

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Ailton Ferreira de Paula

**Identificação taxonômica, potencial agrícola e
biotecnológico de bactérias endofíticas e rizosféricas
associadas a *Paspalum atratum* e *P. notatum***

São Carlos
2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR

Ailton Ferreira de Paula

Identificação taxonômica, potencial agrícola e biotecnológico de bactérias endofíticas e rizosféricas associadas a *Paspalum atratum* e *P. notatum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de doutor em Ciências com ênfase em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
Co-Orientação: Prof.^a Dra. Alessandra Pereira Fávero

São Carlos
2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Ailton Ferreira de Paula, realizada em 02/08/2019:

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
UFSCar

Profa. Dra. Alessandra Pereira Fávero
UFSCar

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa
UFSCar

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha
UFSCar

Prof. Dr. Marcelo Mattos Cavallari
EMBRAPA

Prof. Dr. Paulo Vitor Marques Simas
UNESP

Agradecimentos

Agradeço:

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pela orientação no desenvolvimento desse trabalho.

A Prof. Dr^a. Alessandra Pereira Fávero pela coorientação e dedicação em resolver os problemas que surgiam durante o desenvolvimento do trabalho.

A Dr^a. Bianca Baccili Zanotto Vigna pela supervisão quanto à identificação taxonômica dos isolados bacterianos.

Ao Dr. Alberto Carlos de Campos Bernardi pela supervisão quanto à identificação taxonômica dos isolados bacterianos.

Ao Emar Jose Fagundes, Gilberto Cesar Agostinho, Natal Silvestre, Dr. Wilson Malagó Jr. e a Dr^a Flavia Aline Bressani Donatoni pela ajuda na utilização dos laboratórios e casa de vegetação.

A CAPES e FAPESP pelo financiamento.

Ao programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos por permitir essa valiosa experiência.

Aos colegas de pesquisa: Amanda Carolina Prado de Moraes, Felipe de Paula Nogueira Cruz, Isabela dos Santos Begnami, Julia Ruiz, Lucas de Abreu Silveira, Naiana Barbosa Dinato, Natalia Daniel, Paulo Henrique Marques de Andrade, Tiago Maretti Gonçalves e Veronica Carvalho Ribeiro.

À Igreja Adventista da Promessa (IAP) de São Carlos pelo carinho, amor, e por tudo que tem feito por mim durante esses seis anos que passamos juntos. Pelos momentos de descontração, e principalmente pelos momentos de comunhão que passamos juntos adorando a Deus.

Aos meus pais Luiz Gregório de Paula e Zilda Ferreira de Paula pelo apoio em todas as fases da minha vida e a quem eu devo a minha eterna gratidão.

Identificação taxonômica, potencial agrícola e biotecnológico de bactérias endofíticas e rizosféricas associadas a *Paspalum atratum* e *P. notatum*

RESUMO

O gênero *Paspalum* pertence à família *Poaceae* e possui várias espécies nativas do Brasil. O Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste possui cerca de 450 acessos de 50 espécies. Dentre os acessos conservados, dois foram selecionados para este estudo: BGP 26 de *P. notatum* (potencial como planta de cobertura de solo) e BGP 308 de *P. atratum* (potencial como planta forrageira). Este trabalho teve por objetivo (1) estudar a comunidade bacteriana cultivável endofítica e rizosférica de *P. atratum* e *P. notatum*, visando identificar *in vitro* o potencial desses micro-organismos para a fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato (SF), produção de ácido indolacético (AIA) e controle biológico por meio de antagonismo. (2) Selecionar os melhores isolados para o teste de promoção de crescimento vegetal *in vivo* no acesso BGP 308, com tratamentos em diferentes fontes de fosfato, sem correção de nitrogênio no solo. Quanto aos testes *in vitro*, a FBN foi testada em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio, a SF foi testada em meio ágar nutriente suplementado com fosfato insolúvel e o AIA foi testado o meio Caldo Triptona de Soja 10% + L-triptofano. No teste de antagonismo, esporos de *Bipolaris* sp. foram estriados em placa contendo meio *Potato Dextrose Agar* e o isolado bacteriano foi inoculado sobre a estria. Na identificação molecular foi utilizado o gene 16S e as sequências foram comparadas no software *Classifier*. Foram selecionados oito isolados com potencial para a FBN, SF e AIA e avaliados *in vivo* em BGP 308. O solo foi preparado com três fontes diferentes de fosfato mais o controle sem fosfato. As plantas tiveram os descritores morfológicos medidos e a matéria seca foi submetida ao espectrômetro de infravermelho próximo (NIRS) e análise de micro e macronutrientes, para determinação química e nutritiva de cada tratamento. As análises de variância, Teste t e a Análise de Componentes Principais foram geradas no software *Statistical Analysis System*. Foram purificados 213 isolados bacterianos (97 de BGP 26 e 118 de BGP 308). Um total de 54 isolados apresentou potencial para FBN, SF e AIA. Esses isolados foram submetidos à identificação molecular e ao teste de antagonismo. Foram encontrados sete gêneros bacterianos: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*,

Pseudomonas e *Rhizobium*. O isolado 50 (*Pseudomonas* spp.) e 53 (*Bacillus* spp.) apresentaram atividade antagonista contra *Bipolaris* sp.. No teste *in vivo*, os resultados mostraram que os isolados mais promissoras foram 103 (*Enterobacter* spp.), 110 (*Enterobacter* spp.) e 458 (*Pseudomonas* spp.). Com este trabalho, foi possível conhecer parte da comunidade bacteriana cultivável para os dois acessos em questão e obter novos isolados com potencial para a promoção de crescimento vegetal.

Palavras-chave: Solubilização de fosfato. Fixação biológica de nitrogênio. Ácido indol-acético.

Taxonomic identification, and agricultural biotechnological potential of endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and *P. notatum*

Abstract

The genus *Paspalum* belongs to the family Poaceae and has several species native to Brazil. The Germplasm Bank of *Paspalum* of Embrapa Pecuária Sudeste has about 450 accessions of 50 species. Among the conserved accessions, two were chosen for this study: BGP 26 of *P. notatum* (potential as a lawn) and BGP 308 of *P. atratum* (potential as a forage). To date, both endophytic and rhizospheric microbiological diversity for these two accessions were unknown, as well as the potential of these bacteria for promoting the plant growth (BPPG). The objective of this study was to evaluate the endophytic and rhizospheric bacterial community of *P. atratum* and *P. notatum*, in order to (1) identify *in vitro* the potential of these microorganisms in the promotion of plant growth by biological nitrogen fixation (BNF), phosphate solubilization (FS), indol-acetic acid (IAA) production and antagonistic ability. (2) Select the best isolates for the *in vivo* plant growth promotion test in the BGP 308 accession, with different phosphate sources treatments and no add of nitrogen in the soil. As for the *in vitro* tests, the BNF was tested in a nitrogen-free semi-solid culture medium, the FS was tested in nutrient agar medium supplemented with insoluble phosphate and the IAA was tested in the medium 10% Tryptin + L-tryptophan. In the antagonism test, *Bipolaris* sp. spores were streaked onto Potato Dextrose Agar agar medium and the bacterial isolate was inoculated onto the stria. In the molecular identification the 16S gene was used and the sequences were compared in the Classifier software. Eight isolates with potential for BNF, FS and IAA were *in vivo* evaluated in BGP 308. The soil was prepared with three sources of phosphate plus phosphate control without phosphate. The plants had the morphological descriptors measured and the dry matter was submitted to the near infrared spectrometer (NIRS) for chemical determination of each treatment. Analysis of variance, t-Test and Principal Component Analysis were generated in the Statistical Analysis System software. Two hundred and thirteen bacterial isolates (97 BGP 26 and 118 BGP 308) were purified. The total of 54 isolates presented potential for BFN, FS and IAA. These isolates were submitted to molecular identification and the antagonism test. Seven bacterial genera were found: *Bacillus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* and *Rhizobium*. The isolates 50

(*Pseudomonas* spp.) and 53 (*Bacillus* spp.) presented antagonistic activity against *Bipolaris* sp.. In the *in vivo* test the results showed BPPG, the most promising isolates were 103 (*Enterobacter* spp.), 110 (*Enterobacter* spp.) and 458 (*Pseudomonas* spp.). With this work, it was possible to know the bacterial community for the two accessions in question and to obtain new isolates with potential for Plant growth-promoting.

Keywords: Phosphate solubilization. Biological nitrogen fixation. Indole-acetic acid.

SUMÁRIO

Resumo	v
SUMÁRIO.....	ix
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Abreviações e Siglas.....	xvi
1. Introdução.....	19
2. Revisão Bibliográfica	24
2.1 Impactos ambientais envolvidos na produção e uso de fertilizantes	24
2.2 Eficiência do uso dos nutrientes	25
2.3 Importância do nitrogênio e fósforo	26
2.4 O ácido indol-acético na planta	26
2.5 Antagonismo e controle biológico.....	27
2.3 Micro-organismos e a promoção de crescimento vegetal	28
2.1 O gênero <i>Paspalum</i>	29
3. Objetivos.....	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4. Material e métodos	32
4.1 Identificação taxonômica e caracterização de bactérias endofíticas e rizosféricas cultiváveis associadas a <i>Paspalum atratum</i> e <i>P. notatum</i>	32
4.1.1 Isolamento de bactérias endofíticas e rizosféricas.....	32
4.1.2 Análise de solo	33
4.1.3 Teste de fixação biológica de nitrogênio <i>in vitro</i>	33
4.1.4 Teste de solubilização de fosfato <i>in vitro</i>	34
4.1.5 Teste de produção de ácido indol-acético <i>in vitro</i>	34
4.1.6 Teste de antagonismo	34
4.1.7 Identificação taxonômica.....	35
4.2 Promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i> por meio de bactérias endofíticas e rizosféricas de <i>Paspalum atratum</i> (BGP 308).....	36
4.2.1 Seleção de isolados bacterianos para o teste <i>in vivo</i>	36
4.2.2 Preparo do solo e tratamentos.....	37
4.2.3 Germinação de semente, transplante de plântulas e inoculações.	37

4.2.4	Preparação do inóculo e inoculação	38
4.2.5	Análise morfológica	38
4.2.6	Análise nutritiva e mineral	39
4.2.7	Análise estatística	39
5.	Resultados e Discussão.....	40
5.1	Diversidade genética, potencial agrícola e biotecnológico de bactérias endofíticas e rizosféricas cultiváveis associadas a <i>Paspalum atratum</i> e <i>P. notatum</i>	40
5.1.1	Isolamento de bactérias endofíticas e rizosféricas.....	40
5.1.2	Análise de solo	40
5.1.3	Teste de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> e identificação taxonômica	42
5.1.4	Teste de fixação biológica de nitrogênio <i>in vitro</i>	47
5.1.5	Teste de solubilização de fosfato <i>in vitro</i>	48
5.1.6	Teste de produção de ácido indol-acético <i>in vitro</i>	49
5.1.7	Teste de antagonismo	50
5.2	Promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i> por meio de bactérias endofíticas e rizosféricas de <i>Paspalum atratum</i>	51
5.2.1	Germinação de semente.....	51
5.2.2	Análise de componentes principais e teste de médias	52
5.2.3	Análise morfológica do peso seco da raiz	62
5.2.4	Análise mineral de fosfato	64
5.2.5	Análise nutritiva de proteína bruta	66
5.2.6	Análise nutritiva de digestibilidade <i>in vitro</i>	68
6.	Conclusões.....	71
7.	Referências Bibliográficas.....	72
8.	Anexos.....	84
8.1	Anexo 1 - Meio Nfb semi-sólido.....	84
8.2	Anexo 2 - Solução de micronutrientes para o meio Nfb	84
8.3	Anexo 3 - Solução de azul de bromotimol	84
8.4	Anexo 4 - Solução de vitaminas do meio Nfb.....	85
8.5	Anexo 5 - Meio Fosfato.....	85
8.6	Anexo 6 - Meio TSB + L-triptofano.....	85
8.7	Anexo 7 - Reagente de Salkovisky	85
8.8	Anexo 8 - A porcentagem de massa seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), material mineral (MM), lignina (LIG) e	

digestibilidade <i>in vitro</i> (DIV) referentes aos 36 tratamentos relacionados a promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i>	86
8.9 Anexo 9 - Teores minerais de Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Fósforo (P), Potássio (K), Enxofre (S), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Zinco (Zn) e porcentagem de nitrogênio (N) para os 36 tratamentos envolvidos no trabalho.	87

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Acessos utilizados. BGP 26 (BRA 006301/ VGzLeBo 9684) de *Paspalum notatum* Flügge (A) e BGP 308 (BRA 030078/ VRcMmSv 14525) de *Paspalum atratum* Swallen (B). Fonte: Autor. 32
- FIGURA 2.** Dendrograma dos isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de BGP 26 de *Paspalum notatum*, com base no gene 16S. (A) Proteobacteria e (B) Firmicutes. O número que antecede a identificação do micro-organismo se refere ao código de identificação dos isolados utilizado neste trabalho ou ao código de identificação de micro-organismo do GenBank utilizado para comparação. Fonte: Autor. 45
- FIGURA 3.** Dendrograma dos isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de BGP 308 de *Paspalum atratum*, com base no gene 16S. (A) Proteobacteria, (B) Firmicutes e (C) Actinobacteria. O número que antecede a identificação do micro-organismo se refere ao código de identificação dos isolados utilizado neste trabalho ou ao código de identificação de micro-organismo do GenBank utilizado para comparação. Fonte: Autor. 46
- FIGURA 4.** Teste de antagonismo contra o fungo *Bipolaris* sp. fitopatogênico de *Paspalum*. A) Placa controle, B) placa aberta, com circunferência mostrando o halo de inibição e, C) placa fechada, mostrando a identificação dos isolados bacterianos com ação antagonista. Fonte: Autor. 50
- FIGURA 5.** Gráfico biplot obtido por meio da análise de componentes principais considerando os seis descritores morfológicos para os componentes 1 e 2. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano. Fonte: Autor. 56
- Figura 6.** Tratamento com isolado 110 *Enterobacter* spp., comparativo de promoção de crescimento entre o tratamento Controle Fosfato Solúvel (CFSO) e o tratamento Bacteriano Fosfato Solúvel 110 (BFSO110). Fonte: Autor. 57
- FIGURA 7.** Tratamento com isolado 109 *Bacillus* spp., comparativo de promoção de crescimento entre o tratamento Controle Sem Fosfato (CSFO) e o tratamento Bacteriano Sem Fosfato 109 (BSFO109). Fonte: Autor. 58
- FIGURA 8.** Tratamento com isolado 110 *Enterobacter* spp., comparativo de promoção de crescimento entre o tratamento Controle Fosfato Cristalino (CFCR) e o tratamento Bacteriano Fosfato Cristalino 109 (BFCR109). Fonte: Autor. 60
- FIGURA 9.** Tratamento com isolado 110 *Enterobacter* spp., comparativo de promoção de crescimento entre o tratamento Controle Fosfato Sedimentar (CFSE) e o tratamento Bacteriano Fosfato Sedimentar 110 (BFSE110). Fonte: Autor. 61
- Figura 10.** Comparativo de peso da raiz entre os tratamentos. Os controles estão em cor sólida. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano. Fonte: Autor. 62
- FIGURA 11.** Comparativo de teor de fósforo na matéria seca entre os tratamentos. Os controles estão em cor sólida. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos

Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano. Fonte: Autor..... 65

FIGURA 12. Comparativo de teor de proteína bruta na matéria seca entre os tratamentos. Os controles estão em cor sólida. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano. Fonte: Autor..... 67

FIGURA 13. Comparativo de teor de digestibilidade *in vitro* na matéria seca entre os tratamentos. Os controles estão em cor sólida. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano. Fonte: Autor..... 69

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1.** Resultados de análises químicas e física de solo dos acessos BGP 26 de *Paspalum notatum* e BGP 308 de *P. atratum*..... 40
- TABELA 2.** Identificação molecular dos 54 isolados bacterianos que demonstraram resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato (SF) e produção de ácido indol-acético (AIA). No total foram avaliados 213 isolados endofíticos e rizosféricos de BGP 26 de *Paspalum notatum* e BGP 308 de *P. atratum*. 42
- TABELA 3.** Caracterização quanto ao gênero bacteriano, acesso vegetal, solo-segundo de planta coletado e período do isolamento dos 54 isolados de BGP 26 de *Paspalum notatum* e BGP 308 de *Paspalum atratum* que se mostraram positivos para a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de ácido indol-acético. Os traços indicam que não houve micro-organismo selecionado para determinada condição. 44
- TABELA 4.** Análise de componentes principais dos descritores morfológicos avaliados. Autovalores, diferença entre os componentes, proporção e proporção acumulada estão descritos. 52
- TABELA 5.** Contribuição dos descritores morfológicos para a análise de componentes principais. As colunas Componente 1² e Componente 2² indicam a importância do descritor para o componente principal 1 e 2 respectivamente em porcentagem. 53
- TABELA 6.** Análise dos 36 tratamentos do teste *in vivo* por teste t, considerando o descritor peso seco aéreo. Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade pelo teste de t. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano. 54
- TABELA 7.** Tratamentos com fosfato solúvel. Descritores utilizados na análise de componentes principais. Peso seco aéreo (PSA), fósforo (P), proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* (DIV), comprimento de folha (CF), número de folha (NF), número de perfilhos (NP) e peso seco da raiz (PSR). As siglas FSO se referem aos tratamentos Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano..... 55
- TABELA 8.** Tratamentos sem fosfato. Descritores utilizados na análise de componentes principais. Peso seco aéreo (PSA), fósforo (P), proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* (DIV), comprimento de folha (CF), número de folha (NF), número de perfilhos (NP) e peso seco da raiz (PSR). As siglas SFO e FSO se referem aos tratamentos sem fosfato e fosfato solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano..... 58
- TABELA 9.** Tratamentos com fosfato cristalino. Descritores utilizados na análise de componentes principais. Peso seco aéreo (PSA), fósforo (P), proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* (DIV), comprimento de folha (CF), número de folha (NF), número de perfilhos (NP) e peso seco da raiz (PSR). As siglas FCR e FSO se referem aos tratamentos fosfato cristalino e fosfato solúvel. O número que sucede o tratamento se

refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano..... 59

TABELA 10. Tratamentos com fosfato sedimentar. Descritores utilizados na análise de componentes principais. Peso seco aéreo (PSA), fósforo (P), proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* (DIV), comprimento de folha (CF), número de folha (NF), número de perfilhos (NP) e peso seco da raiz (PSR). As siglas FSE e SFO se referem aos tratamentos fosfato sedimentar e fosfato solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano..... 61

TABELA 11. Relação peso seco da raiz e ácido indol-acético. A sigla PSR significa peso seco da raiz. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel, respectivamente. 63

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AIA – Ácido indol-acético

BAG *Paspalum* - Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum*

BGP - Banco de Germoplasma de *Paspalum*

BPCV - Bactéria Promotora de Crescimento Vegetal

CF - Comprimento da Folha

CTC - Capacidade de Troca de Cátions

DIV - Digestibilidade *In Vitro*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FDA – Fibra em Detergente Ácido

FBN - Fixação biológica de nitrogênio

FCR - Fosfato Cristalino

FSE - Fosfato Sedimentar

FSO - Fosfato Solúvel

ICP-OES - Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente

ISF - Índice de Solubilização de Fosfato

LaMiB – Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas

LIG - Lignina

MS – Matéria Seca

MM – Matéria Mineral

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

NF - Número de Folhas

NIRS - Espectroscopia no Infravermelho Próximo

NP - Número de Perfilhos

NPK - Nitrogênio, Fósforo e Potássio

PB – Proteína Bruta

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PDA - *Potato Dextrose Agar*

PRNT - Poder Relativo de Neutralização Total

PSA - Peso Seco Aéreo

PSR - Peso Seco de Raiz

SF - Solubilização de fosfato

SFO - Sem Fosfato

TSA - *Trypticase soy agar*

TSB - *Tryptic Soy Broth*

UFSCar - Universidade Federal de São Carlos

USDA - United States Department of Agriculture

1. INTRODUÇÃO

Cada dia mais aumenta a necessidade de utilizar agroquímicos na agricultura e como consequência, crescem os impactos ambientais (GERHARDSON, 2002). O fertilizante NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) é um dos agroquímicos mais utilizados na agricultura e sua produção envolve vários setores econômicos (KULAIIF, 2009; KULAIIF; FERNANDES, 2010). Grandes impactos ambientais são gerados durante a produção deste fertilizante, como desmatamentos, erosão, assoreamento, chuvas ácidas e poluição das águas (DIAS; LAJOLO, 2010; STRAATEN, 2010). Uma vez que na produção do NPK são utilizadas fontes não renováveis de matéria-prima, como gás natural e rochas potássicas, a futura escassez deste tipo de matéria prima poderá gerar aumento nos preços dos fertilizantes (DIAS; LAJOLO, 2010; STRAATEN, 2010). Assim, devido à importância ecológica e econômica, se faz necessário desenvolver métodos que visem obter aumento na eficiência do uso dos nutrientes.

