e-ISSN 1980-3982

COMUNICADO TÉCNICO

495

Colombo, PR
Novembro, 2023

Metodologia para a seleção de bactérias promotoras de crescimento com potencial de aumentar as taxas de enraizamento de *Pinus* spp

Krisle da Silva
Regina Caetano Quisen
Juliana Degenhardt-Goldbach
João Vitor Natalino
Julia Heduarda Giacomel Balbinotti
Isabella Blagiem de Campos
Leonardo Magalhães Cruz

Metodologia para a seleção de bactérias promotoras de crescimento com potencial de aumentar as taxas de enraizamento de *Pinus* spp[1]

[1] Krisle da Silva, engenheira-agrônoma, doutora em Microbiologia, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR; Regina Caetano Quisen, engenheira florestal, doutora em Agronomia, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR; Juliana Degenhardt-Goldbach, engenheira-agrônoma, doutora em Biotecnologia, pesquisadora da Embrapa Florestas, Colombo, PR; João Vitor Natalino, estudante de Agronomia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR; Julia Heduarda Giacomel Balbinotti, estudante de Biotecnologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR; Isabella Blagiem de Campos, bióloga, estudante de mestrado em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR; Leonardo Magalhães Cruz, engenheiro-agrônomo, doutor em Bioquímica, Professor Associado da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

O setor brasileiro de árvores plantadas é responsável por mais de 91% de toda a madeira produzida para fins industriais, sendo o Brasil um dos maiores produtores de celulose, papel e painéis de madeira no mundo (Indústria Brasileira de Árvores, 2023). Entre as árvores plantadas, se destacam duas culturas, o eucalipto e o pínus. *Pinus* spp. no Brasil possuem uma área plantada de aproximadamente 2,0 milhões de ha, o que corresponde a 19,4% da área total de florestas plantadas no País (Indústria Brasileira de Árvores, 2022). Tem sido usado para a fabricação de papeis que demandam maior resistência, como as embalagens, nas camadas internas do papel cartão, e também em papel jornal que utiliza a celulose de fibra longa. Esta fibra possui comprimento entre 2 mm e 5 mm, sendo obtida, principalmente, a partir de madeira de *Pinus taeda* cultivado no Sul do Brasil. (Indústria Brasileira de Árvores, 2017). Espécies do gênero *Pinus* foram introduzidas no Brasil, no século XIX, trazidas pelos imigrantes europeus, com finalidade ornamental (Dossa et al., 2002). Somente na década de 1950, o governo estimulou o investimento na indústria de papel e celulose. Em decorrência disso, os plantios de pínus passaram a ser implementados de forma intensa com objetivo de suprimento de matéria-prima em substituição à madeira de araucária (Dossa et al., 2002). Espécies desse gênero são usadas, principalmente, pelas indústrias de madeira, de serrados e laminados, de chapas, de resina e de celulose e papel. O pínus no Brasil é propagado em escala comercial pela via seminal e a produção de mudas por este processo acaba limitando a produção comercial, devido à variação genotípica, o que pode ser prejudicial à uniformidade e produtividade silvicultural (Aguiar et al., 2013). As espécies de *Pinus* são de difícil clonagem, pois apresentam

envelhecimento fisiológico, resultando em baixas taxas de enraizamento de estacas e miniestacas de indivíduos adultos selecionados (Degenhardt et al., 2020). Isto é, a dificuldade de produção clonal de *Pinus* spp. de material genético adulto, idade em que a seleção de árvores é mais efetiva (Ishibashi et al., 2022), é um problema para o setor florestal. Assim, o uso de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP) pode ser uma alternativa para incrementar as taxas de enraizamento de plantas selecionadas. BPCP são micro-organismos que vivem livremente no solo e, ou que colonizam a rizosfera (rizobactérias), que promovem efeitos benéficos na produtividade vegetal e que podem também reduzir os efeitos de estresse bióticos e abióticos em plantas (Ramakrishna et al., 2019). Para aumentar as taxas de enraizamento de pínus no presente trabalho, utilizou-se a metodologia de isolamento de bactérias da rizosfera de miniestacas com capacidade de enraizamento. Das bactérias isoladas, foi realizada uma seleção por meio da detecção in vitro do potencial para enraizamento, na presença da enzima 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC) deaminase (E.C. 3.5.99.7) e da capacidade de produção de compostos indólicos.

