Perrucho T., Fowler R. L., Sales J. C. **Cacau: história e evolução no mundo.** Ilhéus:

Ceplac, p.46, 1978.

Purdy L.H., Schmidt R.A. **Status of cacao witches' broom: biology, epidemiology, and management.** Annu. Rev. Phytopathol. 1996; 34:573-594.

Von Mering C. **Quantitative phylogenetic assessment of microbial communities in diverse environments.** Science. 2007; 315:1126-1130.

Doan HK, Leveau JHJ. 2015. **Artificial surfaces in phyllosphere microbiology.** Phytopathology. 2015; 105(8):1036-42.

Wagner GJ, Wang E, Shepherd RW. **New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome.** Ann Bot (Lond). 2004; 93(1):3-11.

Harrison NA, Davis MJ. **Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subs *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon-stuning disease.** Phytopathology. 1988; 722-727.

Silva RA, Reis VM, Baldani JI, Olivares FL. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos.** Embrapa Agrobiologia. 2008; 49 p.

Werker E. **Trichome diversity and development.** Adv. Bot. Res. 2000; 31:1-35.

Bednarek P, Osbourn A. **Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense.** Science. 2009; 324(5928):746-8.

Nagel J, Culley LK, Lu Y, Liu E, Matthews PD, Stevens JF, et al. **EST analysis of hop glandular trichomes identifies an *O*-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol.** Plant Cell. 2008; 20:186-200.

Almeida DSM, Gramacho KP, Cardoso THS, Micheli F, Alvim FC, Pirovani CP. **Cacao Phylloplane: The first battlefield against *Moniliophthora perniciosa*, Which Causes Witches' Broom Disease.** Phytopathology. 2017; 107(7):864-871.

Kroumova AB, Shepherd RW, Wagner GJ. **Impacts of phylloplanin gene knockdown and of *Helianthus* and *Datura* phylloplanins on *Peronospora tabacina* spore germination and disease potential.** Plant Physiol. 2007; 144:1843-1851.

Morrissey JP, Osbourn AE. **Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis.** Microbiol Mol Biol Rev. 1999; 63(3): 708-24.

Broadhurst CL, Chaney RL, Angle JS, Mangel TK, Erbe EF, Murphy CA. **Simultaneous hyperaccumulation of nickel, manganese, and calcium in *Alyssum* leaf trichomes.** Environ. Sci. Technol. 2004; 38:5797-5802.

Domínguez-Solís JR, López-Martín MC, Ager FJ, Ynsa MD, Romero LC, Gotor C. **Increased cysteine availability is essential for cadmium tolerance and accumulation in *Arabidopsis thaliana*.** Plant Biotechnol. 2004; 2:469-476.

Gutiérrez-Alcalá G, Gotor C, Meyer AJ, Fricker M, Vega JM, Romero LC. **Glutathione biosynthesis in *Arabidopsis* trichome cells.** Proc. Natl Acad. Sci. 2000; 97:11108-11113.

Wienkoop S, Zoeller D, Ebert B, Simon-Rosin U, Fisahn J, Glinski M, et al. **Cell-specific protein profiling in *Arabidopsis thaliana* trichomes: identification of trichome-located proteins involved in sulfur metabolism and detoxification.** Phytochemistry. 2004; 65:1641-1649.

Amme S, Rutten T, Melzer M, Sonsmann G, Vissers JPC, Schlesier B, et al. **A proteome approach**

**defines protective functions of tobacco leaf trichomes.** Proteomics. 2005; 5:2508-2518.

Kerstiens G. **Plant Cuticles - an Integrated Functional Approach.** Plant Biology Abstracts. 1997; 47:50-60.

Lindow SE, Andersen GL. 1996. **Influence of immigration on epiphytic bacterial populations on navel orange leaves.** Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62:2978-2987.

Rojas CM, Ham JH, Deng WL, Doyle JJ, Collmer A. **HecA, a member of a class of adhesins produced by diverse pathogenic bacteria, contributes to the attachment, aggregation, epidermal cell killing, and virulence phenotypes of *Erwinia chrysanthemi* EC16 on *Nicotiana clevelandii* seedlings.** Proc. Natl Acad. Sci. 2002; 99: 13142-13147.