Os micronutrientes (boro, cloro, cobre, ferro, manganês, sódio, molibdênio, níquel e zinco) e macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) são os nutrientes essenciais às plantas e sua falta pode causar grandes alterações no crescimento vegetal (MALAKOUTI, 2008; TAIZ, L.; ZEIGER, 2013).

O nitrogênio é um fator limitante para a produtividade agrícola, pois é constituinte de componentes vegetal celular, como aminoácidos, proteínas e ácidos nucleicos (TAIZ, L.; ZEIGER, 2013). O gás nitrogênio (N_2) é abundante na atmosfera de forma estável, devido à presença de uma forte ligação tríplice entre as duas moléculas de N, e a maioria dos organismos, animais e vegetais, não consegue utilizar essa forma de nitrogênio (BERNHARD, 2010). É necessário que essa ligação tríplice seja rompida e o nitrogênio esteja na forma de íons amônio. Algumas espécies de bactérias são capazes de realizar essa reação de redução do N_2 a NH_4^+ por meio da fixação biológica de nitrogênio – FBN (BALDANI et al., 2014; BERNHARD, 2010). Isso é possível porque esses microorganismos possuem a enzima nitrogenase, caracterizada como um complexo enzimático, responsável pela quebra da ligação tríplice usando energia celular na forma de adenosina trifosfato (BALDANI et al., 2014).

O fósforo é outro fator limitante para a produtividade agrícola, tendo importância para respiração e fotossíntese; além disso, participa na constituição de fosfoproteínas, fosfolipídeos e ácidos nucleicos (GYANESHWAR et al., 2002; TAIZ, L.; ZEIGER, 2013). Na natureza, as rochas fosfáticas representam fontes de fósforo inacessíveis as plantas, assim como o próprio fósforo solúvel que passou por processo de adsorção e permanece no solo inutilizado (AHEMAD; KIBRET, 2014; CHAVES; CHAVES; MENDES, 2007; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; STRAATEN, 2010).

As rochas fosfáticas podem ser utilizadas como matéria-prima na produção de agroquímicos fosfatados, dentre estas rochas, a de fosfato sedimentar de Arad é importada de Israel e apresenta 33,0% P_2O_5 (Pentóxido de Fósforo), uma outra rocha fosfática é a de fosfato cristalino de Cajati/SP, que apresenta 5,0% P_2O_5 (FONTOURA et al., 2010; GUEDES et al., 2009; LUZ; LINS, 2005). Bactérias solubilizadoras de fosfato conseguem transformar este fósforo inacessível em uma forma acessível às plantas (STRAATEN, 2010), por meio de mecanismos como quelação, troca iônica e produção de ácido orgânico (AFZAL et al., 2019; KHAN et al., 2009).

A fase de estabelecimento da planta avalia a capacidade de colonização, de competir e de resistir a pragas e doenças. Sendo de grande importância que o solo esteja bem fertilizado, devido ao tamanho reduzido do sistema radicular (RAMOS, 2002).

O ácido indol-acético é um hormônio que está envolvido na promoção de crescimento vegetal. Tem importante função no geotropismo e fototropismo, desenvolvimento do fruto, na abscisão foliar, divisão celular e desenvolvimento da raiz (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017; TAIZ, L.; ZEIGER, 2013). Conseqüentemente, com o aumento do crescimento da raiz, ocorre também o aumento da superfície de contato entre a raiz e solo, contribuindo com o estabelecimento da planta.

Espécies diferentes de plantas reagem de formas diferentes a presença de AIA e existe uma concentração ótima deste hormônio para que seja realizada a promoção de crescimento vegetal (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017). A ausência desse hormônio nos tecidos de uma planta hospedeira pode ser suprida por bactérias produtoras de AIA que podem aumentar a concentração e elevar o estado para ótimo, mas, se a planta já está no estado ótimo, o aumento na concentração deste hormônio pode inibir o crescimento vegetal (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017).

Pragas e doenças na cultura agrícola é outro fator limitante para a produtividade. Em 2018, o governo brasileiro liberou 450 novas licenças de agrotóxicos, já em 2019, nos cinco primeiros meses, 201 novos produtos já foram disponibilizados (COELHO et al., 2019). Em vez de aumentar a produtividade o uso extensivo de agroquímicos para controlar pragas e doenças podem afetar a saúde humana, o meio ambiente e a economia. Pois problemas à saúde podem ser gerados com contaminação de alimentos e corpos de águas. Organismos vivos expostos aos agroquímicos podem ser selecionados ou eliminados, ocasionando alteração na biodiversidade afetada. A economia pode ser afetada devido a diminuição das exportações, por parte de países importadores que exigem uma agricultura mais ecológica e sustentável, livre dos agroquímicos (COELHO et al., 2019).

A antibiose é a interação entre organismos na qual um ou mais metabólitos produzidos por um organismo tem efeito danoso sobre o outro. Quanto a métodos alternativos frente aos agroquímicos, a antibiose é um dos mecanismos utilizados para o controle biológico de pragas e doenças (BARRATT et al., 2018; HEYDARI; PESSARAKLI, 2010; NEGA, 2014). O fungo *Bipolaris* causa a mancha foliar e reduz a área de fotossíntese, comprometendo a planta (MARCOS et al., 2015). Em 2004, este micro-organismo foi relatado infectando à cultivar Pojuca de *Paspalum atratum* (ANJOS et al., 2004) e atualmente, pode ser observado no BAG *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste, em acessos de *Paspalum atratum*. Micro-organismos com atividade antagonista ao *Bipolaris* podem ser a solução para o ataque deste fitopatógeno aos acessos e culturas do gênero *Paspalum*.

O *Paspalum* é um importante gênero da família Poaceae. Pesquisas desenvolvidas na Embrapa Pecuária Sudeste vêm avaliando este gênero para usos como forragem (PROVAZI et al., 2008) e gramado (SOUZA et al., 2016), visando tolerância a sombreamento (BARRO et al., 2012), tolerância a *stress* hídrico (PEZZOPANE et al., 2017) e a Cigarrinha-das-pastagens (GUSMÃO et al., 2016). Para a obtenção de novos híbridos, estudos com criopreservação de grãos de pólen buscam solucionar o problema da assincronia de florescimento entre diferentes acessos (DINATO et al., 2016, 2018). Estudos com marcadores moleculares estão em andamento, com objetivo de melhorar o processo de identificação de híbridos (OLIVEIRA et al., 2016). Com objetivo de conhecer o nível de ploidia dos acessos conservados no Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum*,

estudos citogenéticos vêm sendo desenvolvidos (DAHMER et al., 2008; NOVO et al., 2016). Este trabalho iniciou o estudo da microbiota e do potencial agrícola e biotecnológico de bactérias envolvidas com os acessos de *Paspalum* conservados.

Dentre os acessos de *Paspalum* avaliados no programa de melhoramento genético de plantas da Embrapa Pecuária Sudeste, dois acessos promissores a se tornar cultivar foram selecionados para compor os estudos iniciais da microbiota endofítica e rizosférica: BGP 26 de *Paspalum notatum* (potencial para cobertura de solo) e BGP 308 de *Paspalum atratum* (potencial para forrageira).

Bactérias podem possuir a capacidade de promover o crescimento vegetal de algumas formas, como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de ácido indol-acético, antibiose e produção enzimas (ELJOUNAIDI; LEE; BAE, 2016; OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017). Como a microbiota endofítica e rizosférica nos acessos BGP 26 e 308 não era conhecida, havia uma necessidade de explorá-la. Deste modo, analisar a diversidade bacteriana endofítica e rizosférica associadas a dois acessos de *Paspalum* de interesse econômico e disponíveis no BAG *Paspalum*, por meio de isolamento e caracterização, poderia indicar novos micro-organismos com potencial para a promoção de crescimento vegetal.

O objetivo é utilizar bactérias solubilizadoras de fosfato para obter fósforo direto da rocha fosfática e bactérias fixadoras de nitrogênio para obter nitrogênio da atmosfera, evitando impactos ambientais, todo o processo industrial para obter o fósforo e nitrogênio industrializado e por meio da produção de ácido indol-acético e antagonismo oferecer um melhor estabelecimento da planta e proteção contra fungos fitopatogênicos.

Um caso de sucesso com bioinoculantes no Brasil iniciou com o trabalho pioneiro da Dra. Johanna Döbereiner realizado com *Paspalum notatum*. Neste trabalho foi encontrado um micro-organismo rizosférico do gênero *Azotobacter* com capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), ao qual foi batizado *Azotobacter paspali* (DÖBEREINER, 1966; DÖBEREINER; DAY; DART, 2009). Este nome posteriormente foi alterado para *Azorhizophilus paspali* (BALDANI; BALDANI, 2005). No Brasil, as pesquisas por FBN se iniciaram com a coordenação da pesquisadora Johanna Döbereiner (BALDANI; BALDANI, 2005) e trabalhos posteriores realizados em soja foram importantes para garantir a inserção da cultura no cerrado brasileiro, por oferecer maior capacidade de absorção do nitrogênio pela FBN deste elemento químico (HUNGRIA et al.,

2005). A produção de soja no Brasil saltou de 12.145 toneladas em 1976/77 para 119.281 toneladas em 2017/18 (CONAB, 2019).

Para que os objetivos fossem alcançados, foi importante avaliar as bactérias endofíticas e rizosféricas associadas aos acessos BGP 26 e BGP 308, avaliando se eram capazes realizar a promoção de crescimento *in vitro* e *in vivo* em tratamentos com solos de diferentes tipos de fosfato e sem correção de nitrogênio.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Impactos ambientais envolvidos na produção e uso de fertilizantes

À medida que a agricultura cresce, aumenta a necessidade de utilizar agroquímicos e como consequência crescem os impactos ambientais. Assim, métodos alternativos não poluentes e mais econômicos de promoção de crescimento vegetal ganham uma maior atenção (ALVES; MOINO JR; ALMEIDA, 1998; GERHARDSON, 2002; MAHANTY et al., 2017).

O Brasil, em 2016, produziu 3.049 toneladas do fertilizante NPK, consumiu 15.068 mil toneladas (quarto maior consumidor em escala mundial) e importou aproximadamente 12 mil toneladas, que o torna o maior importador de NPK em escala mundial (*INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION*, 2019).

A cadeia do fertilizante NPK é bastante complexa, pois envolve vários setores com importância econômica, desde a matéria-prima até a utilização do insumo pelo agricultor. Seis elos são citados na produção do NPK: indústria extrativa mineral, indústria de fabricação de produtos químicos inorgânicos, indústria de fabricação de fertilizantes simples, indústria de misturas e formulações, setor de distribuição e produtor rural (KULAIF, 2009; KULAIF; FERNANDES, 2010).

Quanto aos impactos ambientais observados, a matéria-prima para a produção do fósforo e potássio contido no NPK é obtida por diferentes meios de extração mineral. Considerando o acesso a mina, a área a ser lavrada, a edificação, o local de armazenamento do material estéril e os rejeitos, a área a ser desmatada pode ser enorme, podendo acarretar problemas ecológicos como perda de diversidade biológica, além de poder gerar problemas como aumento da taxa de erosão e assoreamento de corpos de águas (DIAS; LAJOLO, 2010).

Grande quantidade de energia é necessária para a produção de nitrogênio (N), pentóxido de fósforo (P_2O_5) e óxido de potássio (K_2O). Aproximadamente 44,5 a 54 GJ (gigajoule) por tonelada de nitrogênio, 7,1 GJ por tonelada de K, e de 4,4 a 7,3 GJ por tonelada de P (STRAATEN, 2010). Durante o processo podem emitir dióxido de carbono

(CO₂), óxido nitroso (N₂O), sulfeto de hidrogênio (H₂S), dióxido de enxofre (SO₂) e trióxido de enxofre (SO₃), componentes que podem estar envolvidos no efeito estufa, chuvas ácidas e irritações pulmonares (DIAS; LAJOLO, 2010).

O fosfogesso é um dos resíduos sólidos mais preocupantes, resultante da acidulação do concentrado fosfático por meio do ácido sulfúrico, no qual, para cada tonelada de P₂O₅, são produzidas de 4 a 5 toneladas de fosfogesso. Normalmente é estocado a céu aberto com potencial para poluir ambiente de forma química e radiológica, pois, de acordo com a origem do minério, pode conter arsênio, níquel, cádmio, chumbo, alumínio, flúor e rádio (DIAS; LAJOLO, 2010; KULAIF, 2009).

O gás natural é uma matéria-prima para a produção de fertilizantes nitrogenados. Sendo o gás natural um recurso não renovável, o preço da produção dos fertilizantes nitrogenados oscila de acordo com o estoque e valor desta matéria-prima (DIAS; LAJOLO, 2010; STRAATEN, 2010). As rochas potássicas e fosfáticas são matérias-primas para fertilizantes a base de fosfato e potássio, sendo também recursos não renováveis. Futura escassez de matéria prima para a produção de fertilizantes poderá gerar aumento no preço destes insumos (DIAS; LAJOLO, 2010; STRAATEN, 2010).

2.2 Eficiência do uso dos nutrientes

Existe uma necessidade de implantação de novas técnicas agrícolas, que vise um aumento na eficiência do uso dos nutrientes. A técnica de modificação microbiológica é uma das quais pode se realizar a aplicação direta das rochas na agricultura. Ácidos cítricos e oxálicos produzidos por micro-organismos são capazes de liberar potássio a partir de biotita, um mineral comum da classe dos silicatos (STRAATEN, 2010). Bactérias solubilizadoras de fosfato, por diferentes métodos, podem transformar e disponibilizar o fósforo para serem utilizados pelas plantas, isso inclui o fósforo direto de rochas e o fósforo solúvel que foi aplicado ao solo e que se tornou indisponível (KIM; JORDAN; MCDONALD, 1998). Quanto ao nitrogênio atmosférico, algumas bactérias, por meio da enzima nitrogenase podem disponibilizá-lo para a planta (BALDANI et al., 2014).

2.3 Importância do nitrogênio e fósforo

Em geral, os elementos essenciais têm função estrutural, metabólica e osmorregulatória na planta. Alguns elementos essenciais como nitrogênio, fósforo e potássio são móveis, de modo que podem se mover das folhas mais velhas para as folhas mais novas, e os sintomas da deficiência deste elemento tende a surgir nas folhas mais velhas. Os sintomas de elementos essenciais imóveis como cálcio, enxofre e cobre tendem a aparecer primeiramente nas folhas mais novas (TAIZ, L.; ZEIGER, 2013).

Em relação ao papel bioquímico e sua função fisiológica, o nitrogênio pertence ao grupo 1 dos nutrientes minerais, que fazem parte dos compostos de carbono, participam na constituição de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos e coenzimas (MALAKOUTI, 2008; TAIZ, L.; ZEIGER, 2013). A deficiência de nitrogênio tende a causar clorose (amarelecimento das folhas) nas folhas velhas, podendo chegar ao ponto destas folhas ficarem de cor castanha e caírem da planta. A clorose pode ser mais difícil de ocorrer em folhas jovens, pois o nitrogênio pode ser mobilizado a partir das folhas velhas (GARRITY et al., 2004; TAIZ, L.; ZEIGER, 2013; YONEYAMA et al., 2012). Com a falta de nitrogênio, carboidratos podem se acumular no caule das plantas ou serem utilizados na síntese de antocianina, por não poder ser utilizado na síntese de aminoácidos e de outros compostos nitrogenados (TAIZ, L.; ZEIGER, 2013).

O Fósforo pertence ao grupo 2 dos nutrientes minerais, que fazem parte da armazenagem de energia ou na integridade estrutural, participam na constituição de fosfolipídeos, ácidos nucleicos e coenzimas, apresenta grande importância na fotossíntese e respiração celular (GYANESHWAR et al., 2002; TAIZ, L.; ZEIGER, 2013). A deficiência de fósforo tende a causar crescimento reduzido em plantas jovens e coloração verde-escura nas folhas, podendo conter manchas necróticas. A síntese de antocianina também pode estar presente (TAIZ, L.; ZEIGER, 2013).

2.4 O ácido indol-acético na planta

Hormônios são produzidos em células específicas e possuem a capacidade de orientar processos celulares em outras células, mesmo em concentrações baixas. Hormônios como ácido abscísico, auxinas, brassinosteroides, citocininas, etileno e

giberelinas são os principais responsáveis pelo desenvolvimento vegetal (TAIZ, L.; ZEIGER, 2013).

O ácido indol-acético (AIA) é a principal auxina vegetal, foi identificada na década de 1930 e hoje pode ser sintetizada e comercializada, sendo utilizada na agricultura e na horticultura para estimular o crescimento vegetal. Na planta, o AIA é sintetizado em folhas jovens e no meristema apical de caules. Sintetizado a partir do aminoácido triptofano por diferentes rotas, como indol-3-pirúvico, indol-3-acetamida, indol-3-acetaldoxima, indol-3-acetonitrila, indol-3-acetaldeído e triptamina.

Para ser funcional, hormônios devem ter vida curta e não acumular ao longo do tempo. A degradação controlada do AIA se dá por meio de duas rotas: na rota por peroxidase, o AIA é catalisado por enzimas AIA-oxidase a 3-metilenoxindol e na rota conjugada, o indol-3-acetilaspártato é oxidado a ácido oxindol-3-acético (OxAIA) (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017; TAIZ, L.; ZEIGER, 2013).

2.5 Antagonismo e controle biológico

Organismos como vírus, bactéria, fungos, nematoides, artrópodes e plantas daninhas podem reduzir a produtividade e até causar a morte das plantas (SINGLA; KRATTINGER, 2016).

As doenças fúngicas são fatores limitantes para a produção agrícola. Em relação aos agroquímicos, o controle biológico por meio de inoculantes é um método alternativo (ecologicamente e economicamente viável) para o controle de fungos fitopatogênicos. O controle biológico pode ser por parasitismo, predação, antibiose, resistência induzida, competição pelo ambiente e nutrientes (BARRATT et al., 2018; HEYDARI; PESSARAKLI, 2010; NEGA, 2014).

Os micro-organismos presentes nas formulações do inoculantes reagem de forma diferente a diferentes ambientes. Neste sentido, é necessário sempre buscar novos agentes que sejam mais estáveis e que sobrevivam melhor a diferentes ambientes. No controle biológico por antibiose, um micro-organismo produz um o mais compostos com ação danoso sobre um outro micro-organismo, podendo matar ou inibir o crescimento do patógeno (HEYDARI; PESSARAKLI, 2010; NEGA, 2014).

O desenvolvimento e a industrialização da agricultura acarretaram aumento da carga química nos ecossistemas naturais. Agroquímicos são os produtos químicos utilizados na agricultura para aumento de produtividade, como fertilizantes, fungicidas e inseticidas. Os agroquímicos têm gerado tanto problemas no ambiente quanto na saúde. Agricultores expostos a agroquímicos podem se contaminar, resíduos químicos podem permanecer nos alimentos, poluir a água de rios e lagos, pode ocorrer diminuição da diversidade ecológica de organismos vivos suscetíveis aos agroquímico (BISWAS et al., 2014; NICOLOPOULOU-STAMATI et al., 2016).

Devido a estes fatores de risco, há uma demanda por métodos sustentáveis e ecológicos para a fertilização, controle de pragas e doenças na agricultura (ALVES; MOINO JR; ALMEIDA, 1998; GERHARDSON, 2002; MAHANTY et al., 2017).

2.3 Micro-organismos e a promoção de crescimento vegetal

Poucos são os trabalhos relacionados a microbiota de acessos do gênero *Paspalum* (DÖBEREINER, 1966; DÖBEREINER; DAY; DART, 2009; PRABHA et al., 2018), sendo praticamente desconhecida, assim como a possível interação entre os micro-organismos e as plantas do gênero. Em acessos com potencial econômico, é possível que bactérias promotoras de crescimentos vegetal estejam atuando, tornando-os promissores.

Atualmente, várias substâncias produzidas por micro-organismos já são conhecidas, como antibióticos, toxinas, fatores de crescimento, enzimas e fármacos (LACAVAL; AZEVEDO, 2013; QUECINE et al., 2012; STROBEL; DAISY, 2003). Bactérias endofíticas e rizosféricas vivem associadas às plantas e podem conferir vantagens para a planta hospedeira por meio da promoção de crescimento vegetal (AZEVEDO; ARAÚJO, 2007). Os micro-organismos endofíticos são os que vivem na totalidade ou parte do seu ciclo de vida no interior das plantas, interagindo sem causar efeito patogênico. Podem ser classificados como cultiváveis ou não cultiváveis, ao considerar se conseguem ou não crescer em meio de cultura (ANDREOLLI et al., 2019; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; ELJOUNAIDI; LEE; BAE, 2016). A parte do solo que está sob influência da raiz é chamada de rizosfera e as bactérias que se associam a rizosfera das plantas são denominadas rizobactérias, podendo ser classificadas de acordo com seus efeitos sobre o crescimento vegetal: benéficas, deletérias ou neutras (AHEMAD; KIBRET,

2014; DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; GRAY; SMITH, 2005; XIAO et al., 2017).