O ACC é o precursor imediato do etileno, assim, quando a planta sofre um estresse, são ativadas as enzimas ACC sintase e ACC oxidase que, rapidamente, convertem o ACC em etileno (Jha et al., 2021). Um elevado aumento na concentração de etileno tem implicações negativas para o crescimento das raízes e da parte aérea vegetal. Portanto, bactérias que possuam a enzima ACC deaminase podem atuar melhorando a formação de raízes. Além disso, a produção de fitormônios por bactérias pode ser um aliado no enraizamento. Um dos fitormônios mais estudados são as auxinas. A capacidade de sintetizar auxinas é largamente observada em micro-organismos do solo associados a plantas. Estimativas apontam que 80% das bactérias isoladas da rizosfera têm a capacidade de produzir auxinas reguladoras do crescimento vegetal (Oleńska et al., 2020). As auxinas proporcionam o aumento do comprimento da raiz e do número de pelos e raízes laterais. Essas alterações morfológicas se devem tanto pelo estímulo de resposta rápida ao aumento na elongação celular quanto pelo estímulo da divisão e diferenciação celular nas plantas (Dobbelaere et al., 2003). Uma das auxinas mais estudadas é o ácido indol acético (AIA), no entanto, a metodologia colorimétrica para quantificação de AIA avalia outras auxinas, assim, o termo composto indólico é o mais correto. Dessa forma, este trabalho buscou isolados na presença dessa enzima e aliadas à síntese de compostos indólicos, para selecionar bactérias capazes de melhorar as taxas de enraizamento de pínus por estaquia. Descreve, também, a metodologia para a seleção de novos insumos biológicos, a partir de bactérias, com potencial promoção de crescimento vegetal e enraizamento de miniestacas de pínus.

Isolamento

Uma estratégia para o isolamento de bactérias com potencial para o enraizamento de miniestacas de pínus é a coleta de solo rizosférico de materiais genéticos que apresentam naturalmente a formação de raízes. As raízes de miniestacas foram coletadas, e o solo superficial retirado. As raízes foram acondicionadas em sacos plásticos que foram batidos diversas vezes, para o desprendimento do solo rizosférico. As amostras do solo rizosférico foram, então, utilizadas para o isolamento de bactérias. Um esquema da diluição seriada para o isolamento é apresentado na Figura 1. Foram utilizados 10 g de solo rizosférico, diluídos em 90 mL de solução salina (0,85%) (diluição 10^{-1}). A solução foi, a seguir, agitada por 30 min (150 rpm). Após este período, uma alíquota de 1,0 mL, com auxílio de uma micropipeta, foi adicionada a um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de solução salina. O tubo foi agitado em vórtex e uma alíquota de 1,0 mL foi retirada e adicionada a um novo tubo. Este procedimento foi realizado sucessivamente até a diluição 10^{-6}. A seguir, uma alíquota de 0,1 mL das diluições 10^{-6}, 10^{-5} e 10^{-4} foram espalhadas em placas de Petri de 90 mm x 15 mm contendo meio DYG'S