Das A, Rangaraj N, Sonti RV. **Multiple adhesin-like functions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* are involved in promoting leaf attachment, entry, and virulence on rice.** Mol. Plant Microbe Interact. 2009; 22:73-85.

Vacher C, Hampe A, Porté AJ, Sauer U, Compant S, Morris CE. **The phyllosphere: microbial jungle at the plant–climate interface.** Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2016; 47:1-24.

Burkhardt J, Hunsche M. **“Breath figures” on leaf surfaces-formation and effects of microscopic leaf wetness.** Front. Plant Sci. 2013; 4:422.

Lee SC, Luan S. **ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses.** Plant Cell Environ. 2012; 35: 53-60.

Melotto M, Underwood W, He SY. **Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases.** Annu. Rev. Phytopathol. 2008; 46:101-22.

Bodenhausen N, Horton MW, Bergelson J. **Acterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*.** PLoS One. 2013; 8(2):e56329.

Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, Ver Loren van Themaat E, Schulze-Lefert P. **Structure and functions of the bacterial microbiota of plants.** Annu Rev Plant Biol. 2013; 64:807-38.

Russell JA, Dubilier N, Rudgers JA. **Nature’s microbiome: introduction.** Mol Ecol. 2014; 23(6):1225-37.

Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. **Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution.** FEMS Microbiol Rev. 2008; 32(5):723-35.

Sudakaran S, Kost C, Kaltenpoth M. **Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation.** Trends Microbiol. 2017; 25(5):375-390.

Müller DB, Schubert OT, Röst H, Aebersold R, Vorholt JA. **Systems-level proteomics of two ubiquitous leaf commensals reveals complementary adaptive traits for phyllosphere colonization.** MCP. 2016; 15(10):3256-3269.

Rosenberg E, Sharon G, Atad I, Zilber-Rosenberg I. **The evolution of animals and plants via symbiosis with microorganisms.** Environ Microbiol Rep. 2010; 2(4):500-506.

Fraune S, Bosch TCG. **Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan *Hydra*.** Proc Natl Acad Sci. 2007; 104:13146-13151.

Mercier J, and Lindow SE. **Role of Leaf Surface Sugars in Colonization of Plants by Bacterial Epiphytes.** Appl Environ Microbiol. 2000; 66(1):369–374.



- Müller T & Ruppe S. **Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology**. FEMS Microbiol Ecol. 2014; 87:2–17.
- Brysch-Herzberg M. **Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe**. FEMS Microbiology Ecology. 2004; 50:87-100.
- Galbally IE, and Kirstine W. **The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol**. J Atmos Chem. 2002; 43(3):195-229.
- Tukey HB. **The leaching of substances from plants**. Annu Rev Plant Physiol. 1971; 21(1):305-324.
- Tukey HB, Tukey Jr HB, Wittwer SH. **Loss of nutrients by foliar leaching as determined by radioisotopes**, Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 1958; 71:496-506.
- Mechaber WL, Marshall DB, Mechaber RA, Jobe RT, and Chew FS. **Mapping leaf surface landscapes**. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996; 93(10):4600-4603.
- Wilson M, and Lindow SE. **Coexistence among epiphytic bacterial populations mediated through nutritional resource partitioning**. Appl. Environ. Microbiol. 1994; 60:4468-4477.
- Monier JM, Lindow, SE. **Differential survival of solitary and aggregated bacterial cells promotes aggregate formation on leaf surfaces**. 2003; 100(26):15977-15982.
- Lambais MR, Crowley DE, Cury JC, Büll RC, Rodrigues RR. **Bacterial diversity in tree canopies of the Atlantic forest**. Science. 2006; 312(5782):1917.
- Freiberg E. **Influence of microclimate on the occurrence of cyanobacteria in the phyllosphere in a premontane rain forest of Costa Rica**. Plant biol. 1999; 1(2):244-252.
- Yutthammo C, Thongthammachat N, Pinphanichakarn P, Luepromchai E. **Diversity and activity of PAH-degrading bacteria in the phyllosphere of ornamental plants**. Microb Ecol. 2010; 59(2):357-368.
- Ikeda S, Anda M, Inaba S, Eda S, Sato S, Sasaki K, Tabata S, Mitsui H, et al. **Autoregulation of nodulation interferes with impacts of nitrogen fertilization levels on the leaf-associated bacterial community in soybeans**. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(6):1973-80.
- Suda W, Nagasaki A, Shishido M. **Powdery mildew-infection changes bacterial community composition in the phyllosphere**. Microbes Environ. 2009; 24(3):217-23.
- Rozema J, van de Staaij J, Björn LO, Caldwell M. **UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation**. Trends Ecol Evol. 1997; 12:22-28.
- Willis DK, Hrabak EM, Lindow SE, Panopoulos NJ. **Construction and characterization of *Pseudomonas syringae* recA mutant strains**. Mol. Plant-Microbe Interact. 1988; 1:80-86.
- Delgado-Vargas F, Jiménez AR, Paredes-López O. **Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability**. Crit Rev Food Sci Nutr. 2000; 40(3):173-289.
- Koskella B. **Phage-mediated selection on microbiota of a long-lived host**. Curr Biol. 2013; 23(13):1256-60.
- Morris CE, Monier J-M, Jacques MA. **A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere**. Appl Environ Microbiol.

