



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



**“POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS
E RIZOSFÉRICAS DE *PASPALUM* SPP. E NANOPARTÍCULAS DE
SÍLICA PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL”**

Amanda Carolina Prado de Moraes

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

Coorientador:

Dra. Alessandra Pereira Fávero

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

Bolsista CAPES 88882.426494/2019-01

**São Carlos - SP
2021**

AMANDA CAROLINA PRADO DE MORAES

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E RIZOSFÉRICAS DE
PASPALUM SPP. E NANOPARTÍCULAS DE SÍLICA PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

Coorientadora:

Dra. Alessandra Pereira Fávero

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

Departamento de Morfologia e Patologia - UFSCar

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

Departamento de Genética e Evolução - UFSCar

Dra. Andréa Cristina Bogas

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UFSCar

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

ESALQ/USP

Prof. Dr. Carlos Alberto Acuña

Instituto de Botânica del Nordeste (UNNE-CONICET)

São Carlos

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Amanda Carolina Prado de Moraes, realizada em 26/10/2021.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava (UFSCar)

Profa. Dra. Andrea Cristina Bogas (UFSCar)

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo (USP)

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)

Prof. Dr. Carlos Alberto Acuña (UNNE)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

AGRADECIMENTOS

À minha família: Carla, Célio e Mayra; pelo amor incondicional e alicerce durante toda a minha vida, nos momentos bons e ruins;

Aos meus amigos, pelo apoio emocional e por proporcionarem momentos alegres que foram fundamentais para a conclusão deste trabalho;

Aos meus colegas de laboratório, pela ajuda, troca de conhecimentos e momentos de descontração nos cafés da tarde no departamento. Agradeço especialmente ao Ailton Ferreira de Paula, pelo auxílio e parceria durante os experimentos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava, por todo o apoio, encorajamento, ensinamentos e parceria desde o começo do meu doutorado. À minha coorientadora, Dra. Alessandra Pereira Fávero, sempre tão acolhedora, solícita e fundamental na análise dos resultados. À Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna, pelo auxílio durante todo o meu doutorado, principalmente na condução das análises moleculares;

À Embrapa Pecuária Sudeste, por fornecerem o material de estudo coletado no Banco de Germoplasma de *Paspalum*, disponibilizarem estrutura para a realização de experimentos e suporte técnico;

Ao Departamento de Morfologia de Patologia (DMP) da UFSCar, pelo fornecimento das condições necessárias para que a pesquisa acontecesse, incluindo os profissionais que atuam em todos os setores do departamento, estrutura e laboratório;

Ao Prof. Dr. Emerson Camargo e Lucas da Silva Ribeiro, do Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC), pela colaboração na pesquisa e fornecimento das nanopartículas de sílica;

Parte do presente trabalho é fruto do meu doutorado sanduíche nos Estados Unidos da América, portanto, agradeço ao programa CAPES Print e ao PPG-Biotec por me concederem a oportunidade e bolsa de estudos que proporcionaram a concretização desse projeto inovador;

Ao Prof. Dr. James Francis White Jr. e à Kathryn Louise Kingsley, da Rutgers University, New Brunswick - NJ, EUA. Agradeço imensamente por todo o apoio, estrutura, materiais, técnicas e conhecimento fornecidos durante o período de doutorado sanduíche.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.
This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

de Moraes, Amanda Carolina Prado. **Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas e rizosféricas de *Paspalum* spp. e nanopartículas de sílica para promoção de crescimento vegetal.** 2021. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2021

RESUMO

Bactérias associadas às plantas do gênero *Paspalum* podem ser empregadas como biofertilizantes para aumentar a eficiência das pastagens e reduzir o uso de agroquímicos, por meio da transformação de nutrientes em uma forma assimilável para a planta hospedeira e defesa contra fitopatógenos. Dentro deste contexto, nanopartículas (NPs) de sílica podem ser uma ferramenta para aumentar a eficácia de biofertilizantes no campo. Os objetivos do presente trabalho foram isolar, identificar e caracterizar a microbiota endofítica e rizosférica de *Paspalum* spp. para promoção de crescimento vegetal, e avaliar o efeito desses isolados bacterianos associados a NPs de sílica em plântulas de *Paspalum notatum*. As bactérias foram isoladas de raízes, folhas e solos de *P. rojasii*, *P. compressifolium* e *P. lenticulare* e testadas *in vitro* para fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de ácido indol-3-acético (AIA) e antagonismo contra os fungos fitopatogênicos *Claviceps purpurea* e *Fusarium oxysporum*. As bactérias com potencial biotecnológico foram identificadas por sequenciamento do 16S DNAr, e isolados de *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Serratia* foram selecionados para testes *in vivo* em *P. notatum* e *Poa annua*. As sementes foram desinfetadas e inoculadas com tratamentos compostos por bactéria e bactéria + *F. oxysporum* e cultivadas em caixas Magenta contendo substrato. As plântulas foram avaliadas para os parâmetros taxa de germinação, comprimento de raiz e folha, peso seco de raiz e folha. Sementes submetidas aos mesmos tratamentos foram cultivadas em placas de Petri com 0.7% de agarose e as raízes das plântulas foram coradas com 3,3'-diaminobenzidina e visualizadas em microscópio óptico. Em outro experimento, NPs de sílica de 85 nm foram adicionadas nas concentrações de 0.05 mg/mL e 0.1 mg/mL aos meios de cultura dos isolados bacterianos *Alcaligenes* sp., *Enterobacter* sp. e *Serratia* sp. Um total de 11 tratamentos foram inoculados em sementes desinfetadas de *P. notatum* e submetidas às mesmas condições descritas no experimento anterior. Dos 105 isolados bacterianos, 26 solubilizaram fosfato, fixaram nitrogênio e produziram AIA. *Serratia* sp. e *Enterobacter* sp. inibiram o crescimento de *C. purpurea*, porém nenhum isolado foi antagonístico a *F. oxysporum*. *Serratia* sp. promoveu crescimento significativo de *P. notatum*. *F. oxysporum* não inibiu o crescimento das plântulas, exibindo o maior crescimento vegetal quando inoculado com *Enterobacter* sp., porém, todas as plântulas inoculadas com *F. oxysporum* exibiram raízes e folhas finas e frágeis. Os isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* promoveram crescimento significativo de *Poa annua*. As bactérias aumentaram o número de pelos radiculares e foi possível observar a colonização bacteriana intracelular nas raízes. No segundo experimento, Os três gêneros bacterianos sem a presença de NPs promoveram o crescimento de *P. notatum*. Germinação total e o maior peso seco de folha foram obtidos nos tratamentos de 0.1 mg/mL de NPs de sílica associadas a *Serratia* sp. e *Enterobacter* sp. As NPs associadas às três bactérias aumentaram comprimento e peso seco de raiz. Isolados bacterianos de *Paspalum* spp. e NPs de sílica apresentaram potencial para serem aplicados como nano-biofertilizantes e promoverem crescimento vegetal em *P. notatum*.

Palavras-chave: biofertilizante, bactérias endofíticas, bactérias rizosféricas, crescimento vegetal, nano-sílica, nanopartículas, *Paspalum*.

de Moraes, Amanda Carolina Prado. **Biotechnological potential of endophytic and rhizospheric bacteria of *Paspalum* spp. and silica nanoparticles for plant growth promotion.** 2021. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2021.