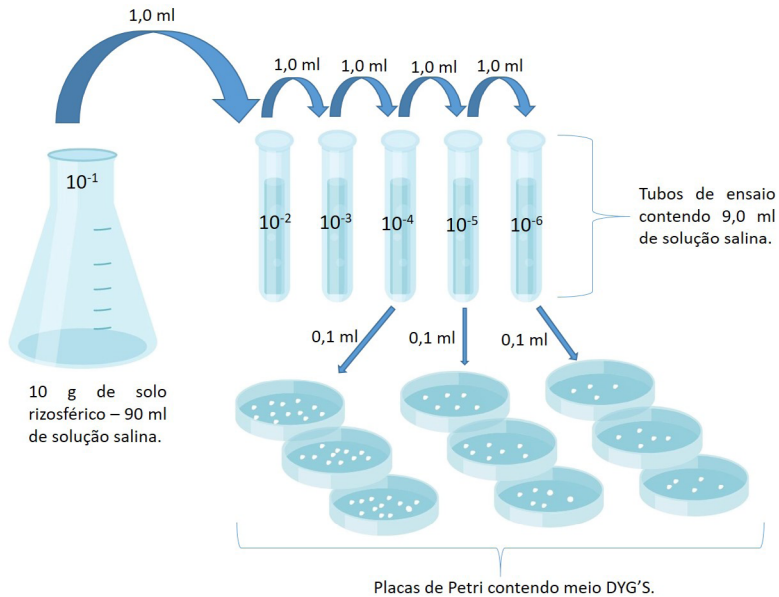

Figura 1. Diluição seriada para o isolamento de bactérias da rizosfera de plantas.

Ilustração: Krisle da Silva

sólido, com auxílio de uma alça de Drigalski e incubadas sob temperatura de 28 °C, durante o período de 7 a 12 dias. Esta etapa foi realizada em triplicatas. O meio DYG'S (Rodrigues Neto et al., 1986) foi utilizado por se tratar de um meio rico, no qual tem sido verificado o crescimento de diversos gêneros bacterianos.

Após o crescimento, as colônias mais distintas de cada placa foram selecionadas e repicadas sucessivamente até a obtenção dos isolados puros. Os isolados obtidos foram caracterizados, morfologicamente, de acordo com o descrito por Hungria e Silva (2011) e estocados em meio DYG'S sólido coberto com óleo mineral, em temperatura ambiente e em meio DYG'S líquido contendo 30% de glicerol sob temperatura de - 20 °C.

Soluções e meios utilizados no isolamento.

Solução Salina

Para o preparo da solução salina, foi utilizado 0,85 g de NaCl para cada 100 mL de solução. Estes foram distribuídos em frascos de Erlenmeyer (90 mL) e em tubos de ensaio (9,0 mL). Posteriormente, foram esterilizados em autoclave sob temperatura de 120 ºC, por 20 min.

Meio DYG'S **(Rodrigues Neto et al., 1986)**

O meio DYG´S é composto pelos seguintes reagentes (para 1.000 mL de meio):

2 g de glicose;

2 g de ácido málico;

1,5 g de peptona bacteriológica;

2 g de extrato de levedura;

0,5 g de K_2HPO_4;

0,5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$;

1,5 g de ácido glutâmico;

15 g de ágar bacteriológico.

É necessário ajustar o pH da solução para 6,5 com solução de KOH (10%). O volume deve ser completado para 1 L com água destilada e depois esterilizada em autoclave sob temperatura de 120 ºC, por 20 min.

Detecção da presença da enzima ACC deaminase.

A estratégia utilizada para selecionar bactérias com potencial de promover o enraizamento foi selecionar aquelas que apresentam a enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato deaminase (ACC deaminase). Bactérias que possuem a enzima ACC deaminase podem auxiliar a planta no processo de enraizamento (Glick, 2014). Uma planta sob estresse abiótico aumenta a produção de etileno (Figura 2) que, consequentemente, reduz a taxa de enraizamento. A enzima ACC deaminase atua no precursor do etileno, consequentemente reduzindo sua produção (Glick, 2014).

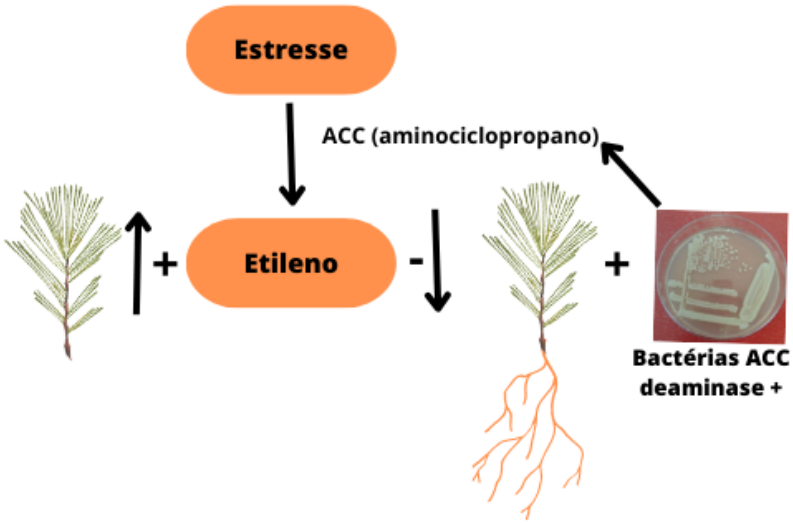

Figura 2. Esquema de ação de bactérias positivas para a ACC deaminase atuando no precursor de etileno e elevando as taxas de enraizamento de miniestacas.