A promoção de crescimento vegetal pode ser direta, quando o micro-organismo age diretamente na planta, ou indireta, quando o micro-organismo inibe o desenvolvimento de um outro micro-organismo que poderia interferir no crescimento vegetal (ELJOUNAIDI; LEE; BAE, 2016; OLANREWaju; GLICK; BABALOLA, 2017).

São exemplos de promoção de crescimento vegetal direto a fixação biológica de nitrogênio (FBN) por bactérias diazotróficas, por meio do complexo enzimático chamado nitrogenase (AHEMAD; KIBRET, 2014; BALDANI et al., 2014), a solubilização de fosfato (SF) por bactérias solubilizadoras de fosfato, convertendo formas insolúveis de fósforo para formas solúveis por meio da secreção de ácidos orgânicos e fosfatases (AHEMAD; KIBRET, 2014; KIM; JORDAN; MCDONALD, 1998) e a produção de auxinas como o ácido indol-acético (AIA), por várias rotas metabólicas envolvendo o triptofano (AHEMAD; KIBRET, 2014; DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; PATTEN; GLICK, 1996).

Os exemplos de promoção de crescimento vegetal indireto envolvem o controle biológico por parasitismo, antibiose e indução de resistência, por meio da síntese de antibióticos, cianeto de hidrogênio e enzimas. (ELJOUNAIDI; LEE; BAE, 2016; LACAIVA; AZEVEDO, 2013)

2.1 O gênero *Paspalum*

O *Paspalum* é um importante gênero da família *Poaceae* nas Américas e é altamente diverso (NOVO et al., 2016). Possui aproximadamente 350 espécies distribuídas pelo continente americano (NICOLAS; RUA, 2015), ocorrendo em todo Brasil, no leste da Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai (QUARIN; VALLS; URBANI, 1997). Cerca de 214 espécies de *Paspalum* são possíveis de serem encontradas no Brasil (*Paspalum* in Flora do Brasil 2020 em construção, 2019).

A Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos – SP, abriga o Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*), composto atualmente por,

aproximadamente, 450 acessos de cerca de 50 espécies distintas (Alelo, 2019), que estão sendo avaliados para diferentes usos.

Trabalhos publicados e outros em andamento têm mostrado o grande potencial de espécies de *Paspalum* para forragem (BATISTA; GODOY, 2000; NOVO et al., 2016; PROVAZI et al., 2008) e para fins de cobertura de solo em beira de rodovias, aeroportos, taludes e ornamentação (CASTRO et al., 2015). Estas espécies podem ser exploradas para a produção de novas cultivares ou como parentais em programas de melhoramento.

Dentre os acessos avaliados na Embrapa Pecuária Sudeste são encontrados BGP 26 (BRA 006301/ VGzLeBo 9684) de *Paspalum notatum* Flügge e BGP 308 (BRA 030078/ VRcMmSv 14525) de *P. atratum* Swallen.

O BGP 26 de *Paspalum notatum* possui características agronômicas importantes como rusticidade, agressividade, baixa necessidade de poda, maior resistência à cigarrinha-das-pastagens, sendo interessante como cobertura vegetal (AMARAL; CASTILHO, 2012). A grama-batatais de *P. notatum* é cultivada por meio de propágulos coletados em áreas de pastagens e possui as características supracitadas para a espécie (SOUZA, 2013).

Já o acesso BGP 308 possui alta produção de matéria seca, sendo interessante para uso como forrageira. Pertence a mesma espécie do capim Pojuca que é uma cultivar lançada da espécie *Paspalum atratum* Swallen (BGP 98). Assim como os outros acessos desta espécie, o capim Pojuca é nativo, perene e de alta produção. Possui características agronômicas como: excelente produção de forragem, boa aceitação pelos bovinos e equinos, pequena exigência em fertilidade do solo, elevada produção de sementes, resistência ao fogo e média tolerância ao frio (KARIA; DE ANDRADE, 2001).

Devido a esse contexto, bactérias com potencial para a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de ácido indol-acético e antagonismo podem diminuir o uso e a produção de insumos industrializados.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar bactérias endofíticas e rizosféricas cultiváveis em *Paspalum* com seu potencial tecnológico e agrícola.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar a comunidade bacteriana endofítica e rizosférica cultivável a partir de amostras de solo, raiz e folha de *Paspalum atratum* (BGP 308) e *P. notatum* (BGP 26);
- Criar um banco de cultura bacteriana de isolados de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum*;
- Avaliar *in vitro* o potencial dos isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos quanto a fixação biológica de nitrogênio, produção de ácido indol-acético, solubilização de fosfato e antagonismo a *Bipolaris* spp.;
- Identificar por meio da análise do gene 16S as bactérias endofíticas e rizosféricas cultiváveis obtidas que possuam potencial para a promoção de crescimento vegetal;
- Avaliar o potencial de promoção de crescimento vegetal *in vivo* de linhagens bacterianas endofíticas e rizosféricas selecionadas, em tratamentos com diferentes tipos de rocha fosfática e sem correção de nitrogênio.

- Avaliar o crescimento e composição química das plantas de *P. atratum* submetidas à inoculação bacteriana.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Identificação taxonômica e caracterização de bactérias endofíticas e rizosféricas cultiváveis associadas a *Paspalum atratum* e *P. notatum*

4.1.1 Isolamento de bactérias endofíticas e rizosféricas

Solo, raiz e folha dos acessos BGP 26 (BRA 006301/ VGzLeBo 9684) de *Paspalum notatum* Flüggé e BGP 308 (BRA 030078/ VRcMmSv 14525) de *P. atratum* Swallen (Figura 1) foram coletados do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG), localizado na Embrapa Pecuária Sudeste (21°57'42" S, 47°50'28" W, 860m), em São Carlos, SP. Duas coletas foram realizadas, uma em 08/08/2016 (período de seca) e outra em 30/01/2017 (período de chuva).

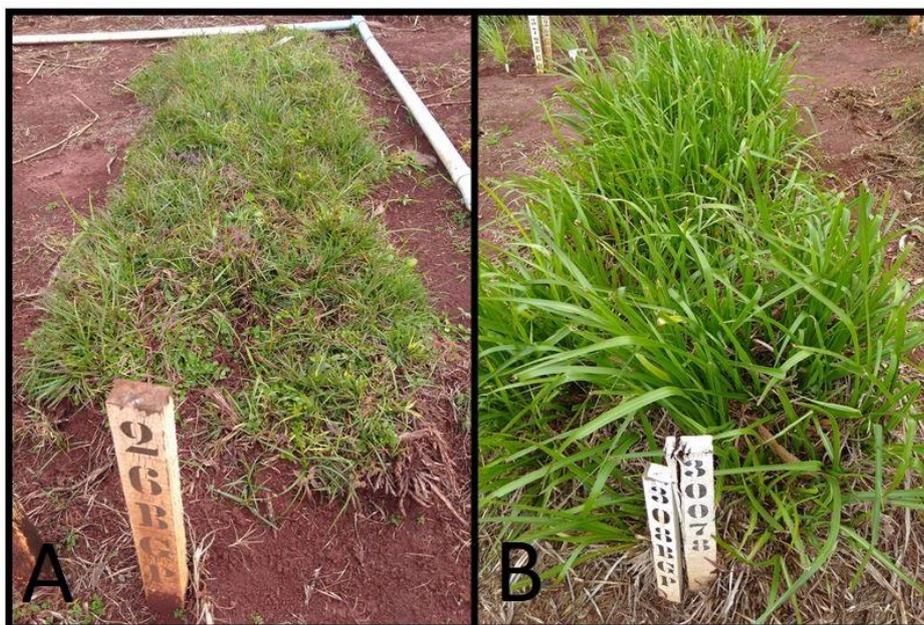


FIGURA 1. Acessos utilizados. BGP 26 (BRA 006301/ VGzLeBo 9684) de *Paspalum notatum* Flüggé (A) e BGP 308 (BRA 030078/ VRcMmSv 14525) de *Paspalum atratum* Swallen (B). Fonte: Autor.

A coleta de material vegetal e o isolamento dos micro-organismos cultiváveis endofíticos foram realizados de acordo com ARAÚJO et al. (2014). Assim, raízes e folhas coletadas passaram por uma desinfecção superficial por meio de cinco frascos de vidro esterilizados. Foram utilizados os seguintes tempos, dois minutos no álcool 70%, três minutos no hipoclorito de sódio 3%, um minuto no álcool 70% e dois enxagues com água destilada esterilizada. Após a desinfecção superficial, as amostras foram trituradas e incubadas a 28°C por duas horas em *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Após duas horas a suspensão bacteriana passou por diluição seriada de fator 10 (10^0 , 10^{-1}) e alíquotas de $0,1\text{mL}^{-1}$ das diluições foram inoculadas em placas contendo o meio de cultura *Tryptic Soy Agar* (TSA) suplementado com 50 $\mu\text{g/mL}$ de Benlate. Estas placas foram incubadas a 28°C para obter as placas primárias do isolamento. As bactérias que cresceram nas placas primárias passaram por processo de purificação em placa com TSA. Os isolados bacterianos purificados foram inoculados em *Tryptic Soy Broth* (TSB), incubados por 24 horas a 28°C e armazenados em TSB + Glicerol (1:1).

O isolamento de bactérias rizosféricas foi semelhante ao isolamento de bactérias endofíticas, seguindo o protocolo de MOHITE (2013) com modificações, no qual a temperatura foi de a 28°C e alíquotas de $0,1\text{mL}^{-3}$ das diluições foram estriadas em meio TSA.

4.1.2 Análise de solo

No momento da coleta de solo para o isolamento bacteriano, amostras do mesmo foram enviadas ao Laboratório de Solos da Embrapa Pecuária Sudeste para a análise química. As características químicas do solo foram determinadas de acordo com RAIJ et al. (2001).

4.1.3 Teste de fixação biológica de nitrogênio *in vitro*

O potencial dos isolados microbianos em realizar FBN foi avaliada qualitativamente *in vitro* de acordo com Döbereiner; Baldani; Baldini, (1995). Os protocolos estão descritos nos anexos de 1 a 4 (seções 8.1 a 8.4).

4.1.4 Teste de solubilização de fosfato *in vitro*

A capacidade dos isolados bacterianos de solubilizar fosfato foi avaliada em meio ágar nutriente suplementado com fosfato insolúvel (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001). O índice de solubilização de fosfato (ISF) foi classificado como: baixo ($ISF < 2$), médio ($2 < ISF < 3$) e alto ($ISF > 3$) (SILVA FILHO; VIDOR, 2000). O protocolo está descrito no anexo 5 (seção 8.5).

4.1.5 Teste de produção de ácido indol-acético *in vitro*

Quanto à quantificação da produção de AIA, foi utilizado como referência o método originalmente proposto por BRIC; BOSTOCK; SILVERSTONE, (1991) adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2016). Os protocolos estão descritos nos anexos 6 e 7 (seções 8.6 e 8.7).

4.1.6 Teste de antagonismo

Somente os isolados positivos para os três testes de promoção de crescimento vegetal direto (NFB, SF e AIA) foram avaliados no teste de antagonismo e identificação taxonômica. Foram considerados positivos os isolados que apresentaram ISF igual ou maior que 2,00; os que foram positivos qualitativamente para a FBN e que apresentaram a produção de AIA.

Quanto ao teste de antagonismo, os isolados bacterianos foram avaliados quanto à capacidade antagonista ao fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp.. O fungo fitopatogênico foi cedido pelo Departamento de Fitopatologia e Nematologia - USP/Esalq.

Esporos de *Bipolaris* sp. foram estriados por toda placa, em duplicata, contendo meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) e o isolado bacteriano previamente crescido em meio TSA foi inoculado sobre a estria. A incubação foi por quatro dias a 28° C. A presença de halos de inibição em volta das colônias bacterianas indicaram resultados positivos para o teste.

4.1.7 Identificação taxonômica

Os 54 isolados bacterianos que foram positivos para FBN, SF e AIA tiveram o DNA extraído, por método de tampão salino (ALJANABI; MARTINEZ, 1997). O gene 16S das amostras foi amplificado utilizando os primers V3F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') e V6R (5' ACAGCCATGCANCACT 3') (YANG; WANG; QIAN, 2016). A reação em cadeia da polimerase (PCR) teve volume final de 45 µl, como segue: 60 ng de DNA genômico, 25 µL de Thermo Scientific PCR Master Mix (1,25 U de enzima Taq polimerase, 1x tampão de PCR (200 mM Tris pH 8,4, 500 mM KCl), 50 mM MgCl₂, 1,25 mM dNTP), 3 pmol de cada primer e 8 µl de água. O protocolo usado para amplificação consistiu de 95°C por 3 min., 31 ciclos (95°C por 30 seg.; 60 °C por 30 seg.; 72°C por 1 min.) e 72°C por 10 min, em termociclador BioRad T100. Os fragmentos do gene 16S amplificados foram purificados com kit QIAquick (Qiagen) e enviados para sequenciamento de DNA (Sanger), utilizando o ABI 3730 DNA Analyser, sendo que as reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit da Thermo Fisher Scientific (código 4337456). As sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

As sequências de baixa qualidade foram visualizadas e editadas utilizando o software BioEdit (HALL, 1999). Essas sequências foram, então, comparadas com sequências depositadas em dois bancos públicos: (1) *Ribosomal Database Project II* (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>), utilizando o programa *Classifier* com 95% de confiança para atribuir as sequências 16S (WANG et al., 2007), e (2) *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997), disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov. O RDP utiliza como classificador o *Naive Bayesian rRNA Classifier* (Versão 1.0, novembro de 2003) e a taxonomia hierárquica se baseia no Manual de sistemática bacteriológica *Bergey* (GARRITY et al., 2004; MAIDAK et al., 2000).

Por meio do software Mega 5 foi construído um dendrograma com base no alinhamento realizado pelo Muscle (EDGAR, 2004), posteriormente convertido numa matriz de distância determinada pelo parâmetro Kimura-2 (KIMURA, 1980), a qual foi agrupada pelo método de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). A consistência da

estrutura da árvore foi determinada pela análise de *bootstrap*, feita com base em 1000 subamostragens na matriz de distância. O gênero *Halobacterium* (GenBank: MK262901.1) foi utilizado como *outgroup* nos dendogramas. Para construção do dendograma, além das 54 sequências obtidas neste trabalho, com intuito de comparação com sequências já depositadas no GenBank e identificadas, foram utilizadas 14 sequências de interesse: *Pantoea ananatis* (GenBank: JMJJ01000010), *Pantoea anthophila* (GenBank: EF688010), *Enterobacter hormaechei* (GenBank: CP017179), *Enterobacter ludwigii* (GenBank: JTLO01000001), *Pseudomonas koreensis* (GenBank: AF468452), *Pseudomonas reinekei* (GenBank: AM293565), *Rhizobium kunmingense* (GenBank: FJ560597), *Rhizobium zea* (GenBank: KX932068), *Bacillus thuringiensis* (GenBank: ACNF01000156), *Bacillus cereus* (GenBank: AE016877), *Microbacterium proteolyticum* (GenBank: KM359785), *Microbacterium enclense* (GenBank: KQ758481), *Micrococcus aloeverae* (GenBank: KF524364), *Micrococcus yunnanensis* (GenBank: FJ214355).

4.2 Promoção de crescimento vegetal *in vivo* por meio de bactérias endofíticas e rizosféricas de *Paspalum atratum* (BGP 308)

Para a avaliação da promoção de crescimento *in vivo*, foi utilizado o acesso BGP 308 de *Paspalum atratum*. O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação da Embrapa Pecuária Sudeste (21°57'42" S, 47°50'28" W, 860m), em São Carlos, SP, utilizando vasos com 0,5 e 4,5 kg de terra. As características químicas do solo, antes do início do experimento, foram determinadas de acordo com RAIJ et al. (2001). Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados com três repetições em esquema fatorial 8 x 3 + 1.

4.2.1 Seleção de isolados bacterianos para o teste *in vivo*

As bactérias rizosféricas selecionados para teste *in vivo* foram os isolados 25 (*Pseudomonas* spp.) e 458 (*Pseudomonas* spp.) e as bactérias endofíticas foram os isolados 103 (*Enterobacter* spp.), 105 (*Pseudomonas* spp.), 109 (*Bacillus* spp.), 110 (*Enterobacter* spp.), 161 (*Pseudomonas* spp.) e 170 (*Pantoea* spp.). Todos estes isolados possuem potencial de promoção de crescimento vegetal e estão depositados na coleção de culturas

microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Todos os isolados selecionados eram positivos para FBN, positivos para produção de AIA e o ISF era igual ou maior que 2,0. Nos isolados selecionados o AIA variou de 18,26 a 431,41 $\mu\text{g/mL}$, assim, foi possível fazer um gradiente de concentração de AIA nos tratamentos *in vivo*.

4.2.2 Preparo do solo e tratamentos

O solo foi preparado com três fontes diferentes de fosfato mais o controle sem fosfato (SFO), totalizando 36 tratamentos e 108 vasos.

As três fontes de P utilizadas foram: (1) fosfato solúvel (FSO) - superfosfato triplo granulado (46,0% P_2O_5 solúvel em citrato neutro de amônio + água), (2) fosfato sedimentar (FSE) - fosfato de rocha de Arad (33,0 % P_2O_5 total) e (3) fosfato cristalino (FCR) - fosfato de rocha de Cajati (Jacupiranga) (5,0 % P_2O_5 total) na dose de 200 mg kg^{-1} P ou 458 mg kg^{-1} P_2O_5 .

Com base nos resultados da análise de solo, 30 dias antes do transplante, o solo recebeu calcário dolomítico (PRNT 70%) para atingir a saturação por base de 60%. As três fontes de fósforo foram aplicadas no transplante das mudas e os vasos foram adubados com K_2SO_4 (60% K_2O) para atingir 3% da CTC.

4.2.3 Germinação de semente, transplante de plântulas e inoculações.

Para o preparo das mudas, as espiguetas tiveram as cariopses removidas e foram submetidas ao processo de desinfecção em um dessecador fechado, por meio de vapores de 20 mL de hipoclorito de sódio (4,5%) misturado com 10 mL de ácido acético glacial por 60 minutos (QUESENBERRY et al., 2010). As sementes desinfetadas foram inseridas em tubos de ensaio 16x100mm contendo meio Murashige and Skoog (MS), preparado segundo o protocolo de germinação de sementes de ORBOVIC; GROSSER, (2006). Aos 14 dias após a inserção das sementes no tubo de ensaio contendo meio MS, as plântulas foram retiradas e inseridas em tubo tipo Falcon com 15 mL de suspensão bacteriana (meio líquido MS a 10^9 UFC/mL) por 30 minutos a 28°C. Após essa etapa,

foram transplantadas em vasos de 500 mL contendo solo que passou por calagem, sem correção dos nutrientes. Além da inoculação realizada no processo de germinação, foram realizadas outras cinco: em vasos de 500 mL, receberam mais duas inoculações (15 e 30 dias após serem transplantadas para os vasos de 500 mL) e, em vasos de 4,5 kg, receberam mais três inoculações (15, 30 e 45 dias após serem transplantadas). As seis inoculações seguiram a mesma metodologia descrita a seguir.

4.2.4 Preparação do inóculo e inoculação

Os isolados selecionados foram crescidos em meio TSB por 36 horas, foram centrifugados a 10.000 g por 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e lavado uma vez com PBS objetivando a retirada do meio de cultura. O *pellet* foi resuspendido em 1 mL de PBS e utilizado para padronizar a suspensão bacteriana a ser inoculada na concentração de 10^9 UFC/mL. Um volume de 6 mL desta suspensão padronizada foi inoculada no solo próximo à raiz de cada planta. O controle foi inoculado com solução PBS, sem isolado bacteriano.

4.2.5 Análise morfológica

As plântulas ficaram nos vasos de 500 mL por 43 dias e foram transplantadas para os vasos de 4,5 Kg referentes aos quatro tratamentos.

Aos 50 dias após o transplante para os vasos, foi realizado o corte da parte aérea das plantas, a cerca de 15 cm do nível do solo e os descritores, peso seco aéreo (PSA), comprimento de folha (CF), número de folha (NF), número de perfilhos (NP), peso seco da raiz (PSR) foram mensurados. A folha escolhida para a avaliação foi a segunda folha expandida em cada planta.