ABSTRACT

Bacteria associated with *Paspalum* plants can be employed as biofertilizers to increase the efficiency of pastures and reduce the use of agrochemicals by converting nutrients into an assimilable form for the host plant and defense against phytopathogens. In this context, silica nanoparticles (NPs) can be a tool to increase the effectiveness of biofertilizers in the field. This study aimed to isolate, identify and characterize the endophytic and rhizospheric microbiota of *Paspalum* spp. for plant growth promotion and to evaluate the effect of these bacterial isolates associated with silica NPs in *Paspalum notatum* seedlings. The bacteria were isolated from roots, leaves, and soils of *P. rojasii*, *P. compressifolium*, and *P. lenticulare* and tested *in vitro* for biological nitrogen fixation, phosphate solubilization, indole-3-acidic acid (IAA) production, and antagonism against the phytopathogenic fungi *Claviceps purpurea* and *Fusarium oxysporum*. The bacteria with biotechnological potential were identified by the 16S rDNA sequencing, and isolates of the genera *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, and *Serratia* were selected for the *in vivo* tests in *P. notatum* and *Poa annua*. The seeds were disinfected and inoculated with treatments composed of bacteria and bacteria + *F. oxysporum* and placed in magenta boxes containing substrate. The seedlings were evaluated for germination rate, root and shoot length, and root and shoot dry weight. Seeds submitted to the same treatments were plated in Petri dishes with 0.7% agarose, and the seedling roots were 3,3'-diaminobenzidine stained and visualized under an optical microscope. In another experiment, 85 nm silica NPs at concentrations of 0.05 mg/mL and 0.1 mg/mL were added to the culture media of *Alcaligenes* sp., *Enterobacter* sp., and *Serratia* sp. A total of 11 treatments were inoculated in disinfected seeds of *P. notatum* and subjected to the same conditions described previously. Out of 105 isolates, 26 solubilized phosphate, fixed nitrogen, and produced IAA. *Serratia* sp. and *Enterobacter* sp. inhibited the *C. purpurea* growth, but none of them was antagonistic to *F. oxysporum*. *Serratia* sp. promoted significant growth of *P. notatum*. *F. oxysporum* did not inhibit the development of the seedlings, and promoted the greatest plant growth when inoculated with *Enterobacter* sp. However, all the seedlings inoculated with *F. oxysporum* exhibited thin and fragile roots and shoots. The isolates belonging to the genus *Pseudomonas* promoted significant growth of *Poa annua*. Bacteria increased the number of root hairs, and it was possible to visualize intracellular bacterial colonization in the roots. In the second experiment, the three bacterial genera without the NPs promoted the growth of *P. notatum*. Total germination and the highest shoot dry weight were obtained in the treatments of 0.1 mg/mL silica NPs associated with *Serratia* sp. and *Enterobacter* sp. Silica NPs associated with the three bacteria increased root length and root dry weight. Bacterial isolates from *Paspalum* spp. with silica NPs showed potential to be applied as nano-biofertilizers and promote plant growth in *P. notatum*.

Keywords: biofertilizer, endophytic bacteria, rhizospheric bacteria, plant growth, nano-silicon, nanoparticles, *Paspalum*.

JUSTIFICATIVA

A aplicação biotecnológica de bactérias promotoras de crescimento vegetal na agricultura é uma alternativa ao uso de fertilizantes químicos, reduzindo a degradação de recursos naturais e custo para os agricultores. Nessa perspectiva, o estudo das bactérias associadas à cultura do *Paspalum* torna-se importante tanto para benefício das plantas desse gênero vegetal quanto para a possível aplicação em outras espécies de gramíneas e culturas de interesse econômico e ambiental. Entretanto, para serem aplicadas com êxito na agricultura como inoculantes, é necessária a investigação das suas características funcionais, o estudo da interação desses microrganismos com a planta hospedeira, e em quais espécies vegetais esses inoculantes promovem benefícios significativos.

A inovação do presente trabalho está na utilização de nanomateriais para serem empregados na formulação de biofertilizantes a fim de melhorar a sua eficiência na planta. Levando em consideração a carência de estudos sobre as bactérias associadas às plantas do gênero *Paspalum*, bem como os potenciais benefícios que a associação de bactérias promotoras de crescimento vegetal com nanomateriais podem proporcionar à agricultura moderna, o estudo da interação bactéria-nanopartícula-planta é de alta relevância, com possibilidade de gerar um produto biotecnológico.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - Isolamento, identificação e caracterização da microbiota associada a *Paspalum rojasii*, *P. lenticulare* e *P. compressifolium* para promoção de crescimento vegetal

Figura 1. Diagrama de Venn resumindo o número de bactérias isoladas de *P. rojasii*, *P. lenticulare*, e *P. compressifolium* que apresentaram resultados positivos os parâmetros de promoção de crescimento vegetal. Laranja: bactérias solubilizadoras de fosfato; Azul: bactérias produtoras de AIA; Verde: bactérias fixadoras de nitrogênio 38

Figura 2. Gráfico de dispersão dos componentes principais 1 e 2 considerando os descritores: produção de ácido-indol-3-acético (AIA), índice de solubilização de fosfato (ISF), e fixação biológica de nitrogênio (FBN). Todos os 105 isolados submetidos aos testes de promoção de crescimento vegetal *in vitro* estão distribuídos no gráfico. Fonte: programa estatístico Past, versão 2.17c 40

Figura 3. Teste de antagonismo contra o fungo *Claviceps purpurea*. A) Isolado 51 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, B) Isolado 86 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, C) Isolado 41 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, D) Isolado 3 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa 44

Figura 4. Teste de antagonismo contra o fungo *Fusarium oxysporum*. A) Isolado 51 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, B) Isolado 86 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, C) Isolado 41 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, D) Isolado 3 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa 45

Figura 5. Plântulas de *P. notatum* submetidas a tratamentos somente com bactérias. A) Controle; B) *Alcaligenes* sp./isolado 3; C) *Serratia* sp./isolado 51; D) *Pseudomonas* sp./isolado 41; E) *Enterobacter* sp./isolado 86 50

Figura 6. Plântulas de *P. notatum* submetidas a tratamentos com bactérias e *F. oxysporum*. A) *F. oxysporum*; B) *Alcaligenes* sp./isolado 3 + *F. oxysporum*; C) *Serratia* sp./isolado 51 + *F. oxysporum*; D) *Pseudomonas* sp./isolado 41 + *F. oxysporum*; E) *Enterobacter* sp./isolado 86 + *F. oxysporum* 50

Figura 7. Plântulas de *Poa annua* inoculadas com isolados bacterianos de *Paspalum* spp. em agarose 0.7%. A) Plântula controle, B) Plântula inoculada com isolado 27 (*Pseudomonas* sp.), C) Plântula inoculada com isolado 41 (*Pseudomonas* sp.) 53

Figura 8. Coloração das raízes de *P. notatum* com DAB. A) Raiz de plântula controle, B) Raiz e pelos radiculares de plântula inoculada com o isolado 86 (*Enterobacter* sp.), C) Raiz e pelos radiculares de plântula inoculada com o isolado 41 (*Pseudomonas* sp.) (referência de escala em Figura B), D) Bactérias saindo pelas extremidades dos pelos radiculares (setas) de plântula inoculada com o isolado 86 (*Enterobacter* sp.) (referência de escala em Figura A) 54