1998; 64(12):4789-4795.

Baldotto LEB & Olivares FL. **Phylloepiphytic interaction between bacteria and different plant species in a tropical agricultural system.** Can. J. Microbiol. 2008; 54:918-931.

Knief C, Delmotte N, Chaffron S, Stark M, Innerebner G, Wassmann R, von Mering C, Vorholt JA. **Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice.** ISME J. 2012; 6(7):1378-90.

Laforest-Lapointe I, Messier C, Kembel SW. **Host species identity, site and time drive temperate tree phyllosphere bacterial community structure.** Microbiome. 2016; 4(1):27.

Ortega RA, Mahnert A, Berg C, Müller H, Berg G. **The plant is crucial: specific composition and function of the phyllosphere microbiome of indoor ornamentals.** FEMS Microbiol Ecol. 2016; 92(12).

Knief C, Frances L, Cantet F, Vorholt JA. **Cultivation-independent characterization of *Methylobacterium* populations in the plant phyllosphere by automated ribosomal intergenic spacer analysis.** Appl. Environ. Microbiol. 2008; 74: 2218-2228.

Pinto C, Pinho D, Sousa S, Pinheiro M, Egas C, Gomes AC. **Unravelling the diversity of grapevine microbiome.** 2014; 9(1):e85622.

Kembel SW, O'Connorb TK, Arnoldb HK, Hubbell SP, Wrightd SJ, Greenb JL. **Relationships between phyllosphere bacterial communities and plant functional traits in a neotropical forest.** PNAS. 2014; 111(38):13715-13720.

Mansfield J, Genin S, Magori S, Citovsky V, Sriariyanum M, Ronald P et al. **Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology.** Mol Plant Pathol. 2012; 13:614-629.

Innerebner G, Knief C, Vorholt JA. **Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system.** Appl. Environ. Microbiol. 2011; 77: 3202-3210.

Santos-Garcia D, Farnier PA, Beitia F, Zchori-Fein E, Vavre F, Mouton L, Moya A, et al. **Complete genome sequence of “*Candidatus Portiera aleyrodidarum*” BT-QVLC, an obligate symbiont that supplies amino acids and carotenoids to *Bemisia tabaci*.** J Bacteriol. 2012; 194(23):6654-6655.

Sloan DB, Moran NA. **Endosymbiotic bacteria as a source of carotenoids in whiteflies.** Biol Lett. 2012; 8(6):986-9.

Folman LB, Postma J, van Veen JA. **Characterisation of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber.** Microbiol Res. 2003; 158(2):107-15.

Han Y, Wang Y, Yu Y, Chen H, Shen Y, Du L. **Indole-induced reversion of intrinsic multiantibiotic resistance in *Lysobacter enzymogenes*.** Appl Environ Microbiol. 2017; 83(17).

Wang R, Xu H, Zhao Y, Zhang J, Yuen GY, Qian G, Liu F. **Lsp family proteins regulate antibiotic biosynthesis in *Lysobacter enzymogenes* OH11.** AMB Express. 2017; (1):123.