Para determinação do peso seco aéreo, as amostras da biomassa da parte aérea foram levadas para estufa com circulação forçada a 60°C por um período de 72 horas.

4.2.6 Análise nutritiva e mineral

Após a secagem das amostras e determinação do peso seco foliar, estas foram trituradas em moinho do tipo Wiley, com facas de aço inoxidável, com peneiras de 1 mm, sendo coletado apenas o material que passou na peneira. O material foi acondicionado em frasco plástico identificado com o código de cada amostra.

Foram determinadas a matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, lignina e digestibilidade *in vitro* utilizando um espectrômetro de infravermelho próximo (NIRS) (BÜCHI LABORTECHNIK, 2007) com curva calibrada para *Paspalum*.

Os teores totais de nutrientes foram determinados de acordo com NOGUEIRA et al. (1998). O nitrogênio foi determinado no extrato da digestão sulfúrica pelo método semi-micro Kjeldhal. A determinação de K foi feita no extrato da digestão nitro-perclórica, e determinado por fotometria de chama. Os demais macronutrientes (P, Ca, Mg e S) e micronutrientes (Cu, Fe, Mn e Zn) foram determinados no mesmo extrato nitro-perclórico e determinados por espectrometria de plasma induzido (ICP-OES).

4.2.7 Análise estatística

As análises de variância, Teste t e a Análise de Componentes Principais foram realizadas no software *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc., 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Diversidade genética, potencial agrícola e biotecnológico de bactérias endofíticas e rizosféricas cultiváveis associadas a *Paspalum atratum* e *P. notatum*

5.1.1 Isolamento de bactérias endofíticas e rizosféricas

Foram obtidos 213 isolados bacterianos, 114 oriundos da coleta em período de chuva e 99 em período de seca. Quanto ao acesso, 97 isolados foram do BGP 26 e 118 do BGP 308. Quanto à origem do isolamento, 101 isolados foram da rizosfera e 61 de raiz e 51 de folha.

A proporção observada está de acordo com a literatura, pois, as populações bacterianas são encontradas em maior frequência na região rizosféricas, seguida dos tecidos internos das raízes e por fim nas partes aéreas do hospedeiro vegetal (BALDANI et al., 2014).

5.1.2 Análise de solo

As características químicas e físicas do solo para os dois acessos estudado estão descritas a seguir na Tabela 1.

TABELA 1. Resultados de análises químicas e física de solo dos acessos BGP 26 de *Paspalum notatum* e BGP 308 de *P. atratum*.

Descritor	Unidade	<i>P. notatum</i> BGP 26	<i>P. atratum</i> BGP 308
pH	Água	7,0	5,4
pH	CaCl ₂	6,3	4,8
M.O.	g.dm ⁻³	31	41
C.T.	g.dm ⁻³	18	24
P _(res)	mg.dm ⁻³	23	4
K _(res)	mmolc.dm ⁻³	2,5	1,3
Ca	mmolc.dm ⁻³	48	18
Mg	mmolc.dm ⁻³	22	7
H + Al	mmolc.dm ⁻³	9	41

Descritor	Unidade	<i>P. notatum</i> BGP 26	<i>P. atratum</i> BGP 308
Al	mmolc.dm ⁻³	0	4
SB	mmolc.dm ⁻³	72	26
CTC	mmolc.dm ⁻³	82	67
V	%	88	39
B	mg . dm ⁻³	0,28	0,22
Cu	mg . dm ⁻³	2,6	5,1
Fe	mg . dm ⁻³	7	40
Mn	mg . dm ⁻³	4,9	12,6
Zn	mg . dm ⁻³	1,0	1,0
Areia Total	Textura (g.Kg ⁻¹)	397	396
Argila	Textura (g.Kg ⁻¹)	377	428
Silte	Textura (g.Kg ⁻¹)	226	176
Cassificação Textura	Textura (g.Kg ⁻¹)	Argilosa	Argilosa

pH: Potencial hidrogeniônico; M.O.: Matéria Orgânica; C.T.: Carbono Total (M.O./1,724); P(res): Fósforo Resina; K(res): Potássio Resina; Ca: Cálcio Mg: Magnésio; H + Al: Potencial ácido; Al: Alumínio; SB: Soma de Bases; CTC: Capacidade de troca catiônica e V: Vanádio; B: Boro; Cu: Cobre; Fe: Ferro; Mn: Manganês; Zn: Zinco.

A análise de solo indicou maior quantidade de Fósforo Resina e maior pH de solo em BGP 26 em relação ao BGP 308. A produção de ácidos orgânicos é um método de solubilização de fosfato (AFZAL et al., 2019; KHAN et al., 2009). A produção de ácidos orgânicos pode produzir acidificação do solo rizosférico e criar uma correlação inversamente proporcional entre a quantidade fosfato disponível e o pH do solo (AFZAL et al., 2019; KHAN et al., 2009).

A solubilização de fosfato pode ocorrer por quelação, troca iônica e produção de ácido orgânico (AFZAL et al., 2019; KHAN et al., 2009). Quanto ao estudo de MOTAMEDDI et al., (2016) que avaliou isolados rizosféricos de repolho em busca por bactérias com capacidade de solubilização de fosfato, os isolados mais promissores foram pertencentes aos gêneros *Proteus* e *Raoultella* com 4,66 e 3,00 de ISF, respectivamente. A produção de ácido oxálico e ácido cítrico foram observados em *Proteus* e de ácido oxálico em *Raoultella*.

No presente estudo, as parcelas dos acessos BGP 26 e BGP 308 estavam a aproximadamente 10 metros de distância uma da outra e o manejo agrônômico ocorreu de forma similar. Foram encontrados grupos de bactérias solubilizadoras de fosfato tanto rizosféricas quanto endofíticas nos dois acessos estudados.

Segundo a análise de solo, em BGP 26 havia uma alta disponibilidade de fósforo com solo não acidificado. A alta disponibilidade de fósforo com pH básico pode

estar correlacionada com a não necessidade de solubilização de fosfato por parte das bactérias, havendo fósforo disponível não há necessidade de se envolverem com a síntese de ácidos e outros compostos necessários para a solubilização e mineralização de fosfato (GYANESHWAR et al., 2002), assim este solo é menos ácido, quando comparado com o solo do acesso BGP 308. Outra hipótese para a não acidificação do solo em BGP 26 pode ser devido às bactérias solubilizadoras de fosfato presentes neste acesso estarem utilizando outras formas para solubilizar o fosfato, que não sejam por produção de ácidos orgânicos (GYANESHWAR et al., 2002).

5.1.3 Teste de promoção de crescimento vegetal *in vitro* e identificação taxonômica

Os 213 isolados bacterianos foram analisados *in vitro* quanto ao potencial de promoção de crescimento vegetal. Assim, 61 (28,63%) dos isolados foram positivos para fixação biológica de nitrogênio (FBN), representando 14 isolados de BGP 26 e 47 de BGP 308. O teste de solubilização de fosfato (SF) foi positivo em 62 (29,1%) isolados, representando 14 dos isolados de BGP 26 e 48 dos isolados de BGP 308. A produção de ácido indol-acético (AIA) foi confirmada em todos isolados, variando desde a concentração mínima de 1,15 a 431,41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Foram selecionados 54 isolados bacterianos, que apresentaram resultado positivo para os três testes de promoção de crescimento vegetal direto (FBN, SF e AIA). Os isolados selecionados estão descritos na Tabela 2, assim como a identificação taxonômica destes isolados.

TABELA 2. Identificação molecular dos 54 isolados bacterianos que demonstraram resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato (SF) e produção de ácido indol-acético (AIA). No total foram avaliados 213 isolados endofíticos e rizosféricos de BGP 26 de *Paspalum notatum* e BGP 308 de *P. atratum*.

Acesso vegetal Solo/Segmento	Gênero bacteriano	Código - Isolado bacteriano	Número de acesso (GenBank)	ISF	FBN	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
BGP26 Folha	<i>Pantoea</i> spp.	461	MK521309	3,21	+	19,05
BGP26 Folha	<i>Pantoea</i> spp.	467	MK521310	3,34	+	36,53
BGP26 Folha	<i>Pantoea</i> spp.	469	MK521311	3,06	+	36,73
BGP26 Folha	<i>Rhizobium</i> spp.	479	MK521312	2,04	+	12,88
BGP26 Raiz	<i>Pantoea</i> spp.	511	MK521313	2,95	+	90,29
BGP26 Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> spp.	50	MK521266	2,09	+	16,41
BGP26 Rizosfera	<i>Bacillus</i> spp.	53	MK521267	2,00	+	13,2

Acesso vegetal Solo/Segmento	Gênero bacteriano	Código - Isolado bacteriano	Número de acesso (GenBank)	ISF	FBN	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
BGP26 Rizosfera	<i>Bacillus</i> spp.	59	MK521268	2,00	+	11,49
BGP26 Rizosfera	<i>Bacillus</i> spp.	71	MK521269	2,22	+	16,68
BGP26 Rizosfera	<i>Enterobacter</i> spp.	139	MK521294	2,25	+	26,07
BGP26 Rizosfera	<i>Enterobacter</i> spp.	140	MK521295	3,18	+	90,86
BGP308 Folha	<i>Pseudomonas</i> spp.	161	MK521299	2,55	+	72,15
BGP308 Folha	<i>Pantoea</i> spp.	168	MK521300	2,97	+	28,04
BGP308 Folha	<i>Pantoea</i> spp.	169	MK521301	3,41	+	66,04
BGP308 Folha	<i>Pantoea</i> spp.	170	MK521302	3,06	+	431,41
BGP308 Folha	<i>Pantoea</i> spp.	177	MK521303	3,10	+	59,32
BGP308 Folha	<i>Pantoea</i> spp.	178	MK521304	3,18	+	52,33
BGP308 Folha	<i>Pseudomonas</i> spp.	179	MK521305	2,39	+	12,85
BGP308 Folha	<i>Pantoea</i> spp.	180	MK521306	3,36	+	61,09
BGP308 Folha	<i>Microbacterium</i> spp.	183	MK521307	2,23	+	20,79
BGP308 Folha	<i>Micrococcus</i> spp.	487	MK521314	3,38	+	47,38
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	81	MK521270	2,76	+	216,78
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	82	MK521271	2,77	+	187,87
BGP308 Raiz	<i>Pseudomonas</i> spp.	83	MK521272	2,69	+	23,25
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	84	MK521273	3,28	+	164,52
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	85	MK521274	2,99	+	204,32
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	88	MK521275	2,88	+	148,75
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	89	MK521276	3,58	+	222,62
BGP308 Raiz	<i>Pseudomonas</i> spp.	91	MK521277	2,62	+	21,64
BGP308 Raiz	<i>Pseudomonas</i> spp.	92	MK521278	2,61	+	21,71
BGP308 Raiz	<i>Pseudomonas</i> spp.	94	MK521279	2,65	+	25,24
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	95	MK521280	2,46	+	205,29
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	96	MK521281	2,44	+	88,12
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	97	MK521282	2,70	+	135,85
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	98	MK521283	2,75	+	187,73
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	101	MK521284	3,10	+	133,37
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	102	MK521285	3,56	+	134,54
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	103	MK521286	3,61	+	165,29
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	104	MK521287	2,81	+	166,95
BGP308 Raiz	<i>Pseudomonas</i> spp.	105	MK521288	2,18	+	35,85
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	106	MK521289	3,10	+	105,05
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	107	MK521290	2,87	+	131,33
BGP308 Raiz	<i>Pseudomonas</i> spp.	108	MK521291	2,47	+	14,54
BGP308 Raiz	<i>Bacillus</i> spp.	109	MK521292	2,58	+	18,26
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	110	MK521293	2,85	+	87,6
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	155	MK521296	2,88	+	263,74
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	157	MK521297	2,62	+	142,23
BGP308 Raiz	<i>Enterobacter</i> spp.	159	MK521298	2,45	+	158,29
BGP308 Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> spp.	8	MK521261	2,20	+	16,09

Acesso vegetal Solo/Segmento	Gênero bacteriano	Código - Isolado bacteriano	Número de acesso (GenBank)	ISF	FBN	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
BGP308 Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> spp.	25	MK521262	2,00	+	44,85
BGP308 Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> spp.	26	MK521263	2,02	+	27,75
BGP308 Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> spp.	36	MK521264	2,00	+	24,39
BGP308 Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> spp.	39	MK521265	2,00	+	27,33
BGP308 Rizosfera	<i>Pseudomonas</i> spp.	458	MK521308	2,62	+	65,12

Dos isolados selecionados, 11 foram do acesso BGP 26 e 43 do BGP 308. Quanto ao período em que foram coletados, 14 foram do período de seca e 40 da chuva, sendo 12 da rizosfera, 28 de raiz e 14 de folha (Tabela 3).

TABELA 3. Caracterização quanto ao gênero bacteriano, acesso vegetal, solo-segmento de planta coletado e período do isolamento dos 54 isolados de BGP 26 de *Paspalum notatum* e BGP 308 de *Paspalum atratum* que se mostraram positivos para a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de ácido indol-acético. Os traços indicam que não houve micro-organismo selecionado para determinada condição.

Gênero	Acesso vegetal	Solo - Segmento / Período / Número de coleta					
		Rizosfera (Seca)	Rizosfera (Chuva)	Raiz (Seca)	Raiz (Chuva)	Folha (Seca)	Folha (Chuva)
<i>Bacillus</i> spp.	BGP26	53, 59, 71	-	-	-	-	-
<i>Bacillus</i> spp.	BGP308	-	-	109	-	-	-
<i>Enterobacter</i> spp.	BGP26	139, 140	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> spp.	BGP308	-	-	81, 82, 84, 85, 88, 89, 95, 96, 97, 98, 101, 102, 103, 104, 106, 107, 110, 155, 157, 159	-	-	-
<i>Microbacterium</i> spp.	BGP26	-	-	-	-	-	-
<i>Microbacterium</i> spp.	BGP308	-	-	-	-	183	-
<i>Micrococcus</i> spp.	BGP26	-	-	-	-	-	-
<i>Micrococcus</i> spp.	BGP308	-	-	-	-	-	487
<i>Pantoea</i> spp.	BGP26	-	-	-	511	-	461, 467, 469
<i>Pantoea</i> spp.	BGP308	-	-	-	-	168, 169, 170, 177, 178, 180	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	BGP26	50	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> spp.	BGP308	8, 25, 26, 36, 39	458	83, 91, 92, 94, 105, 108	-	161, 179	-
<i>Rhizobium</i> spp.	BGP26	-	-	-	-	-	479
<i>Rhizobium</i> spp.	BGP308	-	-	-	-	-	-

No dendrograma (Figura 2) construído a partir de sequências do gene 16S dos isolados endofíticos e rizosféricos de BGP 26, as bactérias foram classificadas nos Filos Proteobacteria (A) e Firmicutes (B). No Filo Proteobacteria foram observados os agrupamentos A1 (Gênero *Pantoea*), A2 (Gênero *Enterobacter*), A3 (Gênero *Pseudomonas*) e A4 (Gênero *Rhizobium*) e no Filo Firmicutes, foi observado o agrupamento B1 (Gênero *Bacillus*).

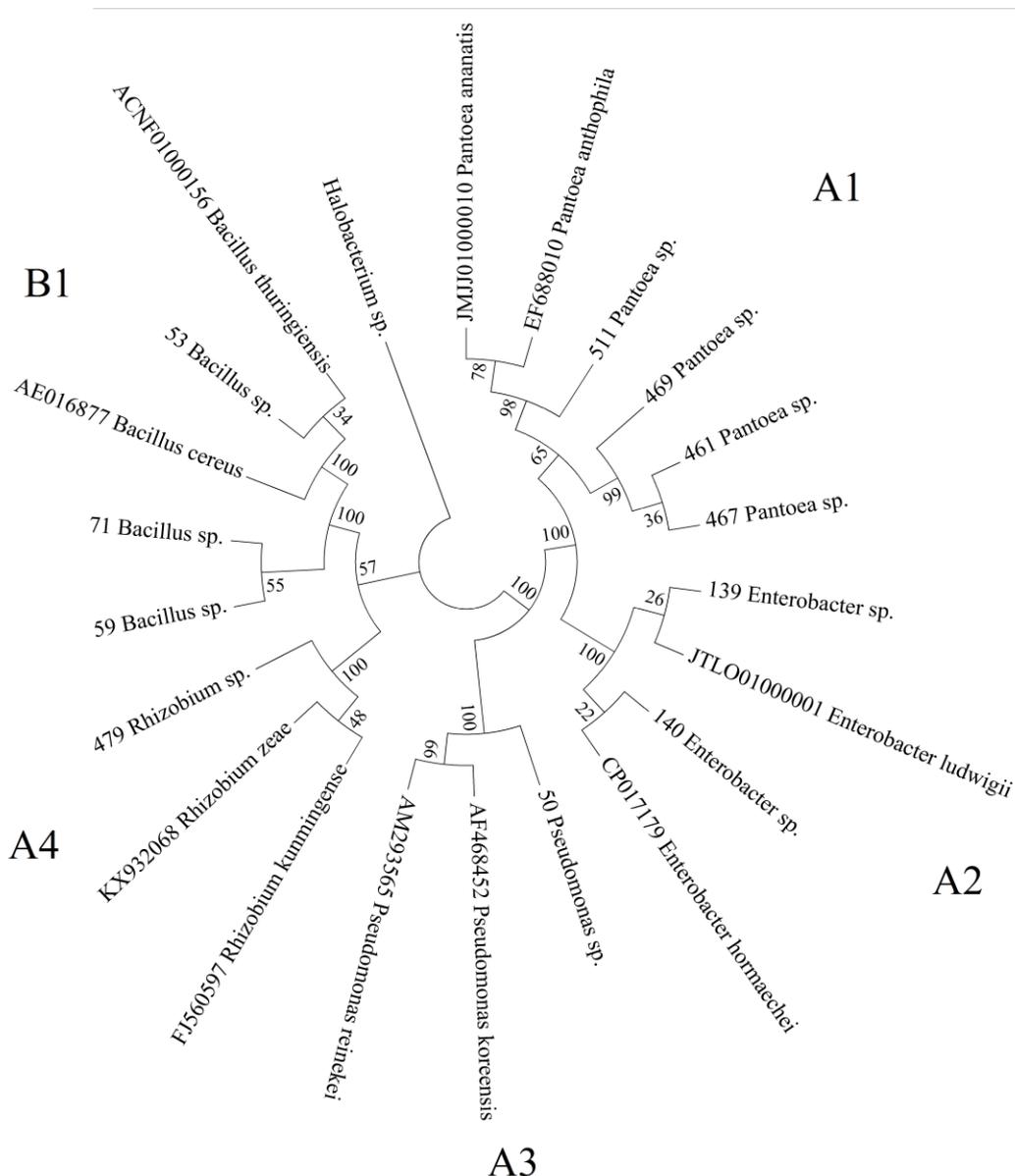


FIGURA 2. Dendrograma dos isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de BGP 26 de *Paspalum notatum*, com base no gene 16S. (A) Proteobacteria e (B) Firmicutes. O número que antecede a identificação do micro-organismo se refere ao código de identificação dos isolados utilizado neste trabalho ou ao código de identificação de micro-organismo do GenBank utilizado para comparação. Fonte: Autor.

Foram encontradas bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) pertencentes a três filos: *Proteobacteria*, *Firmicutes* e *Actinobacteria*. Estudos relacionados a diversidade genética mostram que estes filos são descritos tanto endofíticos quanto rizosféricos (PISA et al., 2011; PRABHA et al., 2018; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006) e costumam ser explorados como bactérias promotoras de crescimento vegetal, por meio de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; DUCA et al., 2014; GOUDA et al., 2018; WHIPPS, 2001).

Neste trabalho, foram encontrados sete gêneros de bactérias: *Bacillus* (4 isolados), *Enterobacter* (22 isolados), *Microbacterium* (um isolado), *Micrococcus* (um isolado), *Pantoea* (10 isolados), *Pseudomonas* (15 isolados) e *Rhizobium* (um isolado).

Os isolados pertencentes ao gênero *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea* e *Rhizobium* foram restritos como endófitos; enquanto *Bacillus*, *Enterobacter* e *Pseudomonas* apareceram em ambos os casos, tanto endófitos como rizosféricos.

Quanto à diversidade entre acessos, apenas isolados do gênero *Rhizobium* foram restritos ao BGP 26, *Microbacterium* e *Micrococcus* foram restritos ao BGP 308, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea* e *Pseudomonas* foram encontrados nos dois acessos.

O isolado 109, endofítico da raiz de BGP 308, foi identificado como *Bacillus*. O gênero *Bacillus* geralmente é dominante na rizosfera (CALVO et al., 2010; RAWAT; IZHARI; KHAN, 2011), porém, podem ser isolados como endofíticos (CHINNASWAMY et al., 2018; MEHTA et al., 2014).