Figura 9. Coloração das raízes de *Poa annua* com DAB. A) Raiz de plântula controle, B) Raiz e pelos radiculares de plântula inoculada com isolado o 41 (*Pseudomonas* sp.), C) Raiz e pelos radiculares de plântula inoculada com o isolado 86 (*Enterobacter* sp.), D) Raiz e pelos radiculares de plântula inoculada com o isolado 27 (*Pseudomonas* sp.) 55

Figura 10. Bactérias saindo através da extremidade do pelo radicular de *Poa annua* (seta) 56

CAPÍTULO 2 - Formulações à base de nanosílica e bactérias para promoção de crescimento vegetal em *Paspalum notatum*

Figura 1. Características das nanopartículas (NPs) de sílica sintetizadas. A) Espectro infravermelho da NP sintetizada; B) Diâmetro das NPs; C) Imagem da morfologia esférica das NPs em MEV. Aumento = 50.00 KX; Tensão de aceleração = 3.0 kV..... 84

Figura 2. Gráfico de dispersão dos componentes principais 1 e 2 considerando os parâmetros: comprimento de folha (CF), peso seco de folha (PSF), comprimento de raiz (CR), peso seco de raiz (PSR) e germinação (G). Todas as plântulas submetidas aos 11 tratamentos e plântulas controle (C), estão distribuídas no gráfico. Fonte: programa estatístico Past, versão 2.17c 86

Figura 3. Plântulas de *P. notatum* controle e inoculadas com diferentes tratamentos. A) Controle; B) 0.05 mg/mL de NPs de sílica; C) 0.1 mg/mL de NPs de sílica; D) *Serratia* sp.; E) *Serratia* sp. e 0.05 mg/mL de NPs de sílica; F) *Serratia* sp. e 0.1 mg/mL de NPs de sílica 88

Figura 4. Imagens de pelos radiculares de plântulas de *Paspalum notatum* tratadas com nanopartículas de sílica observadas em microscópio óptico. As imagens mostram pontos transparentes no interior dos pelos radiculares (setas). A) Plântula inoculada com tratamento 1; B) Plântula inoculada com tratamento 4; C) Plântula inoculada com tratamento 10. Tratamento 1: 0.05 mg/mL NPs; Tratamento 4: 0.05 mg/mL NPs + *Serratia* sp.; Tratamento 10: 0.05 mg/mL NPs + *Enterobacter* sp. 92

Figura 5. Bactérias saindo dos pelos radiculares de plântulas de *Paspalum notatum* inoculadas com *Serratia* sp. (setas) e observadas em microscópio óptico 93

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 - Isolamento, identificação e caracterização da microbiota associada a *Paspalum rojasii*, *P. lenticulare* e *P. compressifolium* para promoção de crescimento vegetal

Tabela 1. Composição dos nove tratamentos aplicados às sementes de *P. notatum* e controle. Estão indicados a identificação do isolado, gênero bacteriano e presença de *Fusarium oxysporum* em cada tratamento 30

Tabela 2. Composição dos cinco tratamentos aplicados às sementes de *Poa annua* e controle. Estão indicados a identificação do isolado e gênero bacteriano em cada tratamento 30

Tabela 3. Frequência de isolamento (FI) de bactérias de rizosfera, raiz e folha de *P. rojasii*, *P. lenticulare* e *P. compressifolium* 32

Tabela 4. Distribuição taxonômica dos isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de *Paspalum* spp 33

Tabela 5. Identificação molecular e capacidade dos 105 isolados bacterianos para solubilizar fosfato, produzir ácido indol-3-acético e fixar nitrogênio 35

Tabela 6. Análise dos componentes principais dos parâmetros avaliados no experimento de promoção de crescimento vegetal *in vitro* 39

Tabela 7. Contribuição dos parâmetros avaliados no experimento de promoção de crescimento vegetal *in vitro* para cada componente principal (CP1 e CP2). Parâmetros avaliados: índice de solubilização de fosfato (ISF), fixação biológica de nitrogênio (FBN) e produção de ácido indol-3-acético (AIA) 39

Tabela 8. Efeitos dos isolados bacterianos de *Paspalum* spp. e *Fusarium oxysporum* na germinação, comprimento de raiz (CR), comprimento de folha (CF), peso seco de raiz (PSR) e peso seco de folha (PSF) de plântulas de *Paspalum notatum*. Todas os isolados foram inoculados na presença e ausência de *F. oxysporum* 48

Tabela 9. Efeitos dos isolados bacterianos de *Paspalum* spp. nos pelos radiculares, comprimento de raiz (CR) e comprimento de folha (CF) em plântulas de *Poa annua* 52

CAPÍTULO 2 - Formulações à base de nanosílica e bactérias para promoção de crescimento vegetal em *Paspalum notatum*

Tabela 1. Origem das bactérias utilizadas no presente estudo 80

Tabela 2. Composição dos onze tratamentos aplicados às sementes de *P. notatum* e controle. Estão indicados o número do tratamento, concentração de nanopartículas (NPs) e gêneros bacterianos utilizados em cada tratamento 81

Tabela 3. Análise de componentes principais dos parâmetros morfológicos avaliados 85

Tabela 4. Contribuição dos parâmetros morfológicos para a análise de componentes principais. Parâmetros avaliados: comprimento de raiz (CR), comprimento de folha (CF), peso seco de raiz (PSR), peso seco de folha (PSF) e germinação (G) 85

Tabela 5. Efeitos dos tratamentos na germinação, comprimento de raiz, peso seco de raiz, comprimento de folha e peso seco de folha de plântulas de *Paspalum notatum* 87

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Isolamento, identificação e caracterização da microbiota associada a <i>Paspalum rojasii</i>, <i>P. lenticulare</i> e <i>P. compressifolium</i> para promoção de crescimento vegetal	15
1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Bactérias endofíticas e rizosféricas promotoras de crescimento vegetal	18
1.1.1 Fixação biológica de nitrogênio	19
1.1.2 Solubilização de fosfato	20
1.1.3 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)	21
1.2 O gênero <i>Paspalum</i>	22
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados bacterianos	24
3.1.1 Isolamento de bactérias rizosféricas	24
3.1.2 Isolamento de bactérias endofíticas	25
3.1.3 Contagem e seleção das bactérias cultiváveis	25
3.3 Experimentos de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i>	26
3.3.1 Solubilização de fosfato	26
3.3.2 Fixação biológica de nitrogênio	26
3.3.3 Produção de ácido indol-3-acético	26
3.3.4 Potencial de antagonismo	27
3.4 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos	27
3.5 Promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i>	28
3.5.1 Seleção de isolados	28
3.5.2 Material vegetal	28
3.5.3 Desinfecção superficial das sementes de <i>Paspalum notatum</i> e <i>Poa annua</i>	28
3.6 Experimentos de promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i>	29
3.7 Visualização da colonização bacteriana em microscópio óptico por coloração com 3,3'-Diaminobenzidina (DAB)	30
3.8 Análise estatística	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32