Ilustração: Krisle da Silva

Para a determinação da presença da enzima ACC deaminase, foi preparado o meio mínimo de sais DF (Dworkin; Foster, 1958), com e sem nitrogênio. O meio DF com nitrogênio sofreu modificações com a adição de NH_4Cl substituindo o $(NH_4)_2SO_4$ e também adição de azul de bromotimol (Patil et al., 2016).

Soluções e meios utilizados para a detecção da enzima ACC deaminase.

Meio DF, sem fonte de N:

4 g de KH_2PO_4;

6 g de Na_2HPO_4;

0,2 g de $MgSO_4.7H_2O$;

2 g de glicose;

2 g de ácido málico;

2 g de ácido cítrico;

0,1 mL de $FeSO_4.7H_2O$

0,1 mL de micronutrientes

5 mL de azul de bromotimol

Ajustar o pH para 7,2, completar para 1.000 mL.

Meio DF, com fonte de N:

1,6 g de NH_4Cl;

4 g de KH_2PO_4;

6 g de Na_2HPO_4;

0,2 g de $MgSO_4.7H_2O$;

2 g de glicose;

2 g de ácido málico;

2 g de ácido cítrico;

0,1 mL de $FeSO_4.7H_2O$;

0,1 mL de micronutrientes;

5 mL de azul de bromotimol.

Ajustar o pH para 7,2, completar para 1.000 mL.

Em ambos os meios, adicionar 18 g de ágar bacteriológico de alta pureza.

Solução de $FeSO_4.7H_2O$

Dissolver 100 mg de $FeSO_4.7H_2O$ em 10 mL de água destilada. Estocar em geladeira.

Solução de micronutrientes

Para um volume final de 100 mL, foi adicionado:

10 mg de H_3BO_3;

11,19 mg de $MnSO_4.H_2O$;

124,6 mg de $ZnSO_4.7H_2O$;

78,22 mg de $CuSO_4.5H_2O$

10 mg MoO_3.

A solução deve ser estocada em geladeira.

Azul de bromotimol

Para o preparo de 100 mL, foi adicionado 0,5 g de azul de bromotimol e 1,12 g de KOH.

Os meios foram esterilizados em autoclave sob temperatura de 120 ^{O}C, por 20 min.

Solução de ácido carboxílico aminociclopropano (ACC)

Foi preparada uma solução 10 mL contendo 3,0 mmol de ácido carboxílico aminociclopropano (ACC) (Merck, 149101-M). Para isto, 3,033 mg de ACC foram diluídos em 10 mL de água destilada estéril. A solução foi esterilizada mediante filtragem em membrana de 0,22 µm (filtro de seringa). A seguir, a solução foi distribuída em microtubos (1,0 mL) e congeladas sob temperatura de - 20 ^{o}C até o uso. Desta solução, 100 µL foram adicionados em placas de Petri contendo o meio DF sem nitrogênio e espalhados com auxílio da alça de Drigalski, antes da inoculação das bactérias, para se obter no final uma concentração de 30 µmol de ACC por placa (Penrose; Glick, 2003).

As bactérias obtidas da rizosfera de pínus foram, então, repicadas nos meios DF com nitrogênio, no meio DF sem nitrogênio e no meio DF com adição de 30 µmol de ACC. As bactérias foram, então, incubadas por 48 horas sob temperatura de 28 ^{o}C. Foram consideradas positivas para a presença da enzima, as bactérias que apresentavam crescimento nos meios DF com ACC e com nitrato de amônio e sem crescimento, em meio DF sem fonte de nitrogênio.