5.1.4 Teste de fixação biológica de nitrogênio *in vitro*

Dentre os isolados identificados por meio de marcador molecular, os 54 isolados possuíam potencial para a FBN. Estes isolados pertenceram a sete gêneros distintos, porém, não foi encontrado nenhum organismo pertencente aos gêneros *Azospirillum*.

Nos trabalhos pioneiro de Johanna Döbereiner realizados com solos rizosféricos de *Paspalum notatum*, foi utilizado o meio NFB, o mesmo meio que foi utilizado neste trabalho, o principal micro-organismo encontrado com potencial para a fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi *Azorhizophilus paspali* (BALDANI et al., 2014).

Gêneros como *Azospirillum*, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pantoea* e *Rhizobium* são relatados como micro-organismo fixadores de nitrogênio (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; GOUDA et al., 2018).

BALDANI et al. (2014) citam diferentes meios de cultura para isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio, dentre eles pode ser observado o meio NFB (DÖBEREINER; BALDANI; BALDINI, 1995), que utiliza o ácido málico como fonte de carbono, originalmente desenvolvido para isolamento de bactérias diazotróficas do gênero *Azospirillum*.

Neste trabalho, bactérias pertencentes a outros gêneros foram encontrados porque, bactérias que utilizam a mesma fonte de carbono e suportem o pH de 6,8 podem se desenvolver no meio NFB (BALDANI et al., 2014).

BALDANI et al. (2014) descrevem ao menos nove meios diferentes utilizados para isolar bactérias diazotróficas, que geralmente tem variação na fonte carbono e pH. Assim, dado que no presente trabalho fez-se a opção de utilizar somente um meio de cultura para isolar bactérias diazotróficas, certamente a comunidade bacteriana cultivável com potencial para a FBN nos dois acessos estudados deverá aumentar se for utilizado outros meios de cultura para os isolamentos.

5.1.5 Teste de solubilização de fosfato *in vitro*

Segundo RAIJ et al. (1997) os teores de fósforo abaixo de 6 mg. dm⁻³ são muito baixo e de 16 a 40 mg. dm⁻³ são médios. O acesso BGP 26 apresentou solo com níveis adequados de fósforo e o BGP308 apresentou níveis muito baixos.

Dentre os isolados identificados taxonomicamente, os isolados 103, 89 e 102, todos do gênero *Enterobacter* e endofíticos de raiz de BGP 308 apresentaram 3,61, 3,58 e 3,56 de índice de solubilização de fosfato (ISF) respectivamente. Estes, foram os que apresentaram maior potencial para a solubilização de fosfato. Os isolados 467 e 461, ambos do gênero *Pantoea* e endofíticos de folha, com 3,34 e 3,21 ISF, respectivamente, foram os que apresentaram maiores ISF entre as bactérias isoladas do BGP 26,

Os principais gêneros de bactérias envolvidos na solubilização de fosfato são *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*,

Enterobacter, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Serratia* (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; GOUDA et al., 2018).

ASSUMPÇÃO et al. (2009) encontraram *Pseudomonas* sp. com ISF de 5,3 e 8,3 e *Pantoea* sp. com ISF de 6,0. SULEMAN et al. (2018) ao prospectar bactérias com potencial para a solubilização de fosfato para a cultura do trigo, encontraram que os melhores resultados foram com *Enterobacter*, apresentando de 2,2 a 5,8 de ISF. Assim, como no presente trabalho, o isolado que apresentou maior ISF foi o que pertencia ao gênero *Enterobacter*.

5.1.6 Teste de produção de ácido indol-acético *in vitro*

Outro mecanismo de promoção de crescimento direto é a produção de ácido indol-acético (AIA). Todos os isolados foram capazes de produzir AIA, a produção variou de 1,15 a 431,41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Dentre os isolados identificados por meio de marcadores moleculares, o isolado 170 (*Pantoea* spp.), endofítico de folha de BGP 308, apresentou 431,41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de produção de AIA, o maior valor observado. Seguidos de 18 isolados do gênero *Enterobacter*, endofíticos de raiz do BGP 308, que apresentaram de 105,05 a 263,74 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA. Em BGP 26 o isolado 140 (*Enterobacter* spp.) apresentou 90,86 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA, o maior valor para os isolados deste acesso.

Gêneros como *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Streptomyces* são relatados como produtores de AIA (DUCA et al., 2014; KHAN et al., 2016).

PEREIRA et al. (2012) obtiveram isolados que apresentaram de 1,89 a 19,37 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA, dentre estes isolados, encontraram *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Pantoea*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*. ASSUMPÇÃO et al. (2009) encontraram organismos produtores de AIA com síntese entre 2,6 e 34,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, dois isolados pertenceram ao gênero *Enterobacter* e foram responsáveis pela produção de 2,6 e 31,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA, porém, o isolado referente ao gênero *Pantoea* foi o que produziu 34,9 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA. Assim como no presente trabalho, foi o isolado referente ao gênero *Pantoea* que apresentou a maior produção de AIA.

Espécies diferentes de plantas reagem de forma diferente a presença do AIA (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017). Devido ao não conhecimento da concentração ótima de AIA nos acessos BGP 26 e BGP 308, buscou-se obter e avaliar tanto bactérias que produziam muito, quanto as que produziam pouco AIA nos testes *in vitro* e *in vivo*.

5.1.7 Teste de antagonismo

Dos 54 isolados avaliados, dois apresentaram resultados positivos para o teste de antagonismo contra o fungo *Bipolaris* sp., fitopatogênico de *Paspalum*. Na Figura 4 é possível verificar a atividade antagonista dos isolados 50 (*Pseudomonas* spp.) e 53 (*Bacillus* spp.), ambos purificados da rizosfera do acesso BGP 26 de *Paspalum notatum*.

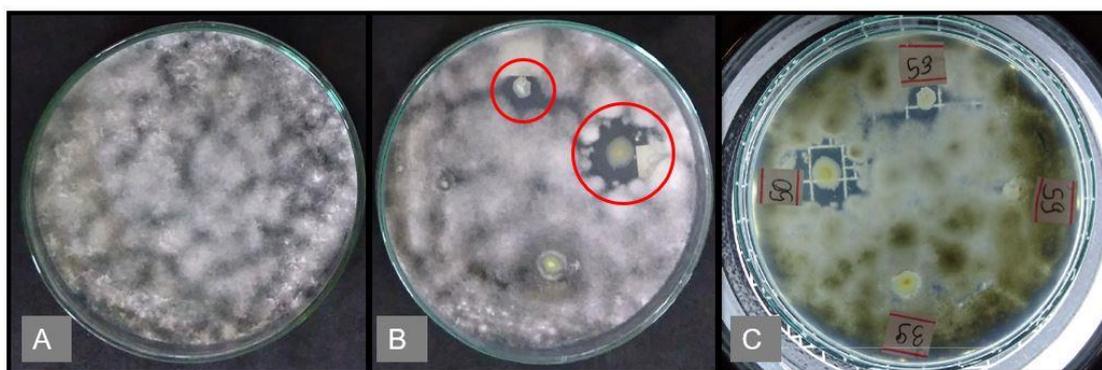


FIGURA 4. Teste de antagonismo contra o fungo *Bipolaris* sp. fitopatogênico de *Paspalum*. A) Placa controle, B) placa aberta, com circunferência mostrando o halo de inibição e, C) placa fechada, mostrando a identificação dos isolados bacterianos com ação antagonista. Fonte: Autor.

Culturas agrícolas necessitam de métodos para proteção contra agentes patogênicos. O biocontrole é um método sustentável e ecológico, frente aos agroquímicos (WARRIOR, 2000).

Alguns gêneros como *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, e *Streptomyces* são descritos como componentes de inoculantes de semente e raiz para biocontroles de patógenos fúngicos em plantas (WHIPPS, 2001).

O isolado 53 tem origem da rizosfera de BGP 26 e foi identificado como pertencente ao gênero *Bacillus*. Existem relatos de *Bacillus* spp. com potencial para

produzir diversos tipos de antimicrobianos, que podem ser utilizados no controle biológico, como bacilomicina, fengicina, iturina, liquenisina, surfactina e micosubtilisina (BARROS et al., 2007; KUMAR; KUMAR; PRATUSH, 2014; STEIN, 2005).

Quanto aos fungos fitopatogênicos do gênero *Bipolaris*, BELLO et al. (2008) encontram *Bacillus cereus* inibindo *Bipolaris sorokiniana in vitro* e DAWUT et al. (2016) observaram *Bacillus subtilis* inibindo de 45,0 a 58,3% a doença causada pelo fungo *Bipolais maydis*, ao aspergir o caldo fermentativo sobre as folhas. No estudo de WANG et al. (2009), quando a suspensão bacteriana de *Bacillus licheniformis* foi pulverizada sobre as folhas de arroz, 70,22% da infecção por *Bipolaris maydis* foi inibida.

O isolado 50 tem origem da rizosfera de BGP 26 e foi identificado como pertencente ao gênero *Pseudomonas*. O gênero *Pseudomonas* é encontrado em ambiente terrestre, aquático e associado a plantas e animais (ÖZEN; USSERY, 2012). Estudos relatam que bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* atuaram contra bactérias, fungos e nematoides, como *Pseudomonas syringae*, *Botrytis cinérea*, *Fusarium oxysporum*, *Peronospora parasítica* e *Meloidogyne javanica* (NEGA, 2014).

Quanto ao *Bipolaris*, *Pseudomonas fluorescens* foi bastante eficiente no biocontrole de *Bipolaris oryzae* em arroz (MOURA et al., 2014). Em outro estudo, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas aurantiaca* foram capazes de inibir o crescimento de *Bipolaris maydes* tanto *in vitro* quanto *in vivo* (FANG et al., 2012; MOHAMED; CAUNTER, 1995).

Estes estudos apresentam diferentes metodologias para utilizar os micro-organismos no biocontrole, como inoculação de suspensão bacteriana em sementes, aspersão de solução bacteriana e aspersão de caldo fermentativo sobre as folhas, métodos que poderão ser abordados futuramente para o controle da mancha foliar em *Paspalum*.

5.2 Promoção de crescimento vegetal *in vivo* por meio de bactérias endofíticas e rizosféricas de *Paspalum atratum*

5.2.1 Germinação de semente

Do total de 108 plântulas referentes aos 36 tratamentos, sete morreram nos estágios iniciais do desenvolvimento.

5.2.2 Análise de componentes principais e teste de médias

O resultado total da análise nutritiva e mineral estão descritos nos anexos 8 e 9 (seções 8.8 e 8.9).

Os resultados dos autovalores da análise de componentes principais revelaram que os componentes principais 1 e 2 explicaram 94% da variação dos descritores observados (Tabela 4).

TABELA 4. Análise de componentes principais dos descritores morfológicos avaliados. Autovalores, diferença entre os componentes, proporção e proporção acumulada estão descritos.

Componentes	Autovalores	Diferença	Proporção	Proporção acumulada
1	717,799403	615,174258	0,8269	0,8269
2	102,625144	68,135846	0,1182	0,9451
3	34,489299	25,929640	0,0397	0,9849
4	8,559659	6,668750	0,0099	0,9947
5	1,890909	0,517598	0,0022	0,9969
6	1,373310	0,707668	0,0016	0,9985
7	0,665642	0,216627	0,0008	0,9993
8	0,449015	0,262112	0,0005	0,9998
9	0,186903		0,0002	1,0000

Na Tabela 5 são apresentados os descritores que mais explicaram a variação observada entre os tratamentos, segundo os componentes principais 1 e 2. Observando o valor de Componente 1², é possível constatar que o descritor mais importante no componente principal 1 foi o fósforo (F), responsável por 98% da variação observada. E observando o valor de Componente 2², é possível constatar que os descritores peso seco aéreo (PSA) e digestibilidade *in vitro* (DIV) foram os descritores que mais representaram a variação entre os descritores, com 71 e 21% da variação observada no componente 2, respectivamente.

TABELA 5. Contribuição dos descritores morfológicos para a análise de componentes principais. As colunas Componente 1² e Componente 2² indicam a importância do descritor para o componente principal 1 e 2 respectivamente em porcentagem.

Descritor	Sigla	Componente 1	Componente 1 ²	Componente 2	Componente 2 ²
Peso seco aéreo	PSA	0,104181	0,01085	0,843163	0,71092
Comprimento de folha	CF	0,022831	0,00052	0,188366	0,03548
Número de folha	NF	-0,005252	0,00003	0,114999	0,01322
Número de perfilho	NP	-0,013816	0,00019	-0,000585	0,00000
Peso seco da raiz	PSR	-0,004564	0,00002	0,05192	0,00270
Proteína bruta	PB	0,040589	0,00165	0,023962	0,00057
Fósforo	P	0,991799	0,98367	-0,119415	0,01426
Potássio	K	-0,012399	0,00015	-0,088668	0,00786
Digestibilidade <i>in vitro</i>	DIV	-0,054036	0,00292	-0,463656	0,21498

Os 36 tratamentos analisados morfológicamente foram submetidos ao Teste t, por meio do descritor peso seco aéreo (PSA).

Quanto ao PSA, as plantas apresentaram médias entre 0,56 e 8,92 g (Tabela 6). Foram observados 21 grupos e médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade pelo teste t. O BFSO105 (*Pseudomonas* spp.) foi o tratamento com maior média de PSA e se apresentou no grupo “a”, o tratamento com menor média foi BSFO170 (*Pantoea* spp.) e se agrupou em “l”.

TABELA 6. Análise dos 36 tratamentos do teste *in vivo* por teste t, considerando o descritor peso seco aéreo. Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade pelo teste de t. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano.

Tratamentos	Peso seco aéreo
BFSO105	8,92a
CFSO	8,61ab
BFSO170	7,36abc
BFSO458	7,35abcd
BFSO25	7,31abcd
BFSO161	6,51abcde
BSFO458	6,33bcde
BFSO109	6,32bcde
BFSO103	5,84cdef
BFCR105	5,53cdefg
BFSE458	4,90cdefgh
BFSO110	4,81defgh
BFCR110	4,13efghi
BFCR458	4,04efghi
BFSE110	3,54fghi
BFCR109	3,49fghij
BSFO105	3,46fghij
BFSE109	3,38fghijk
BSFO103	3,31fghijk
BSFO161	3,20ghijk
BFCR170	3,08ghijkl
BSFO25	3,05ghijkl
BFSE105	2,81hijkl
BSFO110	2,75hijkl
BFCR103	2,69hijkl
BFSE103	2,62hijkl
BSFO109	2,52hijkl
BFSE161	1,95ijkl
CFSE	1,92ijkl
BFSE25	1,87ijkl
CFCR	1,82ijkl
CSFO	1,81ijkl
BFCR161	1,81ijkl
BFCR25	0,96jkl
BFSE170	0,86kl
BSFO170	0,56l

Nos tratamentos com fosfato solúvel, somente o BFSO105 (*Pseudomonas* spp.) apresentou aumento no descritor peso seco aéreo, com 8,92 g e se agrupou em “a”. O CFSO (controle fosfato solúvel) apresentou média de 8,61 g, se agrupando em “ab”. Os tratamentos com fosfato solúvel que mais se distanciaram do CFSO foram BFSO103 (*Enterobacter* spp.) e BFSO110 (*Enterobacter* spp.) com médias de 5,84 e 4,81 g respectivamente, sendo significativamente diferente ao CFSO. Os valores analisados para cada descritor com fosfato solúvel estão descritos na Tabela 7.

TABELA 7. Tratamentos com fosfato solúvel. Descritores utilizados na análise de componentes principais. Peso seco aéreo (PSA), fósforo (P), proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* (DIV), comprimento de folha (CF), número de folha (NF), número de perfilhos (NP) e peso seco da raiz (PSR). As siglas FSO se referem aos tratamentos Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano.

Tratamentos	PSA g	P g kg ⁻¹	PB %	DIV %	CF cm	NF	NP	PSR g
BFSO105	8,92	2,48	11,62	59,31	27,30	25,00	5,50	8,56
CFSO	8,61	1,77	13,27	60,77	45,25	36,00	9,00	7,75
BFSO170	7,36	2,80	12,45	63,48	29,40	29,00	6,00	10,33
BFSO458	7,35	3,02	12,55	64,45	35,50	31,00	8,00	7,08
BFSO25	7,31	3,04	12,56	65,84	36,75	34,00	8,00	8,32
BFSO161	6,51	3,68	13,04	66,14	40,15	43,50	9,00	9,20
BFSO109	6,32	3,67	12,61	65,92	37,10	34,00	9,00	7,35
BFSO103	5,84	6,33	14,75	69,14	41,00	48,00	12,00	6,48
BFSO110	4,81	3,77	13,55	68,88	41,00	46,00	10,50	7,58

A distribuição dos tratamentos com fosfato solúvel pode ser observada no gráfico biplot de componentes principais (Figura 5), onde CFSO se apresenta a direita superior do gráfico. Os CSFO, CFCR e CFSE ficaram distribuídos na parte esquerda inferior do gráfico, opostos ao CFSO.

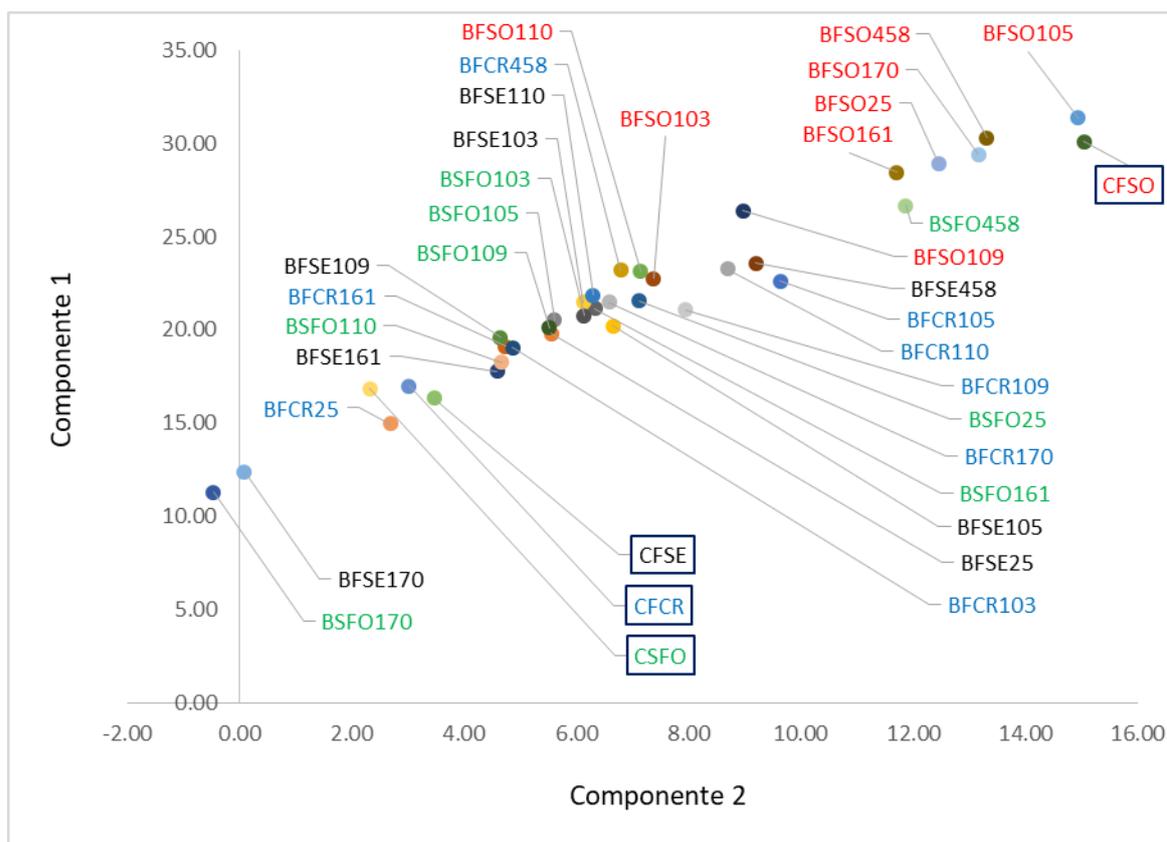


FIGURA 5. Gráfico biplot obtido por meio da análise de componentes principais considerando os seis descritores morfológicos para os componentes 1 e 2. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano. Fonte: Autor.

Era esperado que os controle sem fosfato e os tratados com fosfato insolúvel se distribuísses ao lado oposto do controle com fosfato solúvel. Os tratamentos que apresentaram maior teor de P se distribuíam à direita no gráfico e os que apresentavam maior valores de PSA e DIV se distribuíam na parte superior do gráfico.