4.1 Isolamento, identificação taxonômica e potencial agrônômico das bactérias endofíticas e rizosféricas associadas a <i>Paspalum rojasii</i> , <i>P. leticulare</i> e <i>P. compressifolium</i>	32
4.1.1 Frequência de isolamento das bactérias endofíticas e rizosféricas	32
4.1.2 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos	33
4.1.3 Capacidade dos isolados bacterianos para promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i>	34
4.1.4 Atividade antagonista	42
4.2 Promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i> por bactérias endofíticas e rizosféricas de <i>Paspalum</i> spp.	46
4.2.2 Experimento com <i>Poa annua</i> em agarose	51
4.2.3 Visualização microscópica de raízes de <i>Paspalum notatum</i> e <i>Poa annua</i>	53
5. CONCLUSÃO	57
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
CAPÍTULO 2 - Formulações à base de nanosílica e bactérias para promoção de crescimento vegetal em <i>Paspalum notatum</i>	75
1. INTRODUÇÃO	76
2. OBJETIVOS	78
2.1 Geral	78
2.2 Específicos	78
3. MATERIAL E MÉTODOS	79
3.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de SiO ₂	79
3.2 Isolados bacterianos de <i>Paspalum</i> spp.	79
3.3 Crescimento bacteriano na presença de nanopartículas	80
3.4 Material vegetal	80
3.4.1 Desinfecção superficial das sementes de <i>Paspalum notatum</i>	80
3.5 Experimentos de promoção de crescimento vegetal	81
3.6 Visualização das bactérias e nanopartículas em microscópio óptico por coloração com 3,3'-Diaminobenzidina (DAB)	82
3.7 Análise estatística	82
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
4.1 Caracterização das nanopartículas de SiO ₂	82
4.2 Análise de componentes principais e teste de médias	84
4.3 Análise microscópica das raízes de <i>Paspalum notatum</i>	91
5. CONCLUSÃO	93

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
--	-----------

CAPÍTULO 1

Isolamento, identificação e caracterização da microbiota associada a *Paspalum rojasii*, *P. lenticulare* e *P. compressifolium* para promoção de crescimento vegetal

1. INTRODUÇÃO

O constante crescimento populacional associado aos avanços tecnológicos tem aumentado a preocupação sobre a performance e sustentabilidade da agricultura no futuro (FAO, 2018), uma vez que o aumento da demanda por alimentos resulta no excessivo uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos para obtenção de altos rendimentos na produção agrícola. Muitos agroquímicos são conhecidos por causarem efeitos negativos diretos nas comunidades microbianas do solo, poluição ambiental e riscos para a saúde de todos os seres vivos (GURIKAR et al., 2016). Do mesmo modo, fertilizantes fosfatados e nitrogenados, além de possuírem alto custo, causam graves impactos ambientais, como a eutrofização e contaminação das águas, acidificação do solo, poluição do ar, redução da biodiversidade e da função ecossistêmica (VANCE, 2001; VESSEY, 2003; DE BRUIJN, 2015; GURIKAR et al., 2016). Diante desse cenário, tornam-se necessárias práticas agrícolas sustentáveis que atendam às demandas crescentes da população (BATISTA et al., 2018; LACAVA; AZEVEDO, 2013, 2014).

Dentre as práticas alternativas aos agroquímicos, estão os inoculantes, que se referem à utilização de microrganismos vivos capazes de promover o crescimento vegetal de forma direta ou indireta, e/ou capazes de controlar insetos-praga e fitopatógenos, denominados biofertilizantes e biopesticidas (VESSEY, 2003; QUECINE et al., 2014; DE SOUSA et al., 2017, LACAVA et al., 2021). Microrganismos associados às plantas, como endofíticos e rizosféricos, podem ser capazes de proporcionar diversos benefícios à planta hospedeira, incluindo promoção de crescimento, aumento da tolerância a estresses abióticos e proteção contra doenças em culturas agrícolas de interesse econômico (REDMAN et al., 2002; WALLER et al., 2005; RYAN et al., 2008; CASTRO et al., 2018; BATISTA et al., 2018). Sendo assim, formulações biológicas à base de bactérias podem ser desenvolvidas para melhorar o desempenho e rendimento agrícola de culturas vegetais, ao mesmo tempo em que reduz custos e danos ambientais (LACAVA; AZEVEDO, 2013; CASTRO et al., 2018; BATISTA et al., 2018; LACAVA; MELO; PEREIRA, 201; LISBOA et al., 2021).

A capacidade de fixar nitrogênio, solubilizar fosfato e sintetizar fitormônios são atributos essenciais na seleção de inoculantes. Dessa forma, bactérias que apresentam múltiplas características funcionais são estratégicas para a produção de plantas saudáveis, e consequentemente, melhor rendimento agrícola (VASSILEV; EICHLER-LÖBERMANN;

VASSILEVA, 2012). Por essa razão, inúmeros estudos têm sido desenvolvidos sobre o potencial biotecnológico de bactérias associadas a diversas espécies vegetais de interesse agrônomo nos últimos dez anos. Como resultado, potenciais bactérias promotoras de crescimento vegetal para serem empregadas comercialmente foram encontradas em culturas como milho (HUNGRIA et al., 2010; MONTAÑEZ et al., 2012; KADMIRI et al., 2018), soja (WAHYUDI et al., 2011; ZHAO et al., 2018), cana-de-açúcar (BENEDUZI et al., 2013), arroz (BAO et al., 2013; VERMA et al., 2017), pimenta (CHATERJEE et al., 2017), e citros (VIVES-PERIS et al., 2018).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) (2018), a demanda por alimentos irá crescer significativamente até o ano de 2050, resultando em aumento na produção agrícola e pecuária (FAO, 2018). Logo, a pecuária a pasto desempenhará uma função importante no cumprimento dessa demanda. Sua produtividade depende diretamente da eficiência na produção de forragem, a qual é altamente influenciada pela adubação nitrogenada (MARTHA JÚNIOR et al., 2004).

Gramíneas forrageiras apresentam potencial significativo para garantir a sustentabilidade na agricultura e reduzir os impactos ambientais negativos da intensa produção agrícola e animal (ENTZ et al., 2002; DAVIS et al., 2012). Os benefícios das espécies forrageiras nos sistemas agrícolas incluem o aumento do sequestro de carbono (BJÖRNSSON, 2016; SMITH, 2014), produção de carne, leite e lã por ruminantes, melhoria da fertilidade do solo, manejo de doenças radiculares em sistemas agrícolas, aumentando a biodiversidade e o controle de riscos por meio de sistemas diversificados (ATES et al., 2015; CHRISTIANSEN et al., 2015). Além disso, a produção animal baseada em pastagem, contribui para a preferência do consumidor por produtos animais com alto valor nutricional e produzidos por práticas sustentáveis e favoráveis ao bem-estar animal (HRISTOV et al. 2013; RUDEL et al., 2015).

Paspalum L. é considerado um importante gênero da família Poaceae, apresentando aproximadamente 310 espécies distribuídas nas Américas (MORRONE et al., 2012). As espécies desse gênero são amplamente utilizadas como forragem e cobertura vegetal (STRAPASSON et al., 2000). No Brasil, as espécies de *Paspalum* compõem a maioria das pastagens nativas dos Pampas (AGUIAR, 2014). Por serem espécies nativas dos ecossistemas brasileiros, oferecem baixo risco para desequilíbrio ecológico e maior

tolerância ao clima, pragas e doenças, quando comparadas às espécies exóticas atualmente utilizadas para pastejo no país.

Diante dessa perspectiva, bactérias associadas ao gênero *Paspalum* com potencial para a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de ácido indolacético (AIA) e antagonismo, podem aumentar a produtividade e diminuir o uso de insumos sintéticos nessa cultura agrícola forrageira.

1.1 Bactérias endofíticas e rizosféricas promotoras de crescimento vegetal

Bactérias endofíticas habitam o interior de tecidos vegetais como raízes, ramos, folhas, frutos e sementes, sem causar danos à planta hospedeira (AZEVEDO et al., 2000; AZEVEDO; ARAÚJO, 2007; RYAN et al., 2008; PACIFICO et al., 2019), enquanto bactérias rizosféricas vivem livremente no solo ao redor das raízes da planta (ROSENBLUETH; MARTNEZ-ROMERO, 2006; BATISTA et al., 2018).