Produção de compostos indólicos

Das bactérias positivas para a presença da enzima ACC deaminase, foi quantificada a produção de compostos indólicos. Para isto, as bactérias foram cultivadas no meio DYG'S, por 24 horas. Após o crescimento, a densidade óptica foi ajustada para 0,6-0,8 (630 nm), utilizando espectrofotômetro de bancada (Bio Photometer — Eppendorf)]. Alíquotas de 500 µL das soluções bacterianas foram inoculadas em 5 mL de meio DYG'S (sem triptofano ou suplementadas com 100 mg L^{-1} de triptofano). As bactérias foram incubadas no escuro, por 48 horas, sob temperatura de 28 °C, e por agitação constante de 150 rpm. O ensaio foi realizado em triplicatas. Após esse período, as culturas foram centrifugadas (10.000 rpm), durante 5 min; retirou-se 1,8 mL do sobrenadante o qual foi adicionado de 1,2 mL de reagente Salkowski (Sarwar; Kremer, 1995). A estirpe Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* foi utilizada como controle positivo. Esta mistura foi colocada no escuro durante 20 min, para o desenvolvimento da cor rosa, a qual é indicativa de produção de compostos indólicos. A intensidade da coloração foi determinada em espectrofotômetro Perkin Elmer UV/Vis Lambda 20 nm a 535 nm. A concentração de AIA foi estimada mediante uso de uma curva padrão preparada com 0 µg AIA mL^{-1}, 5 µg AIA mL^{-1}, 10 µg AIA mL^{-1}, 25 µg AIA mL^{-1}, 50 µg AIA mL^{-1} e 75 µg AIA mL^{-1} (Merck, cod. I3750).

Soluções e meios utilizados à produção de compostos indólicos

Solução de triptofano

Pesar 10 mg de triptofano e adicionar em 1 mL de água destilada estéril. Misturar bem até dissolver totalmente. Passar em filtro de seringa de 0,22 µm. Adicionar 50 µL para cada 5 mL de meio DYG'S.

Reagente de Salkowski (Sarwar; Kremer, 1995).

Solução de $FeCl_3.6H_2O$: adicionar 13,515 g em 100 mL de água destilada. Armazenar em geladeira. Adicionar 1 mL da solução de $FeCl_3.6H_2O$ em 50 mL de água destilada e 30 mL de H_2SO_4. Armazenar em geladeira.

Curva de ácido indol acético

Para fazer a solução estoque, pesar 5 mg de ácido indol-3-acético e diluir em 5 ml de acetona. Essa solução estará na concentração de 1.000 µg mL^{-1}. A partir dessa solução, preparar 20 mL a solução de 100 µg mL^{-1}. Para isto, pipetar 2 mL da solução de 1.000 µg mL^{-1} e adicionar 18 mL de meio DYG'S líquido. A partir da solução de 100 µg mL^{-1}, preparar o restante das concentrações na curva, pipetando as seguintes quantidades (Tabela 1):

Tabela 1. Preparo da curva padrão de ácido indol acético em meio DYG'S.

Solução de 100 µg mL^{-1} de AIA (mL)	Meio DYG'S líquido (mL)	Concentração de AIA (µg mL^{-1})
7,5	2,5	75
5,0	5,0	50
2,5	7,5	25
1,0	9,0	10
0,5	9,5	5

Resultados

Foram obtidos 151 isolados da rizosfera de pínus. Estes isolados foram caracterizados e estocados na Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Florestas. Destes, doze isolados foram positivos para o crescimento em meio DF com adição de ACC, indicando que possuem a enzima ACC deaminase. Os isolados positivos para ACC deaminase foram CNPF 453, CNPF 462, CNPF 429, CNPF 468, CNPF 482, CNPF 469, CNPF 463, CNPF 373, CNPF 449, CNPF 450, CNPF 448 e CNPF 457. Na Figura 3, é apresentada uma placa contendo uma bactéria ACC deaminase positiva.