O vaso com o tratamento BFSO110 pode ser visualizado na Figura 6.



Figura 6. Tratamento com isolado 110 *Enterobacter* spp., comparativo de promoção de crescimento entre o tratamento Controle Fosfato Solúvel (CFSO) e o tratamento Bacteriano Fosfato Solúvel 110 (BFSO110).
Fonte: Autor.

Nos tratamentos sem fosfato, foi observado que o tratamento BSFO458 (*Pseudomonas* spp.) apresentou aumento significativo no descritor peso seco aéreo em relação ao CSFO (controle sem fosfato). Os dois tratamentos que mais se afastaram do CSFO e mais aproximaram do CFSO (controle fosfato solúvel) foram BSFO458 e BSFO105 (*Pseudomonas* spp.) com médias de 6,33 e 3,46 g respectivamente. Ao observar o gráfico biplot de componentes principais (Figura 5), é possível ver os tratamentos BSFO458 a direita superior do gráfico, mais próximo ao CFSO em relação ao CSFO. Os valores analisados para cada descritor com tratamentos sem fosfato estão descritos na Tabela 8. O tratamento BSFO109 (*Bacillus* spp.) pode ser visualizado na Figura 7.

TABELA 8. Tratamentos sem fosfato. Descritores utilizados na análise de componentes principais. Peso seco aéreo (PSA), fósforo (P), proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* (DIV), comprimento de folha (CF), número de folha (NF), número de perfilhos (NP) e peso seco da raiz (PSR). As siglas SFO e FSO se referem aos tratamentos sem fosfato e fosfato solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano.

Tratamentos	PSA g	P g kg ⁻¹	PB %	DIV %	CF cm	NF	NP	PSR g
CSFO	8,61	1,77	13,27	60,77	45,25	36,00	9,00	7,75
BSFO458	6,33	0,91	13,79	65,15	34,00	22,00	5,00	5,23
BSFO105	3,46	0,90	12,81	63,24	32,50	21,00	4,00	4,38
BSFO103	3,31	0,85	12,52	59,67	31,50	18,00	4,00	5,03
BSFO161	3,20	0,92	13,96	65,18	37,50	23,00	5,00	4,84
BSFO25	3,05	0,67	12,09	59,10	31,00	15,50	4,00	5,44
BSFO110	2,75	0,95	14,80	65,61	40,55	37,00	6,50	4,45
BSFO109	2,52	0,35	12,03	56,97	19,05	8,00	2,00	3,98
CSFO	1,81	0,89	12,66	66,04	23,05	16,50	3,50	4,15
BSFO170	0,56	0,90	12,80	63,10	32,50	20,00	4,00	2,79



FIGURA 7. Tratamento com isolado 109 *Bacillus* spp., comparativo de promoção de crescimento entre o tratamento Controle Sem Fosfato (CSFO) e o tratamento Bacteriano Sem Fosfato 109 (BSFO109). Fonte: Autor.

Nos tratamentos com fosfato cristalino, foi observado que o tratamento BFCR105 (*Pseudomonas* spp.) teve aumento significativo no descritor peso seco aéreo. O CFCR (controle fosfato cristalino) apresentou média de 1,82 g, se agrupando em “ijkl”. Os dois tratamentos que mais se afastaram do CFCR (controle fosfato cristalino) e mais

aproximaram do CFSO (controle fosfato solúvel) foram BFCR105 e BFCR110 (*Enterobacter* spp.) com médias de 5,53 e 4,13 g respectivamente. Os tratamentos BFCR161 e BFCR25 ficaram abaixo do CFCR. Ao observar o gráfico biplot de componentes principais (Figura 5), é possível ver que os tratamentos BFCR105 e BFCR110 apresentaram na parte central do gráfico, mais próximo ao CFSO em relação ao CFCR. Os valores analisados para cada descritor em tratamentos com fosfato cristalino estão descritos na Tabela 9. O tratamento BFCR110 pode ser visualizado na Figura 8.

TABELA 9. Tratamentos com fosfato cristalino. Descritores utilizados na análise de componentes principais. Peso seco aéreo (PSA), fósforo (P), proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* (DIV), comprimento de folha (CF), número de folha (NF), número de perfilhos (NP) e peso seco da raiz (PSR). As siglas FCR e FSO se referem aos tratamentos fosfato cristalino e fosfato solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano.

Tratamentos	PSA g	P g kg ⁻¹	PB %	DIV %	CF cm	NF	NP	PSR g
CFSO	8,61	1,77	13,27	60,77	45,25	36,00	9,00	7,75
BFCR105	5,53	0,69	11,67	57,18	28,50	17,50	4,00	6,30
BFCR110	4,13	0,76	13,26	61,43	33,30	22,00	6,00	6,12
BFCR458	4,04	0,87	13,36	61,90	35,80	26,00	6,00	5,68
BFCR109	3,49	0,64	11,52	56,92	27,15	13,00	3,00	6,75
BFCR170	3,08	0,72	12,62	60,23	31,00	18,50	4,50	4,55
BFCR103	2,69	0,95	15,11	62,92	39,75	28,50	7,00	5,49
CFCR	1,82	0,86	12,81	60,61	27,00	14,00	4,00	5,20
BFCR161	1,81	0,76	12,84	60,79	33,00	20,00	5,00	3,94
BFCR25	0,96	0,93	14,13	62,82	38,00	27,00	7,00	3,51

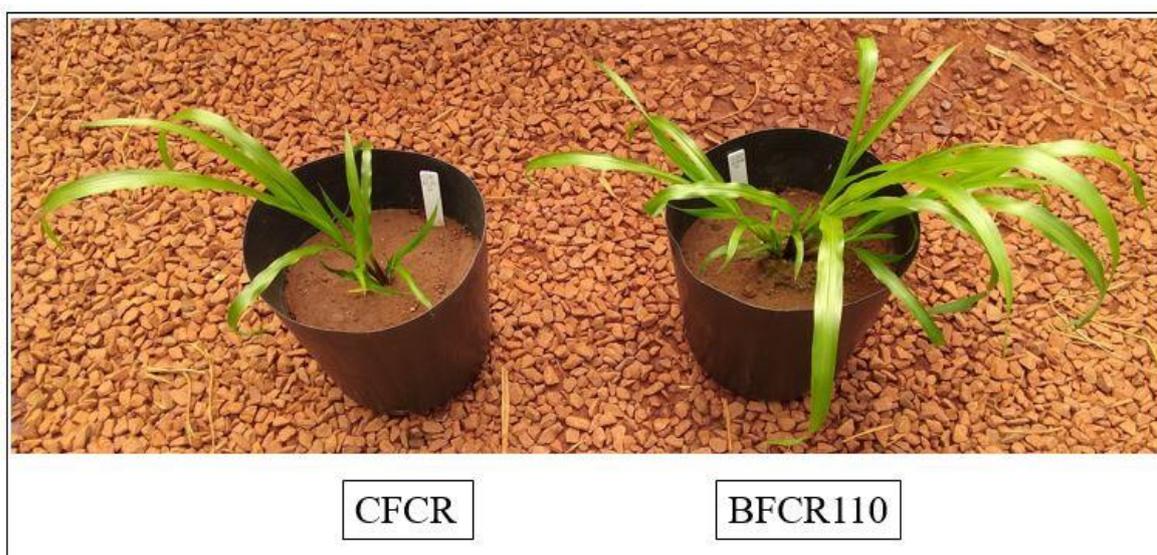


FIGURA 8. Tratamento com isolado 110 *Enterobacter* spp., comparativo de promoção de crescimento entre o tratamento Controle Fosfato Cristalino (CFCR) e o tratamento Bacteriano Fosfato Cristalino 109 (BFCR109). Fonte: Autor.

Nos tratamentos com fosfato sedimentar, foi observado aumento significativo no descritor peso seco aéreo no tratamento BFSE458 (*Pseudomonas* spp.). O controle fosfato sedimentar (CFSE) apresentou média de 1,92 g, se agrupando em “ijkl”. Os dois tratamentos que mais se afastaram do CFSE e mais aproximaram do CFSO (controle fosfato solúvel) foram BFSE458 (*Pseudomonas* spp.) e BFSE110 (*Enterobacter* spp.) com médias de 4,90 e 3,54 g respectivamente. Os tratamentos BFSE25 (*Pseudomonas* spp.) e BFSE170 (*Pantoea* spp.) ficaram abaixo do CFSE com média de 1,87 e 0,86 g respectivamente. Ao observar o gráfico biplot de componentes principais (Figura 5) é possível ver o tratamento BFSE458 na parte central do gráfico, mais próximo ao CFSO em relação ao CFSE. Os valores analisados para cada descritor em tratamentos com fosfato sedimentar estão descritos na Tabela 10. O tratamento BFSE110 pode ser visualizado na Figura 9.

TABELA 10. Tratamentos com fosfato sedimentar. Descritores utilizados na análise de componentes principais. Peso seco aéreo (PSA), fósforo (P), proteína bruta (PB), digestibilidade *in vitro* (DIV), comprimento de folha (CF), número de folha (NF), número de perfilhos (NP) e peso seco da raiz (PSR). As siglas FSE e SFO se referem aos tratamentos fosfato sedimentar e fosfato solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano.

Tratamentos	PSA g	P g kg ⁻¹	LF mm	PB %	DIV %	CF cm	NF	NP	PSR g
CFSO	8,61	1,77	19,15	13,27	60,77	45,25	36,00	9,00	7,75
BFSE458	4,90	0,70	14,87	12,73	59,31	29,50	18,00	4,50	5,99
BFSE110	3,54	0,90	16,87	13,93	63,89	35,50	24,50	5,00	6,55
BFSE109	3,38	2,94	17,52	13,97	66,23	36,05	30,00	8,00	4,68
BFSE105	2,81	0,83	16,54	12,76	61,30	32,50	19,00	5,00	4,37
BFSE103	2,62	0,63	12,54	11,44	57,41	16,00	10,50	2,50	4,03
BFSE161	1,95	0,79	15,22	12,74	59,64	31,00	18,50	4,50	4,94
CFSE	1,92	0,68	13,67	11,90	60,31	26,75	14,50	3,50	5,45
BFSE25	1,87	0,65	14,05	11,64	57,66	27,60	17,50	4,00	6,85
BFSE170	0,86	0,84	16,63	12,94	63,13	34,50	22,00	5,00	3,55



FIGURA 9. Tratamento como isolado 110 *Enterobacter* spp., comparativo de promoção de crescimento entre o tratamento Controle Fosfato Sedimentar (CFSE) e o tratamento Bacteriano Fosfato Sedimentar 110 (BFSE110). Fonte: Autor.

5.2.3 Análise morfológica do peso seco da raiz

Dentre os tratamentos analisados, o peso seco da raiz (PSR) variou de 2,79 a 10,33 g. Os tratamentos que apresentaram maiores valores de PSR foram BFSO105 (8,56 g), BFSO161 (9,20 g) e BFSO170 (10,33 g). Os tratamentos que apresentaram menores valores de PSR foram BFSE170 (3,55 g), BFCR25 (3,51 g) e BSFO170 (2,79 g). O isolado 170 apresentou aumento no PSR somente no tratamento com fosfato solúvel, nos tratamentos com fosfato cristalino, sedimentar e sem fosfato houve diminuição no PSR quando foram inoculados com o isolado 170.

A Figura 10 mostra a diferença entre os tratamentos para o PSR. É possível visualizar que os tratamentos BFSO170 (*Pantoea* spp.), BFSO161 (*Pseudomonas* spp.), BFSO105 (*Pseudomonas* spp.) e BFSO25 (*Pseudomonas* spp.) apresentaram aumento nos valores de PSR em relação ao controle fosfato solúvel (CFSO).

Os controles fosfato cristalino (CFCR) e fosfato sedimentar (CFSE) tiveram valores próximos de PSR. O controle com menor valor de PSR foi o CSFO e o maior foi o CFSO.

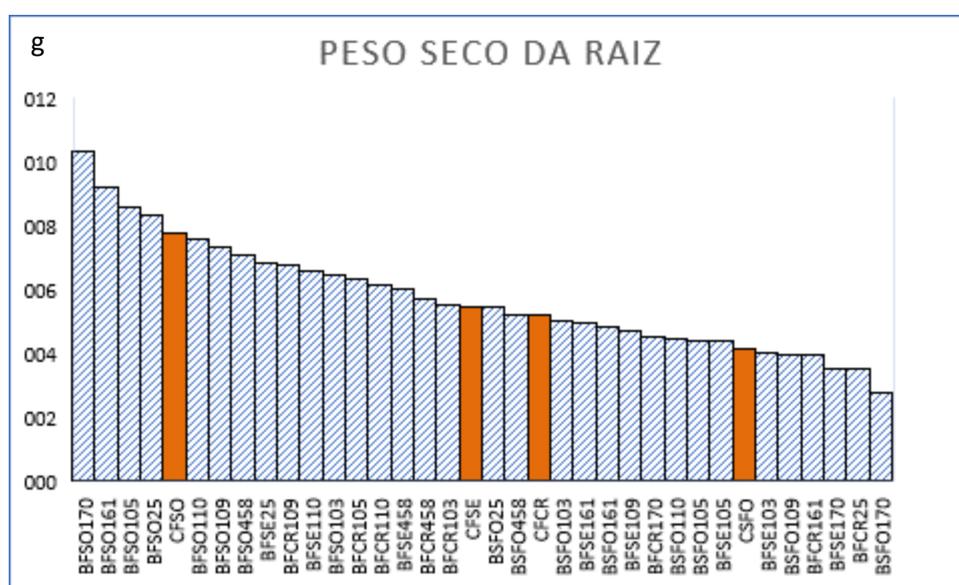


Figura 10. Comparativo de peso da raiz entre os tratamentos. Os controles estão em cor sólida. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano. Fonte: Autor.

Ao relacionar o peso seco da raiz com a concentração de ácido indol-acético produzido pelas bactérias selecionadas no teste *in vitro*, foi possível observar que, o isolado 110 (*Enterobacter* spp.) que produziu 87,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA, esteve relacionado a maior média de peso seco da raiz (PSR), com 6,33 g (Tabela 11). A média do tratamento controle (sem inoculação de bactérias produtoras de AIA) apresentou 5,32 g, a segunda menor média de PSR. O isolado 170 (*Pantoea* spp.) produziu 431,41 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, a maior produção de AIA e menor média de PSR com 4,05 g.

TABELA 11. Relação peso seco da raiz e ácido indol-acético. A sigla PSR significa peso seco da raiz. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel, respectivamente.

Isolado	PSR FCR g	PSR FSE g	PSR FSO g	PSR SFO g	Média PSR g	Ácido indol-acético $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Controle	5,20	5,45	7,75	4,15	5,32	0
109	6,75	4,68	7,35	3,98	5,71	18,26
25	3,51	6,85	8,32	5,44	6,14	44,85
458	5,68	5,99	7,08	5,23	5,84	65,12
161	3,94	4,94	9,20	4,84	4,89	72,15
110	6,12	6,55	7,58	4,45	6,33	87,6
103	5,49	4,03	6,48	5,03	5,26	165,29
105	6,30	4,37	8,56	4,38	5,34	166,95
170	4,55	3,55	10,33	2,79	4,05	431,41

O AIA é utilizado como um fitorregulador no enraizamento e existem diferentes estudos relatando esta função (CENTELLAS et al., 1999; MENEGUZZI et al., 2015; MOHITE, 2013). Ao avaliar *Pseudomonas putida* mutantes e selvagens, PATTEN; GLICK, (2002) confirmou que o AIA bacteriano interfere no desenvolvimento radicular. As bactérias selvagens apresentaram raízes mais longas, de 35 a 50% em relação a mutante deficiente de produção de AIA.

Em um estudo com alfafa, KHALIFA; SALEH, (2016) ao caracterizarem a bactéria *Enterobacter cloacae* msr1 isolada de raízes de *Medicago sativa* (alfafa), descreveram a produção de AIA de 112 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pela bactéria, ao ser inoculada na planta de *Medicago sativa* aumentou o peso seco da raiz e o número de raízes laterais. SULEMAN et al. (2018) encontraram *Pseudomonas* sp. e *Enterobacter* sp. produzindo 25,6 e 28,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, de AIA. Ao inocular estas bactérias em sementes de trigo foi possível visualizar que o isolado aumentou significativamente a porcentagem de

germinação e alguns parâmetros das raízes, como número de pontas e número de bifurcações.

No presente trabalho, o PSR aumentou em relação a elevação da concentração do AIA até certo ponto e depois começou a diminuir conforme o AIA continuava a aumentar. Esta ocorrência pode estar relacionado ao fato de haver um ponto ótimo de concentração de AIA para cada espécie (OLANREWAJU; GLICK; BABALOLA, 2017), ultrapassando o ponto ótimo, o fitorregulador se torna nocivo às plantas (CENTELLAS et al., 1999; MENEGUZZI et al., 2015).

5.2.4 Análise mineral de fosfato

Dentre os tratamentos analisados, o fósforo variou de 0,35 a 6,33 g kg⁻¹. Os tratamentos que apresentaram maior teor de fósforo foram BFSO103 (6,33 g kg⁻¹), BFSO110 (3,77 g kg⁻¹) e BFSO161 (3,68 g kg⁻¹). Os tratamentos que apresentaram menor teor de fósforo foram BFCR109 (0,64 g kg⁻¹), BFSE103 (0,63 g kg⁻¹) e BSFO109 (0,35 g kg⁻¹).

A Figura 11 mostra a diferença entre os tratamentos quanto a presença de fósforo na matéria seca. É possível visualizar o grande aumento no teor de fósforo do tratamento BFSO103 em relação ao controle fosfato solúvel (CFSO), proporcionado por meio da inoculação do isolado 103 (*Enterobacter* spp.).

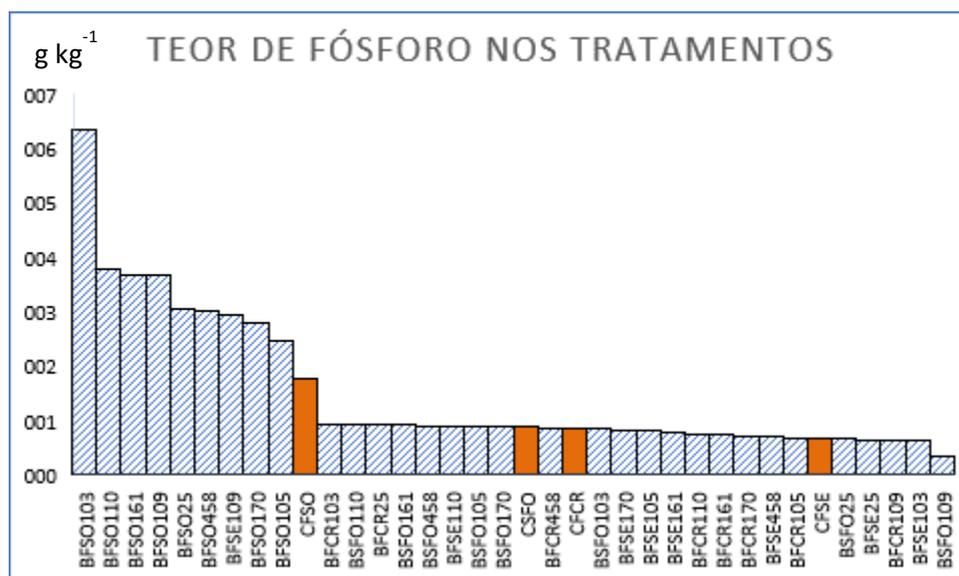


FIGURA 11. Comparativo de teor de fósforo na matéria seca entre os tratamentos. Os controles estão em cor sólida. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano. Fonte: Autor.

Os controles sem fosfato (CSFO), fosfato cristalino (CFCR) e fosfato sedimentar (CFSE) tiveram teores próximos de fósforo na matéria seca e se distanciaram do controle fosfato solúvel (CFSO), que apresentou o maior teor de fósforo dentre os controles. O BFSE109 (*Bacillus* spp.) foi o único tratamento que recebeu um tipo de fosfato insolúvel (sedimentar) e foi capaz de igualar e superar o teor de fósforo observado na matéria seca do CFSSO.

Ao buscar bactérias com potencial para a solubilização de fosfato em ervilhas, OTEINO et al. (2015) realizaram um experimento envolvendo bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. Foi utilizado um fosfato solúvel como controle e o fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) insolúvel nos tratamentos. Foram observados isolados que aumentaram o teor de fósforo na planta em relação ao controle insolúvel, mas nenhum tratamento se igualou ou superou os teores de fósforo presentes na matéria seca das plantas tratadas com o fosfato solúvel. Neste trabalho os resultados foram muito semelhantes a esses apresentados por (OTEINO et al., 2015), porém, as bactérias também foram testadas no fosfato solúvel e foi observado que os isolados possuíam a capacidade de otimizar o uso do fosfato solúvel.