As plantas e sua microbiota associada possuem uma relação mutualística estabelecida. Nessa dinâmica interação, as plantas liberam exsudatos como carboidratos, proteínas, vitaminas e ácidos orgânicos ao redor do meristema apical radicular, fornecendo nutrientes para os microrganismos do solo (WHITE et al., 2018b). Da mesma forma, as bactérias benéficas, denominadas de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs), promovem a saúde da planta por meio de mecanismos diretos e indiretos. Os mecanismos diretos incluem a obtenção de nutrientes essenciais do solo, incluindo nitrogênio, fósforo e ferro, bem como a síntese ou modulação de fitormônios, por exemplo, auxinas, citocinas e giberelinas (GLICK, 2012; GOND et al., 2015; WHITE et al., 2015). Indiretamente, as BPCVs auxiliam as plantas a suportarem estresses bióticos através da produção de antibióticos, enzimas antioxidantes e outras moléculas, regulação de espécies reativas de oxigênio (ERO), diminuição da disponibilidade de nutrientes para os patógenos, síntese de compostos voláteis e indução de resistência sistêmica na planta (SANTOYO et al., 2012; GLICK, 2015; LI et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016; LOPES et al., 2021). As BPCVs também são capazes de aumentar a tolerância da planta a estresses abióticos, como calor, seca, sal, alagamento e metais pesados. Dentre os mecanismos bacterianos que auxiliam as plantas a enfrentarem estresses abióticos, estão a redução de ERO, aumento dos níveis de prolina, redução da condutância e resistência estomática, aumento da taxa fotossintética e

alongamento radicular (ABD EL-DAIM et al., 2014; ETESAMI et al., 2014; COHEN et al., 2015; SENEVIRATNE et al., 2016; WANG et al., 2016; ETESAMI; BEATTIE, 2018).

As bactérias que habitam a rizosfera podem ter o potencial de penetrar e colonizar as raízes das plantas. Esse micro-ecossistema tem sido amplamente conhecido como uma das fontes primárias para a colonização endofítica (HALLMANN et al., 1997; MÁRQUEZ-SANTACRUZ et al., 2010; WHITE et al., 2018b). Em síntese, a diversidade bacteriana endofítica pode ser considerada um subgrupo da população bacteriana associada à rizosfera (GERMIDA et al., 1998; MÁRQUEZ-SANTACRUZ et al., 2010, WHITE et al., 2018a, 2018b).

Os processos de colonização do tecido vegetal por bactérias endofíticas são complexos e incluem o reconhecimento do hospedeiro, adesão das células bacterianas à superfície vegetal e entrada, influenciados por fatores como composição do solo, regulação gênica, síntese de exopolissacarídeos e secreção de enzimas pelas bactérias (KANDEL; JOUBERT; DOTY, 2017). As fontes de colonização endofítica são diversas, variando de transmissão via sementes e por meio do ambiente circundante, como a rizosfera e a filosfera (FERREIRA et al., 2008; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011).

A diversidade da comunidade endofítica depende sobretudo dos componentes ambientais bióticos/abióticos e genótipos da bactéria/planta. Portanto, é difícil prever a população endofítica dentro de uma mesma planta, pois as espécies bacterianas podem variar dependendo do tecido vegetal e estação (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; ROSENBLUETH; MARTINEZ-ROMERO, 2006). Contudo, alguns gêneros são frequentemente encontrados como endofíticos na agricultura, os quais são *Bacillus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, e *Stenotrophomonas* (HALLMAN et al., 1997; MARQUEZ-SANTACRUZ et al., 2010; ROMERO et al., 2014; SHI et al., 2014; SANTOYO et al., 2016).

1.1.1 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio (N) é um constituinte vital para o crescimento e desenvolvimento vegetal (KIRKBY, 1981). Apesar de compor 78% atmosfera terrestre, o N não pode ser diretamente absorvido pela maioria dos seres vivos, pois está presente na forma de gás dinitrogênio (N₂), o qual possui uma forte e estável ligação tripla difícil de ser quebrada

(BLOOM, 2015; DE BRUIJN, 2015). Para tornar o nitrogênio assimilável pelas plantas, bactérias fixadoras de N, conhecidas como diazotróficas, realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo no qual há a redução de N₂ atmosférico em amônia (DE BRUIJN, 2015).

A FBN por bactérias endofíticas diazotróficas ocorre por meio da nitrogenase, proteína altamente conservada presente em todas as bactérias diazotróficas (MONTAÑEZ et al., 2012; IVLEVA et al., 2016). Nas plantas da família Fabaceae, há o desenvolvimento de órgãos simbióticos especializados, os nódulos, os quais internalizam bactérias como rizóbios e actinorrizas, que convertem o N atmosférico em uma forma assimilável pela planta (PISLARIU et al., 2019; HOANG et al., 2020; WHITE et al., 2021). Contudo, a fixação de N pode ocorrer sem a presença nódulos simbióticos por bactérias de vida livre, como no caso de plantas não leguminosas (DÖBEREINER, 1989; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011; THAWEENUT et al., 2011; ESKIN et al., 2014; WHITE et al., 2018b).

Chang, White e Kingsley (2021) encontraram evidências de outro mecanismo de fixação de N por bactérias diazotróficas, chamado de “Mecanismo de armadilha de nutrientes”. Nesse processo, bactérias de vida livre se tornam endofíticas e secretam etileno, induzindo o crescimento dos pelos radiculares, e conseqüentemente, o fornecimento de exsudatos às bactérias. Simultaneamente, ocorre a produção de superóxido pelas células radiculares, provocando a secreção de óxido nítrico/amônia pelas bactérias, para evitar sua própria degradação. Como resultado da reação dessas substâncias, ocorre a formação de nitrato, que é absorvido diretamente pelas raízes (CHANG; WHITE; KINGSLEY, 2021). Portanto, nesse caso, o N assimilável é produto do mecanismo de defesa bacteriano. O mecanismo de armadilha de nutrientes está intimamente relacionado com o crescimento dos pelos radiculares, os quais fornecem nutrientes para promover a replicação bacteriana e a fixação de N (WHITE et al., 2021).

1.1.2 Solubilização de fosfato

Fósforo (P) é um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento vegetal. Este mineral está presente na natureza como forma de fosfato, tornando-se altamente insolúvel com o passar do tempo e, conseqüentemente, indisponível para as plantas, visto que estas

absorvem P apenas na forma de íons na solução do solo (HOLFORD, 1997; GYANESHWAR et al., 2002). A deficiência desse macronutriente afeta negativamente a qualidade e o rendimento de culturas agrícolas, pois possui papel fundamental nos processos celulares vegetais, como fotossíntese, divisão celular, transporte de nutrientes, e regulação de vias metabólicas, sendo, portanto, essencial em todos os estágios da vida da planta (VASSILEV et al., 2012; BEHERA et al., 2014; RAZAQ et al., 2017; MALHOTRA; SHARMA; PANDEY, 2018).