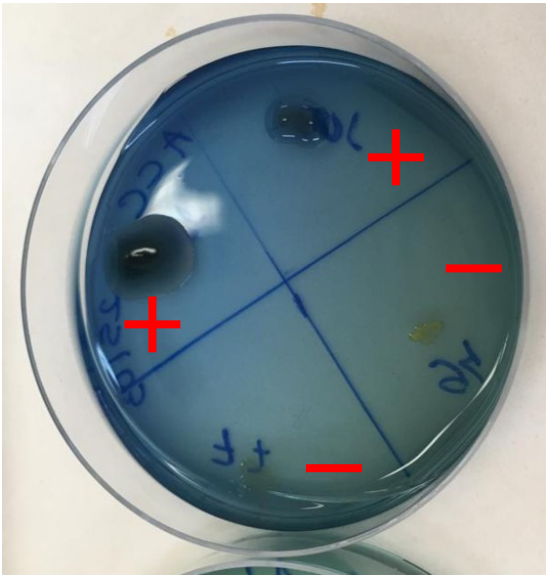

Foto: Krisle da Silva

Figura 3. Bactéria positiva para a presença da enzima ACC deaminase. O sinal + indica positivo para ACC deaminase e o sinal – indica negativo para ACC deaminase.

Quanto à produção de compostos indólicos, das doze bactérias avaliadas, nove foram positivas. A maioria das bactérias sintetizou compostos indólicos, com e sem a suplementação de triptofano. Portanto, estes isolados foram selecionados para os testes na promoção de enraizamento de pínus, por apresentarem características que podem aumentar as taxas de enraizamento.

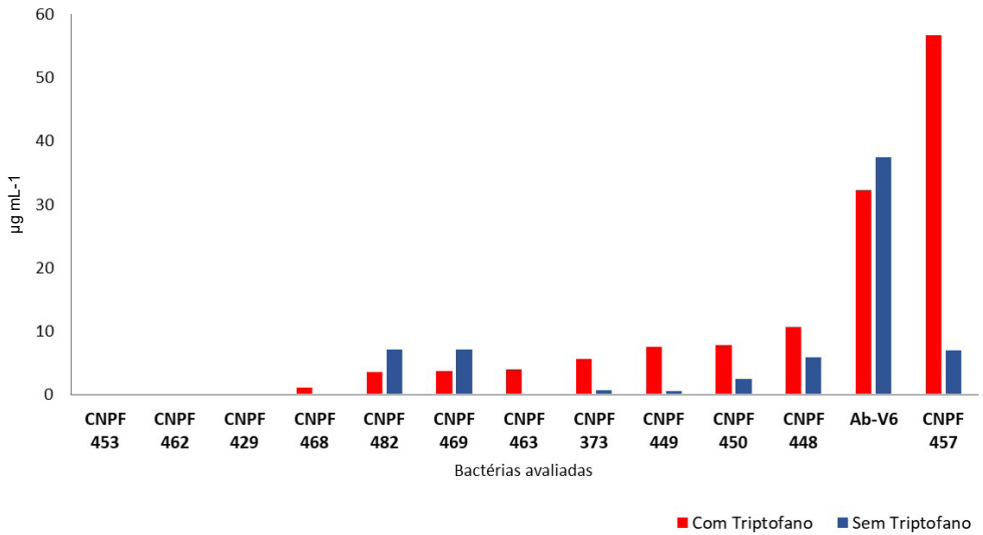

Figura 4. Compostos indólicos produzidos por bactérias isoladas de *Pinus taeda*, ACC deaminase positivas.

Conclusões

As bactérias isoladas têm potencial para a promoção de crescimento vegetal e enraizamento. De 151 bactérias, doze foram selecionadas para os testes de inoculação em miniestacas de pínus. A metodologia mostrou-se viável para selecionar isolados.

Esse trabalho apresenta alinhamento às metas dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) da Agenda 2030 da ONU (especialmente os ODS 12 e 15), pois é resultado do uso genético de bactérias promotoras de crescimento, na forma de insumos biológicos para o desenvolvimento de mudas de pínus, buscando uma produção florestal sustentável e o uso eficiente dos recursos naturais.

Referências

AGUIAR, V. A.; SOUSA, V. A.; SHIMIZU, J. Y. Espécies de pínus mais plantadas no Brasil. **Revista Madeira**, n. 135, 2013.