Zhao Y, Qian G, Chen Y, Du L, Liu F. **Transcriptional and antagonistic responses of biocontrol strain *Lysobacter enzymogenes* OH11 to the plant pathogenic Oomycete *Pythium aphanidermatum*.** Front Microbiol. 2017; 8: 1025.

Sullivan RF, Holtman MA, Zylstra GJ, White JF, Kobayashi DY. **Taxonomic positioning of**

- two biological control agents for plant diseases as *Lysobacter enzymogenes* based on phylogenetic analysis of 16S rDNA, fatty acid composition and phenotypic characteristics. J Appl Microbiol. 2003; 94(6):1079-86.
- Feng F, Ge J, Li Y, He S, Zhong J, Liu X, Yu X. **Enhanced degradation of chlorpyrifos in rice (*Oryza sativa* L.) by five strains of endophytic bacteria and their plant growth promotional ability.** Chemosphere. 2017; 184:505-513.
- Castanheira NL, Dourado AC, Pais I, Semedo J, Scotti-Campos P, Borges N, Carvalho G, Barreto Crespo MT, Fareleira P. **Colonization and beneficial effects on annual ryegrass by mixed inoculation with plant growth promoting bacteria.** Microbiol Res. 2017; 198:47-55.
- Lonetto MA. et al. **Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase or factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions.** Microbiology. 1994; 91:7573-7577.
- Rybakova D, Schmuck M, Wetzlinger U, Varo-Suarez A, Murgu O, Müller H., et al. **Kill or cure? The interaction between endophytic *Paenibacillus* and *Serratia* strains and the host plant is shaped by plant growth conditions.** Plant Soil. 2016; 405:65-79.
- Rybakova D, Rack-Wetzlinger U, Cernava T, Schaefer A, Schmuck M, Berg G. **Guerra aérea: um diálogo volátil entre o patógeno vegetativo *Verticillium longisporum* e seu antagonista *Paenibacillus polymyxa*.** Front Plant Sci. 2017; 8: 1294.
- Timmusk S, Grantcharova N, Wagner EGH. ***Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms.** Appl. Environ. Microbiol. 2005; 71:7292-7300.
- Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A, Yuan ZC. **Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review.** Microb. Cell Fact. 2016; 15:203.
- Alverson WS, Whitlock BA, Nyffeler R, Bayer C, Baum DA. **Phylogeny of the core Malvales: evidence from *ndhF* sequence data.** Am J Bot. 1999; 86(10):1474-1486.
- Aime M.C.; Phillips-Mora W. **The causal agents of witches' broom and frosty pod rot of cacao (chocolate, *Theobroma cacao*) form a new lineage of Marasmiaceae.** Mycologia, 2005; 97(5):1012-1022.
- Calle H, Cook AA, Fernando SY. **Histology of witches' broom caused in cacao by *Crinipellis pernicioso*.** Phytopathology. 1982; 72:1479-1481.
- Ceita GO, Macêdo JNA, Santos TB.; et al. **Involvement of calcium oxalate degradation during programmed cell death in *Theobroma cacao* tissues triggered by the hemibiotrophic fungus *Moniliophthora pernicioso*.** Plant Science. 2007; 173:106-117.
- Scarpari LM, Meinhardt LW, Mazzafera P, Pomella AWV, Schiavinato MA, Cascardo JMC, et al. **Biochemical changes during the development of witches' broom: the most important disease of cocoa in Brazil caused by *Crinipellis pernicioso*.** J. Exp. Bot. 2005; 56:865-877.
- Campo EC & Andía FC. **Cultivo y beneficio del cacao CCN-51.** Quito. El Conejo. 1997.
- Boza EJ, Motamayor JC, Amores FM, Cedeño-Amador S, Tondo CL, Livingstone DS, Schnell RJ, Gutiérrez OA. **Genetic characterization of the cacao cultivar CCN51: its impact and significance on global cacao improvement and production.** J. Amer. Soc. Hort. Sci. 2014; 139(2):219-229.
- Lopes UL, Monteiro WR, Pires JL, Clement D, Yamada MM, Gramacho KP. **Cacao breeding in Bahia, Brazil - strategies and results.** CBAB. 2011; 1:73-81.