Os teores de fósforo na matéria seca para bovinos em fase de crescimento e terminação são variáveis, em fase de gestação e lactação são de 1,4-2,0 e 1,6 g kg⁻¹

respetivamente (NICODEMO; LAURA; MOREIRA, 2008). No presente trabalho, dez tratamentos apresentaram resultados superiores a $1,4 \text{ g kg}^{-1}$ de fósforo. PRIMAVESI et al. (2006) avaliaram os nutrientes na fitomassa de capim-marandu (*Brachiaria brizantha*) em respostas a fontes e doses de nitrogênio, com fósforo e potássio corrigidos. O experimento foi conduzido no período de Novembro a Maio na Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos/SP. Foram usadas três doses de N: 50, 100 e $200 \text{ kg ha}^{-1} \text{ corte}^{-1}$ e controle sem adubação nitrogenada. Os resultados mostraram que o fósforo variou de 2,8 a $3,3 \text{ g kg}^{-1}$. No presente trabalho, o fósforo variou de 0,35 a $6,33 \text{ g kg}^{-1}$. Os tratamentos BFSO103 (*Enterobacter* spp.), BFSO110 (*Enterobacter* spp.), BFSO161 (*Pseudomonas* spp.) e BFSO109 (*Bacillus* spp.) apresentaram teores de fósforo superiores aos $3,3 \text{ g kg}^{-1}$ encontrado por PRIMAVESI et al. (2006) para o Capim-Marandu.

As plantas com sintomas da deficiência de fósforo podem apresentar crescimento reduzido e coloração verde-escura das folhas, as quais podem ter manchas necróticas e pode ocorrer a produção de antocianina. Estes sintomas aparecem geralmente nas folhas mais velhas, pois o fósforo é móvel e pode migrar para as folhas novas (TAIZ, L.; ZEIGER, 2013). Dos sintomas relacionados à falta de fósforo na planta, somente a presença de antocianina foi observada. Foram observados 22 tratamentos com a presença de antocianina nas folhas em ao menos uma das três repetições. O total de 14 tratamentos não apresentaram nenhum sintoma referente à falta deste mineral.

5.2.5 Análise nutritiva de proteína bruta

Dentre os tratamentos analisados, a PB variou de 11,44% a 15,11. Os três tratamentos que apresentaram maior valor de PB foram com fosfato cristalino BFCR103 (15,11%), sem fosfato BSFO161 (14,80%) e fosfato solúvel BFSO103 (14,75%). Os tratamentos que apresentaram menor teor de PB foram BFSO105 (11,62%), BFCR109 (11,52) e BFSE110 (11,44%).

A Figura 12 mostra a diferença entre os tratamentos quanto a presença de proteína bruta na matéria seca. É possível visualizar que os tratamentos BFCR103 (*Enterobacter* spp.), BSFO161 (*Pseudomonas* spp.) e BFSO103 (*Enterobacter* spp.) foram os que mais apresentaram aumento no teor de PB em relação ao controle fosfato solúvel (CFSO).

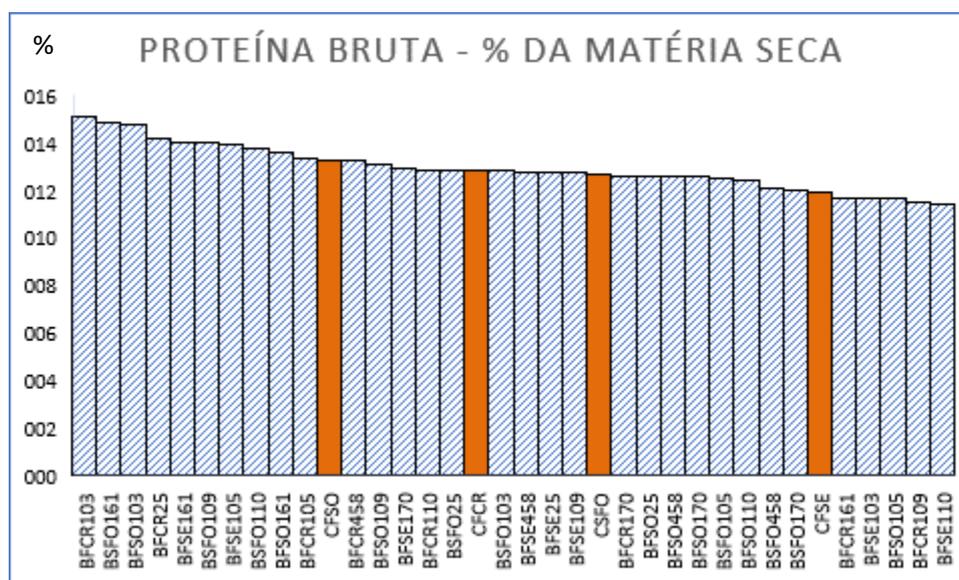


FIGURA 12. Comparativo de teor de proteína bruta na matéria seca entre os tratamentos. Os controles estão em cor sólida. As siglas FCR, FSE, SFO e SFO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano.

Fonte: Autor.

LEITE et al. (2001) estudaram o crescimento e composição química do capim *Paspalum atratum* cv Pojuca durante o período chuvoso, com tratamentos em solo com níveis de nutrientes satisfatório e adubação nitrogenada. Foram encontrados teores entre 6,90 a 12,11% de PB. Ao amostrar teores nutritivos de três cultivares, PORTO et al. (2009) encontraram teores de PB de 11,1%, 11,9% e 9,4%, respectivamente, para Capim-tanzânia, Grama-estrela e Capim-marandu.

Teores de proteína bruta menores que 7% na matéria seca são limitantes para a nutrição animal (ABREU et al., 2006). Todos os tratamentos estudados neste trabalho apresentaram teor de proteína superior a 7%, variando de 11,44 a 15,11%, valores superiores ao encontrado por LEITE et al. (2001) para cultivar Pojuca (*Paspalum atratum*) e por PORTO et al. (2009) para as cultivares Capim-tanzânia, Grama-estrela e Capim-marandu. O folder de apresentação da cultivar Pojuca (KARIA; DE ANDRADE, 2001) descreve a cultivar com teor de proteína nas folhas entre 8 a 10%. Os valores encontrados neste trabalho também foram superiores aos resultados obtidos por LOPES et al. (2010) para as forragens *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*, que variou de 6,4 a 7,5% da PB na matéria seca.

O teor de PB está correlacionada ao teor de N na planta. Para calcular a PB o teor de nitrogênio é multiplicado por 6,25 (DE MEDEIROS; GOMES; BUNGENSTAB, 2015; DRUZIAN et al., 2012). Os sintomas da deficiência de nitrogênio incluem clorose e a produção de antocianina (TAIZ, L.; ZEIGER, 2013). Destes sintomas, alguns tratamentos apresentaram somente a presença de antocianina.

Neste trabalho, nenhum dos tratamentos receberam adubação nitrogenada e muitos deles tiveram resultados superiores de PB em relação a outros estudos que avaliaram cultivares que já estão no mercado, em estudo com solo corrigido. Mesmo o controle sem fosfato (CSFO), que não recebeu nenhum tipo de fosfato e nem inóculo bacteriano, mostrou resultados de PB superiores aos encontrados por LEITE et al. (2001). Este fato evidencia potencial do acesso para ser utilizado como planta forrageira.

5.2.6 Análise nutritiva de digestibilidade *in vitro*

Dentre os tratamentos analisados, a DIV variou de 56,92 a 69,14%. Os três tratamentos que apresentaram maiores valores de DIV foram BFSO103 (69,14%), BFSO170 (68,88%) e BFSE110 (66,23%). Os tratamentos que apresentaram menores teores de DIV foram BFCR103 (57,18%), BSFO161 (56,97%) e BFCR105 (56,92%).

A Figura 13 mostra a diferença entre os tratamentos quanto ao teor da digestibilidade *in vitro* na matéria seca. É possível visualizar que os tratamentos BFSO103 (*Enterobacter* spp.), BFSO170 (*Pantoea* spp.) e BFSE110 (*Enterobacter* spp.) apresentaram aumento no teor de DIV em relação ao controle fosfato solúvel (CFSO).

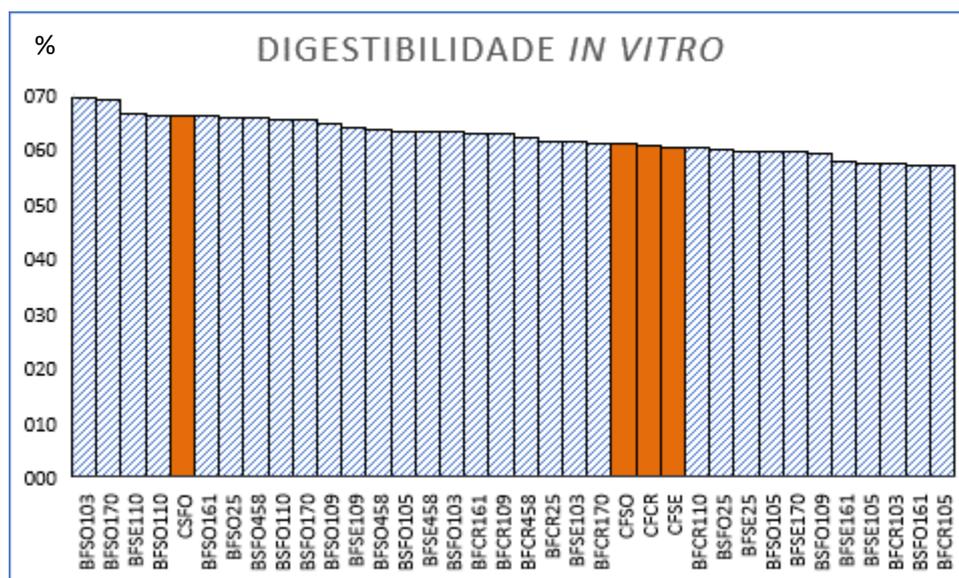


FIGURA 13. Comparativo de teor de digestibilidade *in vitro* na matéria seca entre os tratamentos. Os controles estão em cor sólida. As siglas FCR, FSE, SFO e FSO se referem aos tratamentos Fosfato Cristalino, Fosfato Sedimentar, Sem Fosfato e Fosfato Solúvel. O número que sucede o tratamento se refere ao código do isolado bacteriano testado. A letra “C” que antecede o tratamento se refere ao controle e “B” a bacteriano. Fonte: Autor.

LEITE et al. (2001) encontraram teor de DIV (digestibilidade *in vitro*) entre 61,09 a 64,48% no capim *Paspalum atratum* cv Pojuca e PORTO et al. (2009) encontraram teores de DIV de 61,60%, 59,40% e 64,00%, respectivamente, para Capim-tanzânia, Grama-estrela e Capim-marandu.

A DIV é importante para a obtenção de energia. Um material não digerido e eliminado pelas fezes representa perda de energia (DE MEDEIROS; GOMES; BUNGENSTAB, 2015). Material com menor digestibilidade causa uma passagem mais lenta, que pode influenciar no funcionamento dos micro-organismos do rúmen (DE MEDEIROS; GOMES; BUNGENSTAB, 2015). No presente trabalho, a DIV variou de 56,92 a 69,14%. Foram observados 10 tratamentos que tiveram digestibilidade superiores aos encontrados por LEITE et al. (2001) e PORTO et al. (2009). Onze tratamentos do presente trabalho apresentaram teores acima das forrageiras do gênero *Brachiaria* analisadas por LOPES et al. (2010).

Os três descritores mais representativos na análise de componentes principais foram PSA, P e DIV. O PB representa o teor de nitrogênio e o PSR tem relação com o AIA. Ao analisar estes descritores, foi possível estabelecer que o melhor isolado para os tratamentos sem fosfato e com fosfato cristalino foi o 458 (*Pseudomonas* spp. de

rizosfera), no fosfato sedimentar foi o 110 (*Enterobacter* spp. de raiz) e no fosfato solúvel foram os isolados 103 e 110, ambos *Enterobacter* spp. de raiz.

Algo importante a ser considerado é que algumas bactérias isoladas do acesso BGP 308 foram capazes de ser reinoculadas no próprio acesso, ocasionando promoção de crescimento vegetal. BATISTA et al. (2018) avaliaram rizobactérias cultiváveis associadas ao guaraná (*Paullinia cupana*) e encontraram *Bacillus* sp. e *Burkholderia ambifaria* com potencial para a promoção de crescimento vegetal. No entanto, a inoculação destas bactérias no próprio guaraná não apresentou resultados *in vivo*. Quando inoculados em milho e soja, os autores obtiveram sucesso. Assim, os isolados obtidos neste trabalho poderão ser testados em outros acessos de *Paspalum* ou até em outras culturas de interesse agrícola e econômico.

CONG et al. (2009) desenvolveram o inoculante BioGro a base de *Pseudomonas* spp., *Bacillus amyloliquefaciens* e *B. subtilis* para a cultura de arroz. Foi observado que o inoculante aumentou significativamente a qualidade dos grãos, o teor de nitrogênio e a absorção de fósforo. O consórcio de bactérias pode ser uma alternativa para encontrar um inoculante ideal para plantas de forragem e cobertura de solo estudadas neste trabalho.

6. CONCLUSÕES

Tendo em vista os objetivos propostos e os resultados obtidos no presente trabalho, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

A comunidade bacteriana endofítica e rizosférica cultivável pode ser isolada a partir de amostras de solo, raiz e folhas de *Paspalum atratum* e *P. notatum*, sendo que, destes, diferentes gêneros bacterianos cultiváveis possuem potencial para a promoção de crescimento vegetal, tanto direto quanto indireto;

Os isolados bacterianos com potencial para a promoção de crescimento vegetal pertenceram aos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*;

Quanto à diversidade entre acessos, apenas isolados referentes aos gêneros *Rhizobium* foram restritos ao BGP 26; *Microbacterium* e *Micrococcus* foram restritos ao BGP 308;

Isolados pertencentes aos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* da rizosfera de BGP 26 foram capazes de inibir o crescimento de *Bipolaris* sp.;

O isolado 110 (*Enterobacter* spp. de raiz) apresentou melhores resultados no aumento no teor de fósforo e proteína bruta;

A concentração de AIA que esteve melhor relacionada ao aumento peso seco da raiz foi de 87,6 produzido por meio do isolado 110 (*Enterobacter* spp.);

Os isolados 103 (*Enterobacter* spp. de raiz), 110 (*Enterobacter* spp. de raiz) e 458 (*Pseudomonas* spp. de rizosfera) foram os que apresentaram melhores resultados no teste de promoção de crescimento vegetal *in vivo*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, E. M. A. DE et al. Produção de forragem e valor nutritivo de espécies forrageiras sob condições de pastejo, em solo de várzea baixa do Rio Guamá. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 1, p. 11–18, 2006.

AFZAL, I. et al. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological Research**, v. 221, p. 36–49, 2019.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 2014.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.

ALVES, S. B.; MOINO JR, A.; ALMEIDA, J. E. M. **Controle microbiano de insetos**. São Paulo: FEALQ, 1998.

AMARAL, J. A.; CASTILHO, R. M. M. Fertilizantes comerciais de liberação imediata e controlada na revitalização de grama batatais. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, v. 22, n. 2, p. 1–11, 2012.

ANDREOLLI, M. et al. *Pseudomonas protegens* MP12: A plant growth-promoting endophytic bacterium with broad-spectrum antifungal activity against grapevine phytopathogens. **Microbiological Research**, v. 219, p. 123–131, 2019.

ANJOS, J. R. N. et al. Ocorrência de *Bipolaris maydis* causando mancha foliar em *Paspalum atratum* cv. Pojuca no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 656–658, 2004.

ARAÚJO, W. L. et al. **Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização**. Santarém: UFOPA, 2014.

ASSUMPCÃO, L. DE C. et al. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 5, p. 503–510, 2009.

AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. **Fungi: multifaceted microbes**, v. 1, p. 189–207, 2007.

BALDANI, J. I. et al. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, n. 1–2, p. 413–431, 2014.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.

BARRATT, B. I. P. et al. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. **BioControl**, v. 63, p. 155–167, 2018.

BARRO, R. S. et al. Forage yield and nitrogen nutrition dynamics of warm-season native forage genotypes under two shading levels and in full sunlight. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 7, p. 1589–1597, 2012.

BARROS, F. F. C. et al. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409–414, 2007.

BATISTA, B. D. et al. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v. 206, p. 33–42, 2018.

BATISTA, L. A. R.; GODOY, R. Caracterização Preliminar e Seleção de Germoplasma do Gênero *Paspalum* para Produção de Forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 23–32, 2000.

BERNHARD, A. The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. **Nature Education Knowledge**, v. 3, n. 10, p. 25, 2010.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327–1350, 2012.

BISWAS, S. K. et al. A Review on Impact of Agrochemicals on Human

Health and Environment: Bangladesh Perspective. **Plant Environment Development**, v. 3, n. 2, p. 31–35, 2014.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and environmental microbiology**, v. 57, p. 535–538, 1991.

BÜCHI LABORTECHNIK, A. **Nircal 5.2 Manual Quick Guide Nirware**. Flawil, Switzerland Büchi Labortechnik AG, 2007.

CALVO, P. et al. Characterization of bacillus isolates of potato rhizosphere from Andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 899–906, 2010.

CASTRO, A. C. R. et al. **Evaluation of native Brazilian *Paspalum* germplasm as lawn for landscaping purpose**. XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014). **Anais...2014**

CASTRO, A. C. R. et al. Characterization of *Paspalum* accessions as ornamental lawn. **Acta Horticulturae**, v. 1087, p. 255–259, 2015.

CENTELLAS, A. Q. et al. EFEITO DE AUXINAS SINTÉTICAS NO ENRAIZAMENTO. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 2, p. 181–186, 1999.

CHAVES, L. H. G.; CHAVES, I. DE B.; MENDES, J. DA S. Adsorção de fósforo em materiais de Latossolo e Argissolo. **Revista Caatinga**, v. 20, n. 3, p. 104–111, 2007.

CHINNASWAMY, A. et al. A nodule endophytic *Bacillus megaterium* strain isolated from *Medicago polymorpha* enhances growth, promotes nodulation by Ensifer medicae and alleviates salt stress in alfalfa plants. **Annals of Applied Biology**, v. 172, n. 3, p. 295–308., 2018.

COELHO, F. E. et al. Brazil unwisely gives pesticides a free pass. **Science**, v. 365, n. 6453, p. 552–553., 2019.

CONAB. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=20>>. Acesso em: 31 maio. 2019.

CONG, P. T. et al. Inoculant plant growth-promoting microorganisms enhance utilisation of urea-N and grain yield of paddy rice in southern Vietnam. **European journal of soil biology**, v. 45, p. 52–61, 2009.

DAHMER, N. et al. CYTOGENETIC DATA FOR *Paspalum notatum*

FLÜGGE ACCESSIONS. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 4, p. 381–388, 2008.

DAL BELLO, G. M. et al. Relationship between an in vitro and greenhouse assay for biological control of *Bipolaris sorokiniana*-induced seedling blight of wheat. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 26, n. 2, p. 103–119, 2008.

DAWUT, M. et al. Biocontrol Potentiality of Active Ingredients from Endophytic *Bacillus subtilis* Isolated from *Alhagi pseudalhagi* Desv on Maize Spot Diseases. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1–11, 2016.

DE MEDEIROS, S. R.; GOMES, R. C.; BUNGENSTAB, D. J. **Nutrição de bovinos de corte Fundamentos e aplicações**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte-Livro técnico, 2015.

DIAS, E. G.; LAJOLO, R. D. O meio ambiente na produção de fertilizantes fosfatados no Brasil. In: **Agrominerais para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010. p. 105–124.

DINATO, N. B. et al. Importância da Criopreservação de Grãos de Pólen em Gramíneas Forrageiras. **Revista RG News**, v. 2, n. 2, p. 79–87, 2016.

DINATO, N. B. et al. Storage of bahiagrass pollen at different temperatures. **Crop Science**, v. 58, n. 6, p. 2391–2398, 2018.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107–149, 2003.

DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 357–365, 1966.

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

DOBEREINER, J.; DAY, J. M.; DART, P. J. Nitrogenase Activity and Oxygen Sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* Association. **Journal of General Microbiology**, v. 71, p. 103–116, 1972.

DRUZIAN, J. I. et al. Influência da dieta suplementada com óleo de soja na composição centesimal e perfil lipídico de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, p. 85–92, 2012.

DUCA, D. et al. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85–125, 2014.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic acids research**, v. 32, p. 1792–1797, 2004.

ELJOUNAIDI, K.; LEE, S. K.; BAE, H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. **Biological Control**, v. 103, p. 62–68, 2016.