Algumas BPCVs possuem a capacidade de tornar o P insolúvel do solo em forma solúvel para ser absorvido pelas plantas. A solubilização de fosfato pelas bactérias envolve diversos mecanismos, sendo o principal deles a produção de ácidos orgânicos que atuam como quelantes de íons minerais ou reduzem o pH para liberar o P na solução do solo (RASHID et al. 2004; PRADHAN; SHUKLA 2005; KHAN et al. 2010; MARRA et al. 2012; KHAN; ZAIDI; AHMED, 2014; LACAVA et al., 2021). Alguns dos gêneros mais importantes de bactérias solubilizadoras de fosfato são *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Rhizobium*, habitando majoritariamente a rizosfera (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999, ZHANG; HU; MA, 2018).

1.1.3 Produção de ácido indol-3-acético (AIA)

O fitormônio ácido indol-3-acético (AIA) possui papel importante no crescimento das plantas. Bactérias produtoras de AIA estimulam o desenvolvimento de pelos radiculares e raízes laterais, bem como aumento da superfície e comprimento radicular, proporcionando maior absorção de água e nutrientes pela planta (VESSEY, 2003; DAVIES, 2004; SPAEPEN et al., 2007; BATISTA et al., 2018). Em decorrência disso, ocorre crescimento vegetal e aumento da produção de exsudatos radiculares, resultando em maior atividade microbiana na região rizosférica (ETESAMI et al., 2015).

A síntese de AIA por bactérias rizosféricas é realizada a partir de exsudatos liberados pelas raízes das plantas, sendo o L-triptofano o principal precursor (SPAEPEN et al., 2007). Estudos mostram que bactérias de diferentes gêneros são capazes de sintetizar AIA e aumentar o crescimento radicular e foliar das plantas. Por exemplo, *Pseudomonas* sp. aumentou o comprimento de raiz, folha e número de vagens em *Vigna mungo*

(NOREEN et al., 2012). Da mesma forma, *Azospirillum* sp. promoveu o crescimento de plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) (ABAS-AKBARI et al., 2007; SPAEPEN et al., 2008; BAUDOIN et al., 2010), e o crescimento da raiz de plântulas de milho (*Zea mays*) (MASCIARELLI et al., 2013).

1.2 O gênero *Paspalum*

A Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos, SP, possui um Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*), composto atualmente, por aproximadamente 450 acessos de cerca de 50 espécies distintas, que estão sendo avaliadas para diferentes finalidades. O BAG da Embrapa Pecuária Sudeste é superado apenas pelo banco de germoplasma do United States Department of Agriculture – Agriculture Research Service (USDA-ARS), que possui 1439 acessos que, de certa forma, são complementares aos acessos conservados na Embrapa. O BAG *Paspalum* da Embrapa tem por objetivos o enriquecimento, a caracterização, a conservação, a documentação e a valoração de acessos de diferentes espécies do gênero. Estudos desenvolvidos com os acessos do BAG têm mostrado o grande potencial de espécies de *Paspalum* para forragem (BATISTA; GODOY, 2000; NOVO et al., 2016; PROVAZI et al., 2008) e cobertura de solo em beira de rodovias, aeroportos, taludes e ornamentação (DINATO, 2020; DE OLIVEIRA et al., 2020; SOUZA et al., 2015). Essas espécies podem ser exploradas para a produção de novas cultivares ou como parentais em programas de melhoramento (DINATO, 2020; DE OLIVEIRA et al., 2020). Dentro do banco, existem três acessos sexuais do grupo Plicatula que serão utilizados como acessos-ponte para cruzamentos com materiais apomíticos elite em programas de melhoramento genético para fins forrageiros, os quais pertencem às espécies *Paspalum rojasii*, *P. compressifolium* e *P. lenticulare* (GONÇALVES et al., 2021). Portanto, tornam-se fundamentais tanto estudos genéticos como relacionados à microbiota associada a essas espécies para a obtenção de máximos ganhos na produção de forragem.

Paspalum notatum, conhecida popularmente no Brasil como grama-batatais, é uma espécie de gramínea perene, de estação quente, rústica e de origem pan-americana, sendo cultivada como pastagem e cobertura vegetal permanente em vários países (DE SOUZA; CAVALLARI; GUSMÃO, 2020). Sua distribuição abrange todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente no hemisfério ocidental. É o principal constituinte

das pastagens nativas da região sul do Brasil, Paraguai, Uruguai, e nordeste da Argentina (GATES; QUARIN; PEDREIRA, 2004). Nos Estados Unidos, a grama-batatais (bahiagrass), é cultivada amplamente na porção sudeste do país e estado da Flórida, sendo uma das espécies mais populares para a pecuária nesse estado, devido à sua adaptação à baixa fertilidade do solo (WALLAU et al., 2019).

Essa espécie tem sido utilizada extensivamente como pasto e gramado para estabilização do solo, e por ser uma espécie forrageira, a grama-batatais fornece qualidade nutricional adequada para animais adultos (BLOUNT; ACUÑA, 2009). Além disso, é conhecida por sua persistência sob pastejo contínuo e desfolhamento intenso (BEATY; MORRIS, 1970), além de possuir boa adaptação em solo arenoso e pouco fértil (BLOUNT; ACUÑA, 2009).

O estudo pioneiro com microrganismos promotores de crescimento vegetal dentro do gênero *Paspalum* foi realizado por Döbereiner (1966), que descobriu uma bactéria rizosférica fixadora de N com alta especificidade na associação com cinco genótipos de *P. notatum*, nomeada de *Azotobacter paspali* (DOBEREINER, 1966; DOBEREINER; CAMPELO, 1971). Essa espécie bacteriana é restrita a apenas alguns genótipos de *P. notatum*, sendo encontrada em 98% das amostras de rizosfera coletadas em diferentes locais do Brasil e Estados Unidos (DÖBEREINER, 1970). Foi observado um declínio na população de *A. paspali* em plantas de *P. notatum* transferidas para novo solo, entretanto, após quatro a doze meses, a população foi reestabelecida (DÖBEREINER; CAMPELO, 1971). Esses resultados sugerem uma rara e altamente específica interação entre a BPCV e *P. notatum* (NEYRA; DÖBEREINER, 1977).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar bactérias endofíticas e rizosféricas de *Paspalum rojasii*, *Paspalum lenticulare*, e *Paspalum compressifolium* quanto à capacidade de promover crescimento vegetal.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar a comunidade bacteriana de raízes, folhas e solos de *Paspalum rojasii* (BGP 272), *P. lenticulare* (BGP 281) e *P. compressifolium* (BGP 380) do BAG de *Paspalum* da EMBRAPA;
- Criar um banco de cultura bacteriano de isolados das plantas do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum*;
- Identificar bactérias endofíticas e rizosféricas de *Paspalum* spp. com capacidade de promoção de crescimento vegetal através de testes *in vitro* para fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de ácido indol-3-acético e antagonismo aos fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Claviceps purpurea*;
- Identificar bactérias promotoras de crescimento vegetal por meio do sequenciamento de regiões do gene 16S;
- Avaliar o potencial de promoção de crescimento vegetal das bactérias endofíticas e rizosféricas por meio de testes *in vivo* em *Paspalum notatum* e *Poa annua*;
- Confirmar a colonização bacteriana nas plantas por meio de análise microscópica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados bacterianos

As bactérias utilizadas no presente estudo foram isoladas de solo rizosférico, raiz e folha de *Paspalum rojasii* BGP 272, *Paspalum lenticulare* BGP 281 e *Paspalum compressifolium* BGP 380, conservadas no Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum*, localizado na Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos, São Paulo, Brasil (21.9887° S, 47.8787° O). As coletas foram realizadas em 31 de outubro de 2017, no início do período chuvoso.