DEGENHARDT, J.; QUISEN, R. C.; ALCÂNTARA, G. B. de. **Micropropagação de *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* Barr. & Golf**. Colombo: Embrapa Florestas,

2020. 9 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 447). Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/214568/1/CT-447-1778-final2. pdf.

DOBBELAERE, S.; VANDELEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, n. 22, p. 107-149, 2003. DOI: https://doi.org/10.1080/713610853.

DOSSA, D.; SILVA, H. D.; BELLOTE, A. F. J.; RODIGHERI, H. R. **Produção e rentabilidade de pínus em empresas Florestais**. Colombo: Embrapa Florestas, 2002. 6 p. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 82). Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/307448/1/comtec82.pdf.

DWORKIN, M.; FOSTER, J. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. **Journal of Bacteriology**, n. 75, p. 592-601, 1958. DOI: https://doi.org/10.1128/jb.75.5.592-603.1958.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, n. 169, p. 30-39, 2014. DOI: https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009.

HUNGRIA, M.; SILVA, K. **Manual de curadores de germoplasma**: microorganismos: rizóbios e bactérias promotoras do crescimento vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011. 21 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 333; Embrapa Soja. Documentos, 332). Disponível em: https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/933488/1/doc333332.pdf.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório anual 2017. Brasília, DF, [2017]. 80 p. Disponível em: https://iba.org/images/shared/Biblioteca/IBA_RelatorioAnual2017.pdf. Acesso em: 27 nov. 2023.

INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES. Relatório anual 2022. Brasília, DF, [2022]. 96 p. Disponível em: https://www.iba.org/datafiles/publicacoes/relatorios/relatorio-anual-iba2022-compactado.pdf. Acesso em: 27 nov. 2023.

ISHIBASHI, V.; FLÔRES JUNIOR, P. C.; MARTINEZ, D. T.; COELHO, A. S. G.; HIGA, A. R. Estratégias de seleção genética para silvicultura clonal em *Pinus caribaea* var. *hondurensis*. **Scientia Forestalis**, n. 50, e3858, 2022. DOI: https://doi.org/10.18671/scifor.v50.30.

JHA, C. K.; SHARMA, P.; SHUKLA, A.; PARMAR, P.; PATEL, R.; GOSWAMI, D.; SARF, M. Microbial enzyme, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase: an elixir for plant under stress. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n. 115, p. 101664, 2021.

OLÉNSKA, E.; MALEK, W.; WÓJCIK, M.; SWIECICKA, I.; THIJS, S.; VANGRONSVELD, J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of the Total Environment**, n. 743 p. 140682, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682.

PATIL, C.; SURYAWANSHI, R.; KOLI, S.; PATIL, S. Improved method for effective screening of ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, n.131, p. 102-104, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.009.

PENROSE, D. M.; GLICK, B. R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**, n. 118, p.10-15, 2003. DOI: https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x.

RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, K. Plant growth promoting bacteria in agriculture: two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, n. 138, p. 10-18, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.019.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JUNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, v. 12, n. 1-2, p. 16, 1986.

SARWAR, M.; KREMER, R. J. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. **Letters in Applied Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 282-285, 1995. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1995.tb00446.x.

Embrapa Florestas

Estrada da Ribeira, Km 111, Guaraituba,
Caixa Postal 319
CEP 83411-000 - Colombo, PR
Fone: (41) 3675-5600
www.embrapa.br/florestas
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
Publicação digital (2023): PDF

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Florestas

Presidente
Patrícia Póvoa de Mattos

Vice-Presidente
José Elidney Pinto Júnior

Secretária-executiva
Elisabete Marques Oaida

Membros
Annete Bonnet
Cristiane Aparecida Fioravante Reis
Elenice Fritzsons
Guilherme Schnell e Schühli
Marilice Cordeiro Garrastazú
Sandra Bos Mikich
Susete do Rocio Chiarello Penteado
Valderês Aparecida de Sousa

Supervisão editorial/Revisão de texto
José Elidney Pinto Júnior

Normalização bibliográfica
Francisca Rasche (CRB-9/1204)

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Celso Alexandre de Oliveira Eduardo

Foto da capa
Krisle da Silva

CGPE 018372