- Bondar G. **Cacau branco na Bahia. Espécies e variedades de cacau.** Boletim da Secretaria da Agricultura, Indústria e Comércio do Estado da Bahia. 20:7-30. 1958.
- Ferreira ACR, Ahnert D, Melo NBA, Mello DLN. **Guia de beneficiamento de cacau de qualidade.** Ilhéus: Instituto CABRUCÁ, 2013.
- Gramacho ICP, Magno AES, Mandarino EP, Matos A. **Cultivo e Beneficiamento do Cacau na Bahia.** 1ª ed. Ilhéus. CEPLAC/CEDEX. 1992.
- Bailly J, Fraissinet-Tachet L, Verner MC, Debaud JC, Lemaire M, Wésolowski-Louvel M. **Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach.** ISME J. 2007; 1(7):632-42.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. **Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation.** Microbiol Rev. 1995; 59(1):143-69.
- Kunin V, Copeland A, Lapidus A, Mavromatis K, Hugenholtz P. **A bioinformatician's guide to metagenomics.** Microbiol Mol Biol Rev. 2008; 72(4): 557-578.
- Delmont TO, Robe P, Cecillon S, Clark IM, Constancias F, Simonet P, et al. **Accessing the soil metagenome for studies of microbial diversity.** Appl Environ Microbiol. 2011; 77(4):1315-24.
- Bartram AK, Lynch MD, Stearns JC, Moreno-Hagelsieb G, Neufeld JD. **Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads.** Appl Environ Microbiol. 2011; 77(11):3846-52.
- Elizabeth A, Trachtenberg, Cherie L. Holcomb. **Next-Generation HLA Sequencing Using the 454 GS FLX System.** Methods Mol Biol. 2013; 1034: 197–219.
- Sola-Landa A, Rodríguez-García A, Barreiro C, Pérez-Redondo R. **Genome Sequencing of Steroid Producing Bacteria Using Ion Torrent Technology and a Reference Genome.** Methods Mol Biol. 2017; 1645:45-58.
- Jeon YS, Park SC, Lim J, Chun J, Kim BS. **Improved pipeline for reducing erroneous identification by 16S rRNA sequences using the Illumina MiSeq platform.** J Microbiol. 2015; 53(1):60-69.
- Mlot C. **Microbial Diversity Unbound: What DNA-based techniques are revealing about the planet's hidden biodiversity.** BioScience. 2004; 54(12):1064-1068.
- Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connel N, Alland D. **A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria.** J Microbiol Methods. 2007; 69(2): 330-339.
- Zongzhi L, Todd ZD, Gary LA, Rob K. **Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers.** Nucleic Acids Res. 2008; 36(18): e120.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. **QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data.** Nat Methods. 2010; 7(5):335-336.
- Edgar RC. **Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST.** Bioinformatics. 2010; 26(19):2460-1.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. **The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools.** Nucleic Acids Res. 2013; 41:D590-D596.
- DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. **Greengenes, a chimera-**

**checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB.** Appl Environ Microbiol. 2006; 72(7):5069-72.

Santana JO, Gramacho KP, de Souza Eduvirgens Ferreira KT, Rezende RP, et al. **Witches' broom resistant genotype CCN51 shows greater diversity of symbiont bacteria in its phylloplane than susceptible genotype catongo.** BMC Microbiol. 2018; 23;18(1):194.

## **SOBRE A ORGANIZADORA**

**DIOCLÉA ALMEIDA SEABRA SILVA** - Possui Graduação em Agronomia pela Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, atualmente Universidade Federal Rural da Amazônia (1998), especialização em agricultura familiar e desenvolvimento sustentável pela Universidade Federal do Pará – UFPA (2001); mestrado em Solos e Nutrição de Plantas (2007) e doutorado em Ciências Agrárias pela Universidade Federal Rural da Amazônia (2014). Atualmente é professora da Universidade Federal Rural da Amazônia, no Campus de Capanema - PA. Tem experiência agricultura familiar e desenvolvimento sustentável, solos e nutrição de plantas, cultivos amazônicos e manejo e produção florestal, além de armazenamento de grãos. Atua na área de ensino de nos cursos de licenciatura em biologia, bacharelado em biologia e agronomia. Atualmente faz mestrado e especialização em educação, na área de tutoria à distância.