3.1.1 Isolamento de bactérias rizosféricas

O isolamento das bactérias rizosféricas foi realizado de acordo com o protocolo de MOHITE (2013) com modificações. Foram utilizadas três amostras de 10 g cada e adicionados

90 mL de solução tampão PBS esterilizada (NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g; 1000 mL de água destilada; pH 7,4) em erlenmeyers previamente autoclavados, e em seguida mantidos por 30 minutos sob agitação constante a 150 rpm. Em tampão PBS foram realizadas diluições seriadas, de fator 10 (10⁻⁰, 10⁻¹, 10⁻² e 10⁻³) das suspensões de solo obtidas. Foram adicionadas alíquotas de 0,1 mL das diluições seriadas utilizadas e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, em duplicata, em placas de Petri contendo o meio de cultura Triptona Soja Ágar (TSA) Kasvi e meio International Streptomyces Project (ISP2), (ambos suplementados com Benomyl[®] a 50 µg.mL⁻¹ para evitar contaminação fúngica) e incubadas à temperatura de 28 °C por 48 horas e 168 horas, respectivamente. A purificação das colônias foi feita por estrias de esgotamento em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura (TSA e ISP2), sendo incubadas por mais 48 horas.

Depois de confirmada a pureza das culturas, as linhagens bacterianas foram inoculadas em meio Tryptic Soy Broth (TSB) e caldo ISP2 por 48 horas. As bactérias foram estocadas em microtubos de 1,5 mL contendo 500 µL da suspensão bacteriana suplementada com 500 µL glicerol e armazenados em freezer a - 80 °C.

3.1.2 Isolamento de bactérias endofíticas

As amostras de folhas e raízes (10 g cada) foram submetidas à desinfecção superficial, sendo primeiramente imersas durante 2 minutos em álcool 70%, seguido de 3 minutos em hipoclorito de sódio 3%, novamente em álcool 70% durante 1 minuto e depois imersas por duas vezes em água destilada esterilizada (ARAÚJO et al., 2014). Em seguida, as folhas e as raízes foram cortadas assepticamente em pequenos fragmentos, sendo as folhas maceradas em 10 mL de tampão PBS. Os macerados foliares e os fragmentos radiculares foram transferidos para tubos de 50 mL que foram incubados em agitação constante por 1 hora a 28 °C. As etapas de diluição seriada, incubação e purificação foram realizadas seguindo a mesma metodologia utilizada para bactérias rizosféricas.

3.1.3 Contagem e seleção das bactérias cultiváveis

A quantificação das bactérias cultiváveis isoladas foi realizada por contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) e o cálculo da frequência de isolamento (FI) foi

realizado conforme proposto por Araújo et al. (2014). As bactérias foram selecionadas com base nas características morfológicas das colônias para melhor amostragem da diversidade.

3.3 Avaliação *in vitro* do potencial dos isolados bacterianos para solubilização de fosfato, fixação biológica de nitrogênio e produção de AIA

Para verificar o potencial dos isolados bacterianos em promover o crescimento vegetal, foram realizados testes de solubilização de fosfato (SF), fixação biológica de nitrogênio (FBN), e produção de ácido-3-indol-acético (AIA).

3.3.1 Solubilização de fosfato

O teste de solubilização de fosfato foi realizado em meio ágar nutriente suplementado com fosfato insolúvel CaHPO_4 (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001), em triplicata. A capacidade dos isolados bacterianos de solubilizar fosfato foi avaliada por meio do índice de solubilização de fosfato (ISF), sendo classificada como: baixa ($\text{ISF} < 2$), média ($2 < \text{ISF} < 3$) e alta ($\text{ISF} > 3$) (SILVA FILHO; VIDOR, 2000).

3.3.2 Fixação biológica de nitrogênio

O potencial dos isolados microbianos em realizar FBN foi avaliada qualitativamente *in vitro* segundo Döbereiner; Baldani; Baldini, (1995). As bactérias foram inoculadas em meio semissólido NFb, em triplicata, e incubadas a 28°C por 96 h. O resultado positivo para a fixação de N_2 foi determinado pela formação de halo horizontal de crescimento no interior do meio de cultura. As bactérias que apresentaram formação de halo, foram inoculadas novamente em meio NFb e avaliadas depois de 7 dias para a confirmação do resultado positivo.

3.3.3 Produção de ácido indol-3-acético

A quantificação da produção de AIA foi realizada por meio do método originalmente proposto por BRIC; BOSTOCK; SILVERSTONE, (1991) adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2016), em triplicata para cada isolado bacteriano.

3.3.4 Potencial de antagonismo

Quatro isolados bacterianos que apresentaram potencial para promoção de crescimento *in vitro* foram selecionados para o teste de antagonismo qualitativo contra os fungos fitopatogênicos *Claviceps purpurea* e *Fusarium oxysporum* da coleção microbiológica do laboratório do Prof. Dr. James White, Department of Plant Biology, Rutgers University, New Brunswick, NJ, EUA. Foi realizada a técnica de cultura pareada, na qual os fungos fitopatogênicos foram colocados em crescimento em meio BDA e após sete dias de crescimento, retirou-se um disco de 7 mm dessa cultura. O disco contendo cada fungo foi posicionado a 1.5 cm da borda da placa de Petri contendo meio BDA, e na outra extremidade, uma estria do isolado bacteriano previamente cultivado em meio LB (MELO; VALARINI, 1995; CHANG et al., 1999; LISBOA et al., 2021).

3.4 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos

Um total de 26 isolados bacterianos que apresentaram potencial para promoção de crescimento vegetal foram identificados por meio do sequenciamento de regiões do gene 16S do DNA ribossomal (DNAr). A extração do DNA genômico foi realizada com o kit de extração de DNA GenElute Bacterial Genomic DNA Kits (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), sendo amplificadas três regiões utilizando os primers universais 16SF (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 16SR (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3') (VERMA et al., 2015), 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991), V3F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') e V6R (5' ACAGCCATGCANCACT 3') (YANG; WANG; QIAN, 2016). Os produtos de PCR utilizando os primers 16SF, 16SR e 1492R foram purificados com o kit GenElute™ (Sigma-Aldrich) e sequenciados pelo método de Sanger, por Genewiz Inc. (South Plainfield, NJ, USA). O sequenciamento usando os primers V3F e V6R foi realizada de acordo com De Paula (2019).

As sequências forward e reverse de cada par foram alinhadas utilizando o software DNA Baser sequence assembly (Heracle BioSoft S.R.L.) e as sequências consenso entre as diferentes regiões amplificadas foram obtidas no software MEGA (versão 10.1.5) (KUMAR et al., 2018) quando havia mais de uma sequência para o isolado. Para identificação dos isolados bacterianos, as sequências obtidas foram comparadas com

sequências depositadas no banco GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando a ferramenta BLASTn (ZHANG et al., 2000; MORGULIS et al., 2008), e com o banco de dados EzBiocloud 16S database utilizando a ferramenta 16S-based ID (YOON et al., 2017).

3.5 Promoção de crescimento vegetal *in vivo*

3.5.1 Seleção de isolados

Para o experimento de promoção de crescimento vegetal *in vivo*, foram selecionados isolados bacterianos que apresentaram potencial para promoção de crescimento vegetal de acordo com os testes *in vitro*. Todos apresentaram potencial para fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de AIA.