EMBRAPA/CERNAGEN. **Alelo**. Disponível em: <<http://alelo.cenagen.embrapa.br/AleloConsultas/Pa>>. Acesso em: 20 out. 2019.

FANG, R. et al. Promotion of plant growth, biological control and induced systemic resistance in maize by *Pseudomonas aurantiaca* JD37. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 1177–1185, 2012.

FONTOURA, S. M. V. et al. Eficiência técnica de fertilizantes fosfatados em Latossolo sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 1907–1914, 2010.

GARRITY, G. M. et al. **Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York, Berlin, Heidelberg: Springer, 2004.

GERHARDSON, B. Biological substitutes for pesticides. **Trends in Biotechnology**, v. 8, p. 338–343, 2002.

GOUDA, S. et al. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131–140, 2018.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 395–412, 2005.

GUEDES, E. M. S. et al. Fosfato natural de Arad e calagem e o crescimento de *Brachiaria brizantha* em latossolo amarelo sob pastagem degradada na Amazônia. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 52, p. 117–129, 2009.

GUSMÃO, M. R. et al. Plant Resistance Warm-Season (C4) Turfgrass Genotypes Resistant to Spittlebugs (Hemiptera : Cercopidae). **Journal of Economic Entomology Advance**, p. 1–8, 2016.

GYANESHWAR, P. et al. Role of soil microorganisms in improving P

nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, p. 83–93, 2002.

HALL, T. BioEdit : a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95 / 98 / NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95–98, 1999.

HEYDARI, A.; PESSARAKLI, M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. **Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 4, p. 273–290, 2010.

HUNGRIA, M. et al. The Importance of Nitrogen Fixation to Soybean Cropping in South America. In: **Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment**. Dordrecht: Springer, 2005. p. 25–42.

HUSEN, E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 4, p. 27–31, 2016.

INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION. Disponível em: <<https://www.ifastat.org/databases/plant-nutrition>>. Acesso em: 30 maio. 2019.

KARIA, C. T.; DE ANDRADE, R. P. Cultivo do Capim Pojuca. **Embrapa Cerrados**, v. 50, p. 1–2, 2001.

KHALIFA, A. Y. Z.; SALEH, F. A. Characterization of the plant growth promoting bacterium, *Enterobacter cloacae* MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 79–86, 2016.

KHAN, A. A. et al. A Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. **Journal of agriculture and biological sciences**, v. 1, n. 1, p. 48–58, 2009.

KHAN, A. L. et al. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 58–64, 2016.

KIM, Y.; JORDAN, D.; MCDONALD, G. A. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. **Biology and Fertility of Soils**, v. 26, p. 79–87, 1998.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 16, p. 111–120, 1980.

KULAIF, Y. **Relatório Técnico 75: perfil dos Fertilizantes N-P-K**. Ministério de Minas e Energia - MME, 2009.

KULAIF, Y.; FERNANDES, F. R. C. Panorama dos agrominerais no Brasil: atualidade e perspectivas. In: **Agrominerais para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010. p. 1–21.

LACAIVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic Bacteria: A Biotechnological Potential in Agrobiological System. In: **Bacteria in Agrobiological System: Crop Productivity**. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. p. 1–44.

LEITE, G. G. et al. **Crescimento e Composição Química do Capim *Paspalum atratum* cv. Pojuca**. Planaltina: 2009.

LOPES, F. C. F. et al. Composição química e digestibilidade ruminal in situ da forragem de quatro espécies do gênero *Brachiaria*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 883–888, 2010.

LUZ, A. B. D.; LINS, F. A. F. **Rochas & minerais industriais: usos e especificações**. Rio de Janeiro: 2005.

MAHANTY, T. et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 3315–3335, 2017.

MAIDAK, B. L. et al. The RDP (Ribosomal Database Project) continues. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 173–174, 2000.

MALAKOUTI, M. J. The effect of micronutrients in ensuring efficient use of macronutrients. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 32, n. 3, p. 215–220, 2008.

MARCOS, M. F. et al. Reação à *Bipolaris maydis*, agente causal da mancha foliar, em híbridos apomíticos de *Panicum maximum*. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 3, p. 197–201, 2015.

MEHTA, P. et al. Tricalcium phosphate solubilisation by new endophyte *Bacillus methylotrophicus* CKAM isolated from apple root endosphere and its plant growth-promoting activities. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n. 8, p. 2033–2045, 2014.

MENEGUZZI, A. et al. Ácido indolacético influencia no enraizamento de estacas de *Pittosporum tobira*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 14, n. 1, p. 24–

28, 2015.

MOHAMED, S.; CAUNTER, I. G. Isolation and Characterization of a *Pseudomonas fluorescens* Strain Suppressive to *Bipolaris maydis*. **Journal of Phytopathology**, v. 143, n. 2, p. 111–114, 1995.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 13, n. 3, p. 638–649, 2013.

MOTAMEDI, H. et al. Screening cabbage rhizosphere as a habitat for isolation of phosphate-solubilizing bacteria. **Environmental and Experimental Biology**, v. 14, p. 173–181, 2016.

MOURA, A. B. et al. Biocontrol and seed transmission of *Bipolaris oryzae* and *Gerlachia oryzae* to rice seedlings. **Journal of Seed Science**, v. 36, n. 4, p. 407–412, 2014.

NEGA, A. Review on Concepts in Biological Control of Plant Pathogens. **Journal of Biology, Agriculture and Healthcare**, v. 4, n. 27, p. 33–55, 2014.

NICODEMO, M. L. F.; LAURA, V. A.; MOREIRA, A. **Nutrição mineral de bovinos de corte em pastejo - respostas de plantas forrageiras à adubação e de bovinos à suplementação da pastagem**. São Carlos: 2008.

NICOLAS, J. F. V.; RUA, G. H. *Paspalum chilense* (Poaceae, Paspaleae): A new species from southern South America. **Phytotaxa**, v. 197, n. 4, p. 245–256, 2015.

NICOLOPOULOU-STAMATI, P. et al. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. **Frontiers in public health**, v. 4, n. 148, 2016.

NOGUEIRA, A. D. A. et al. **Manual de laboratórios solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: EMBRAPA-CPPSE, 1998.

NOVO, P. E. et al. Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding. **Scientia Agricola**, v. 73, p. 356–362, 2016.

OLANREWaju, O. S.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 11, 2017.

OLIVEIRA, F. A. et al. First microsatellite markers for *Paspalum plicatulum* (Poaceae) characterization and cross-amplification in different *Paspalum*

species of the *Plicatula* group. **BMC Research Notes**, v. 9, n. 511, p. 1–13, 2016.

ORBOVIC, V.; GROSSER, J. W. Citrus. In: **Agrobacterium Protocols**. Nova Iorque: Kan Wang © Humana Press Inc, 2006. v. 344p. 177–189.

OTEINO, N. et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1–9, 2015.

ÖZEN, A. I.; USSERY, D. W. Defining the *Pseudomonas* Genus: Where Do We Draw the Line with *Azotobacter*? **Microbial Ecology**, v. 63, p. 239–248, 2012.

***Paspalum* in Flora do Brasil 2020 em construção**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13432>>. Acesso em: 30 maio. 2019.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207–220, 1996.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 8, p. 3795–3801, 2002.

PEREIRA, G. V. DE M. et al. A Multiphasic Approach for the Identification of Endophytic Bacterial in Strawberry Fruit and their Potential for Plant Growth Promotion Gilberto. **PHYSIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY A**, v. 63, p. 405–417, 2012.

PEZZOPANE, C. DE G. et al. Evaluation and strategies of tolerance to water stress in *Paspalum* germplasm. **Tropical Grasslands-Forrajões Tropicais**, v. 5, n. 3, p. 153–162, 2017.

PISA, G. et al. Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 12, p. 1215–1221, 2011.

PORTO, P. P. et al. Produção e composição química do leite, consumo e digestibilidade de forragens tropicais manejadas em sistema de lotação intermitente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 1422–1431, 2009.

PRABHA, R. et al. Bacterial diversity in rhizosphere of *Paspalum scrobiculatum* L. (kodo millet) is revealed with shotgun metagenome sequencing and data analysis. **Data in Brief**, v. 20, p. 1653–1657, 2018.

PRIMAVESI, A. C. et al. Nutrientes na fitomassa de capim-marandu em função de fontes e doses de nitrogênio. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 562–568, 2006.

PROVAZI, M. et al. Avaliação de espécies de *Paspalum* sob pastejo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 2, p. 292–299, 2008.

QUARIN, C. L.; VALLS, J. F. M.; URBANI, M. H. Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. **TROPICAL GRASSLANDS**, v. 31, p. 114–116, 1997.

QUECINE, M. C. et al. Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 21, p. 7511–7518, 2012.

QUESENBERRY, K. H. et al. Doubling the chromosome number of bahiagrass via tissue culture. **Euphytica**, v. 175, p. 43–50, 2010.

RAIJ, B. V. et al. **Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo**. Campinas: IAC, 1997.

RAIJ, B. VAN et al. Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. **Campinas: Instituto Agrônomo**, p. 285, 2001.

RAMOS, A. K. B. **Avaliação agrônoma de genótipos de *Paspalum* spp. no âmbito dos Cerrados**. UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal, 2002.

RAWAT, S.; IZHARI, A.; KHAN, A. rawat et al Bacterial Diversity in Wheat Rhizosphere and their Characterization. **Advances in Applied Science Research**, v. 2, n. 2, p. 351–356, 2011.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 4–5, p. 319–339, 1999.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial Endophytes and Their Interactions with Hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 8, p. 827–837, 2006.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406–425, 1987.

SAS Institute Inc. In: **SAS/STAT ® 9.1 User's Guide**. Cary, NC: SAS

Institute Inc., 2004.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fostatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 311–319, 2000.

SINGLA, J.; KRATTINGER, S. G. **Biotic Stress Resistance Genes in Wheat**. 2. ed. Zurich: Elsevier Ltd., 2016.

SOUZA, F. H. D. DE. **Os gramados e a forração vegetal permanente de superfícies de solo: exemplo de oportunidades perdidas?** CONGRESSO BRASILEIRO DE FLORICULTURA E PLANTAS ORNAMENTAIS. **Anais...**Recife: UFRPE, 2013

SOUZA, F. H. D. DE et al. Atributos desejáveis para gramados a serem cultivados sob condições brasileiras: uma proposta. **Ornamental Horticulture**, v. 22, n. 2, p. 154–165, 2016.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845–857, 2005.

STRAATEN, P. VAN. Rochas e minerais como fertilizantes alternativos na agricultura: uma experiência internacional. In: **Agrominerais para o Brasil**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2010. v. 52p. 235–264.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 67, n. 4, p. 491–502, 2003.

SULEMAN, M. et al. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat. **PLoS ONE**, v. 13, n. 9, p. 1–28, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Livro - Fisiologia Vegetal - Taiz - Taiz - Zeiger 3ª Edição**.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127–141, 2001.

WANG, H. et al. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. **Crop Protection**, v. 28, p. 634–639, 2009.

WANG, Q. et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA

sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261–5267, 2007.

WARRIOR, P. Living systems as natural crop-protection agents. **Pest Management Science**, v. 56, p. 681–687, 2000.

WHIPPS, J. M. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. **Journal of experimental botany**, v. 52, p. 487–511, 2001.

XIAO, X. et al. Interactions of plant growth-promoting rhizobacteria and soil factors in two leguminous plants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 8485–8497, 2017.

YANG, B.; WANG, Y.; QIAN, P. Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 1, p. 135, 2016.

YONEYAMA, K. et al. How do nitrogen and phosphorus deficiencies affect strigolactone production and exudation? **Planta**, v. 235, n. 6, p. 1197–1207, 2012.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1 - Meio Nfb semi-sólido

Ácido málico	5,0	g
K ₂ HPO ₄	0,5	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	g
NaCl	0,1	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,02	g
Solução de micronutrientes	2	mL
Solução de azul de bromotimol	2	mL
4 M FeEDTA	4	mL
Solução de vitaminas	1	mL
KOH	4,5	g
Ágar	1,8	g
Água destilada	1000	mL
pH	6,8	

8.2 Anexo 2 - Solução de micronutrientes para o meio Nfb

CuSO ₄ .7H ₂ O	0,04	g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	1,2	g
H ₃ BO ₃	1,4	g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	1,0	g
MnSO ₄ .H ₂ O	1,175	g
Água destilada - completar volume para	1000	mL

Autoclavar e estocar a temperatura ambiente.

8.3 Anexo 3 - Solução de azul de bromotimol

Azul de Bromotimol	1,0	mg
Etanol	50	mL

Água destilada 50 mL

8.4 Anexo 4 - Solução de vitaminas do meio Nfb

Biotina	0,1 g
Piridoxina	0,02 g
Água destilada - completar volume para	1000 mL

Dissolver em banho Maria, filtrar e estocar a solução no refrigerador.

8.5 Anexo 5 - Meio Fosfato

Glicose	10,0 g
NH ₄ Cl	5,0 g
NaCl	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 g
CaHPO ₄	0,8 g
Ágar	15,0 g
Água destilada	1000 mL

8.6 Anexo 6 - Meio TSB + L-triptofano

TSB 10% + L-triptofano (5 mm)

8.7 Anexo 7 - Reagente de Salkovisky

FeCl ₃ 0,5mol L ⁻¹	2 mL
HClO ₄ 35%	98 mL

Estocar a temperatura ambiente com proteção contraluz.

8.8 Anexo 8 - A porcentagem de massa seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), material mineral (MM), lignina (LIG) e digestibilidade *in vitro* (DIV) referentes aos 36 tratamentos relacionados a promoção de crescimento vegetal *in vivo*.

Tratamento	MS (%)	PB (%)	FDN (%)	FDA (%)	MM (%)	LIG (%)	DIV (%)
CSFO	94,52	12,66	72,49	37,06	8,85	3,67	66,04
CFSO	93,02	13,27	71,45	35,34	10,49	3,56	60,77
CFSE	93,12	11,90	73,12	36,98	8,69	4,61	60,31
CFCR	93,47	12,81	72,12	36,84	8,88	4,64	60,61
BSFO458	94,27	12,09	72,87	36,99	8,69	2,97	65,61
BSFO25	92,92	12,81	72,12	35,09	9,02	5,15	59,67
BSFO170	94,23	12,03	72,83	37,71	9,19	3,04	65,15
BSFO161	92,40	14,80	69,19	33,66	10,92	7,19	56,97
BSFO110	93,89	13,79	71,61	34,03	9,39	4,82	65,18
BSFO109	93,18	13,96	71,58	35,20	10,34	6,05	59,10
BSFO105	93,71	12,52	72,58	36,58	9,45	5,02	63,24
BSFO103	93,82	12,80	72,15	36,75	9,62	4,53	63,10
BFSO458	93,49	12,56	71,82	36,00	10,13	3,81	63,48
BFSO25	93,62	12,61	71,85	35,81	10,16	2,71	65,84
BFSO170	93,88	12,55	71,10	34,62	9,70	3,01	68,88
BFSO161	93,51	13,55	70,54	35,36	10,63	3,63	65,92
BFSO110	93,45	12,45	71,52	35,55	10,53	3,22	66,14
BFSO109	93,49	13,04	70,43	36,85	10,86	3,00	64,45
BFSO105	93,15	11,62	72,37	38,57	11,32	2,95	59,31
BFSO103	93,49	14,75	69,28	32,90	11,20	3,55	69,14
BFSE458	93,56	12,76	71,76	36,14	9,55	5,09	63,13
BFSE25	92,89	12,74	71,18	36,03	10,71	6,67	59,64
BFSE170	93,45	12,94	72,06	37,38	9,22	5,53	59,31
BFSE161	92,61	13,97	70,30	34,48	10,35	6,74	57,66
BFSE110	94,20	11,44	72,87	37,64	9,19	2,82	66,23
BFSE109	93,98	12,73	72,38	36,74	9,18	3,87	63,89
BFSE105	92,52	13,93	69,94	34,82	10,26	7,56	57,41
BFSE103	93,32	11,64	73,34	37,87	8,53	4,42	61,30
BFCR458	93,45	13,26	71,51	35,77	10,13	5,47	61,90
BFCR25	93,68	14,13	70,00	35,88	9,32	6,01	61,43
BFCR170	93,12	12,62	73,38	35,42	8,99	5,74	60,79
BFCR161	93,70	11,67	72,91	37,63	8,53	5,35	62,92
BFCR110	93,10	12,84	71,91	36,42	10,05	5,32	60,23
BFCR109	93,74	11,52	73,39	37,44	8,03	3,28	62,82
BFCR105	91,69	13,36	69,51	33,80	10,76	7,02	56,92
BFCR103	92,78	15,11	70,50	33,34	10,61	6,57	57,18

8.9 Anexo 9 - Teores minerais de Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Fósforo (P), Potássio (K), Enxofre (S), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Manganês (Mn), Zinco (Zn) e porcentagem de nitrogênio (N) para os 36 tratamentos envolvidos no trabalho.

TRATAMENTO	Ca (g/Kg)	Mg (g/Kg)	P (g/Kg)	K (g/Kg)	S (g/Kg)	Cu (mg/Kg)	Fe (mg/Kg)	Mn (mg/Kg)	Zn (mg/Kg)
CSFO	7,86	7,94	0,89	16,05	7,94	4,63	90,53	48,37	19,75
CFSO	13,02	15,24	1,77	6,13	15,24	4,40	155,57	88,09	7,89
CFSE	7,56	7,12	0,68	11,91	7,12	3,75	109,84	40,57	15,15
CFCR	9,13	8,17	0,86	13,72	8,17	7,28	124,11	42,00	16,53
BSFO458	9,20	9,05	0,91	10,85	9,05	6,80	117,33	34,02	14,88
BSFO25	10,36	9,08	0,67	10,52	9,08	5,92	191,74	51,19	19,24
BSFO170	11,62	9,04	0,90	14,12	9,04	6,08	124,27	46,07	16,15
BSFO161	12,72	10,13	0,92	10,26	10,13	5,81	106,84	47,48	12,68
BSFO110	10,42	9,07	0,95	11,61	9,07	7,26	121,43	50,52	16,30
BSFO109	6,42	6,03	0,35	5,73	6,03	3,21	51,61	29,98	6,69
BSFO105	11,31	8,97	0,90	10,85	8,97	6,50	101,56	44,70	12,87
BSFO103	9,09	8,76	0,85	13,58	8,76	7,38	207,53	39,89	13,64
BFSO458	11,57	14,14	3,02	10,09	14,14	4,38	295,38	73,22	13,51
BFSO25	13,58	15,44	3,04	8,46	15,44	4,51	89,11	75,81	7,27
BFSO170	12,32	14,37	2,80	8,78	14,37	19,38	113,18	70,81	7,55
BFSO161	13,04	15,01	3,68	9,29	15,01	4,31	133,79	79,61	10,21
BFSO110	13,09	14,69	3,77	9,61	14,69	4,84	115,65	90,38	6,48
BFSO109	12,00	14,34	3,67	10,08	14,34	3,98	91,90	74,02	9,12
BFSO105	11,65	13,94	2,48	5,79	13,94	3,47	115,34	56,27	5,35
BFSO103	13,45	16,19	6,33	11,54	16,19	5,26	182,57	94,37	9,03
BFSE458	9,31	8,58	0,70	11,39	8,58	5,34	97,87	41,01	16,55
BFSE25	10,22	8,50	0,65	9,21	8,50	5,72	81,97	48,21	10,03
BFSE170	8,78	8,51	0,84	15,51	8,51	4,91	149,92	46,90	17,22
BFSE161	9,38	9,13	0,79	11,13	9,13	5,22	281,98	48,62	15,38
BFSE110	9,82	9,47	0,90	10,60	9,47	6,21	79,11	39,46	13,85
BFSE109	12,94	15,04	2,94	8,37	15,04	4,34	87,09	73,15	6,58
BFSE105	10,32	8,92	0,83	11,06	8,92	6,18	130,84	60,06	17,80
BFSE103	8,25	7,58	0,63	12,66	7,58	4,93	78,42	44,04	13,58
BFCR458	11,67	9,79	0,87	10,80	9,79	8,38	81,33	42,97	12,88
BFCR25	8,32	7,64	0,93	13,89	7,64	5,27	104,35	59,92	13,45
BFCR170	9,56	8,24	0,72	11,65	8,24	4,40	129,06	45,35	16,44
BFCR161	8,64	7,42	0,76	13,76	7,42	7,56	69,84	47,57	10,03
BFCR110	11,10	9,27	0,76	10,44	9,27	6,52	117,34	46,39	11,23
BFCR109	8,68	8,39	0,64	11,94	8,39	6,29	106,11	43,88	15,81
BFCR105	13,28	11,22	0,69	7,74	11,22	7,58	81,11	29,66	10,64
BFCR103	12,78	10,45	0,95	11,89	10,45	8,70	220,25	57,89	14,50