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Adaptabilidade 57, 150  
Água de lavagem 298, 300  
Ambiente rural 136, 138  
Anaerobic digestion 174, 175, 176, 177, 181, 182, 183, 184  
Anisotropia 256, 257, 259, 260  
Autonomia 50  
Azoxystrobina 149

### B

Bactéria 25, 28, 79, 86, 87, 205  
Benzimidazol 149, 156  
Biogás 175  
Bradyrhizobium japonicum 262, 263, 265

### C

Carica papaya 57, 58  
Cessão de uso 109, 110, 113, 115, 116, 117, 118  
Composição mineral 14, 281  
Compostos bioativos 123, 124  
Compostos fenólicos 123, 124, 201  
Comunidade pesqueira 44, 55, 56  
Conhecimento ecológico local 44, 46  
Controle alternativo 1, 2, 8, 11  
Correlação de pearson 219, 221, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230

### E

Eficácia 15, 27, 149, 159, 160, 161, 162  
Expressão transiente de genes 185, 193

### F

Fertirrigação 298, 301, 304, 305, 306, 307, 309  
Folhas 3, 5, 9, 74, 79, 80, 81, 83, 84, 85, 86, 88, 89, 90, 91, 123, 124, 134, 153, 154, 155, 185, 187, 190, 192, 193, 195, 201, 202, 203, 206, 207, 208, 212, 247, 262, 264, 265, 266, 268, 270, 271, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 280, 281, 282, 283, 302  
Fosfito de cu 153, 154

### G

Gases de efeito estufa 298, 304, 306, 307, 309

Germinação 66, 71, 74, 75, 76, 77, 78, 232, 235, 236, 237, 238, 239, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254

Glicosídeos 123, 124

Glycine max 85, 150, 167, 262, 263, 278, 286

Grounded theory 107

## H

Heterorhabditis 22, 23, 26, 30

Hormônios vegetais 166, 167, 170

Hortaliça não convencional 280, 281, 283

## L

Licenciamento ambiental 109, 111, 113, 114, 116, 117, 118, 120, 121

## M

Magnifection 185, 186, 214

Mancozeb 149, 150, 152, 154, 156, 157, 158, 162, 164

Maturidade fisiológica 246, 249

Meio ambiente 18, 46, 53, 82, 107, 111, 114, 115, 136, 137, 138, 140, 141, 145, 147, 298, 299, 300, 309

Método de garson 219, 222, 223, 224, 226, 227, 228, 229, 230

Microbioma 79, 81, 83, 85, 86, 89, 90, 91, 96

Mistura 16, 29, 68, 149, 158, 159, 168, 210, 265, 303

## N

Nicotiana benthamiana 185, 186, 193, 204

Nitrogenase 262, 263, 267, 268, 275

Nova cultura de célula 124

## O

Oro-pro-nobis 281

## P

Peptídeos antimicrobianos 185, 186, 212

Percepção 48, 53, 56, 136, 138, 139, 142, 251

Pesquisa qualitativa 106, 108, 117, 136

Phaseolus vulgaris L 232, 233, 242, 243, 245, 246, 263, 278

Protioconazol 149, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 160, 161

## Q

Qualidade 10, 19, 20, 51, 57, 59, 91, 93, 104, 114, 115, 116, 117, 121, 137, 140, 142, 145, 146,



147, 151, 192, 204, 232, 233, 234, 235, 237, 238, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 259, 308

Qualidade da madeira 256, 259

## **R**

Redutase do nitrato 262, 276

## **S**

Saúde 10, 107, 115, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 147, 186, 212, 281, 283

Sementes 3, 10, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 88, 152, 173, 192, 197, 201, 203, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 262, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 281

Simbiose 23

Sistemas integrados 286

Steinernema parasita 23

Stimulate® 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172

## **U**

Umidade da madeira 256

## **V**

Variabilidade genética 18, 57

Vigor 63, 69, 77, 232, 233, 237, 238, 239, 240, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255

Vinhaça 175, 298, 300, 301, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309

## **Z**

Zona costeira amazônica 44

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-825-0



9 788572 478250