3.5.2 Material vegetal

Os experimentos *in vivo* foram realizados em *P. notatum* e *P. annua*, para triagem dos isolados bacterianos. Utilizou-se sementes de *P. notatum* (cultivar Argentine), da marca Wonderlawn[®], lote 8340, e sementes de *Poa annua* (Gramma-azul) obtidas do programa de melhoramento de gramíneas da Rutgers University, New Brunswick, NJ, EUA.

Os experimentos *in vivo* foram realizados no laboratório do Prof. Dr. James F. White, Department of Plant Biology and Pathology, Rutgers University, New Brunswick, NJ, EUA.

3.5.3 Desinfecção superficial das sementes de *Paspalum notatum* e *Poa annua*

As sementes de *P. notatum* foram submetidas a tratamento com H₂SO₄ a 98% por 10 minutos para quebra de dormência, em seguida, lavadas com água esterilizada, e posteriormente desinfetadas com NaOCl (Clorox[®]) a 4% por 30 minutos sob agitação constante. As sementes de *P. annua* foram tratadas com NaOCl (Clorox[®]) a 4% por 20-25 minutos sob agitação constante. Após desinfetadas, as sementes foram lavadas com água esterilizada e duplamente destilada para a remoção completa de NaOCl das superfícies das sementes (VERMA et al., 2018).

3.6 Avaliação *in vivo* do potencial dos isolados bacterianos para promoção de crescimento vegetal

As sementes de *P. notatum* e *P. annua* desinfectadas foram submersas em suspensões bacterianas a $10^6 - 10^8$ cel.mL⁻¹ por 2 horas (50 sementes para 1 mL de cada solução), e em seguida transferidas para placas de Petri contendo 0.7% de agarose (10 sementes por placa) (VERMA et al., 2018). Nos experimentos em placas de agarose não foi adicionado *Fusarium oxysporum*.

Em outro experimento, somente as sementes de *P. notatum* desinfectadas foram submetidas a diferentes tratamentos (Tabela 1) por 2 horas. As concentrações utilizadas nos tratamentos foram $10^6 - 10^8$ cel.mL⁻¹ nas suspensões bacterianas, e $10^4 - 10^6$ cels.mL⁻¹ na suspensão fúngica. As sementes foram colocadas em caixas Magenta (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) contendo 15 gramas de substrato composto por turfa, areia e perlita na proporção de 2:2:1, e 40 mL de água esterilizada (10 sementes por caixa). (WHITE et al., 2018a).

Os experimentos em agarose e substrato foram realizados em triplicata e incubados em ambiente controlado com temperatura de $30\pm 2^\circ\text{C}$ durante o dia, e $20\pm 2^\circ\text{C}$ durante a noite, com 12 horas de fotoperíodo.

Após 7 dias de incubação em 0.7% de agarose, foram avaliados o comprimento de raiz, comprimento de folha, presença e características dos pelos radiculares das plântulas de *Poa annua* submetidas aos diferentes tratamentos (Tabela 2). Após 19 dias de experimento em substrato, foram avaliados os seguintes parâmetros nas plântulas de *P. notatum*: comprimento de raiz, comprimento de folha, e taxa de germinação das plântulas de *P. notatum*. Os comprimentos de raiz e folha foram baseados na maior raiz e maior folha de cada plântula e calculadas as médias para cada tratamento. Em seguida, as plântulas de *P. notatum* foram transferidas para estufa a 70°C por 48 h, e então as raízes e as folhas foram pesadas em balança eletrônica separadamente.

Tabela 1. Composição dos nove tratamentos aplicados às sementes de *P. notatum* e controle. Estão indicados a identificação do isolado, gênero bacteriano e presença de *Fusarium oxysporum* em cada tratamento.

Isolado bacteriano	Tratamento
-	Controle
3	<i>Alcaligenes</i> sp.
41	<i>Pseudomonas</i> sp.
51	<i>Serratia</i> sp.
86	<i>Enterobacter</i> sp.
-	<i>F. oxysporum</i>
3	<i>Alcaligenes</i> sp. + <i>F. oxysporum</i>
41	<i>Pseudomonas</i> sp. + <i>F. oxysporum</i>
51	<i>Serratia</i> sp. + <i>F. oxysporum</i>
86	<i>Enterobacter</i> sp. + <i>F. oxysporum</i>

Tabela 2. Composição dos cinco tratamentos aplicados às sementes de *Poa annua* e controle. Estão indicados a identificação do isolado e gênero bacteriano em cada tratamento.

Isolado	Gênero bacteriano
-	Controle
27	<i>Pseudomonas</i> sp.
33	<i>Enterobacter</i> sp.
41	<i>Pseudomonas</i> sp.
83	<i>Enterobacter</i> sp.
86	<i>Enterobacter</i> sp.

3.7 Visualização da colonização bacteriana em microscópio óptico por coloração com tetracloreto de 3,3'- diaminobenzidina (DAB)

Após 7 dias de incubação em 0.7% de agarose, as raízes das plântulas de *P. notatum* e *P. annua* foram coradas por inundação em placas de Petri com 2.5 mM de tetracloreto de 3-3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) por 15 horas. DAB é utilizado para visualização do efeito do oxigênio reativo (H_2O_2) produzido ao redor e no interior das células bacterianas (WHITE et al., 2015). Em seguida, as raízes foram coradas com anilina azul para melhor visualização em microscópio óptico de campo claro. As análises foram realizadas em lentes oculares de 10x e objetivas de 10x, 40x e 100x.

3.8 Análise estatística

Para discriminação dos tratamentos, para os descritores comprimento de raiz e comprimento de folha das plântulas de *P. notatum* em substrato e *P. annua* em agarose, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para 1 fator seguida pelo teste de médias Tukey com nível 0.05 de significância, utilizando o programa SPSS versão 21.0 (IBM). Os outliers foram removidos pelo método de Hoaglin e Iglewicz (1987).

Foi realizada a Análise dos Componentes Principais (ACP) para discriminação dos isolados bacterianos quanto às suas capacidades em solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e produzir AIA, utilizando o programa estatístico Past, versão 2.17c (HAMMER et al., 2001).

A ACP é uma técnica da estatística multivariada que transforma um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais. Cada componente principal é uma combinação linear das variáveis originais, com a finalidade de explicar o máximo da variabilidade total dessas variáveis originais e não-correlacionadas entre si (JOHNSON; WICHERN, 1998; HONGYU, 2015).

O primeiro componente retém a maior parte da variação total dos dados originais, sendo, portanto, o de maior importância. O segundo componente principal é o segundo mais importante, e, assim sucessivamente, até que toda a variância tenha sido explicada (MORRISON, 1976). A análise agrupa os indivíduos de acordo com sua variação, dessa forma, os indivíduos são agrupados segundo suas variâncias e seu comportamento dentro da população, representado pela variação do conjunto de características que define o indivíduo. Portanto, a técnica agrupa os indivíduos de uma população segundo a variação de suas características (HONGYU et al., 2016).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento, identificação taxonômica e potencial agrônomo das bactérias endofíticas e rizosféricas associadas a *Paspalum rojasii*, *P. lenticulare* e *P. compressifolium*

4.1.1 Frequência de isolamento das bactérias endofíticas e rizosféricas

As maiores populações bacterianas foram observadas na rizosfera e raiz das plantas. O cálculo da frequência de isolamento (FI) indicou que a rizosfera e raiz de *P. lenticulare* apresentaram a maior quantidade de células bacterianas em comparação aos mesmos segmentos das outras espécies de *Paspalum* (Tabela 3). Entretanto, nas folhas, a maior população bacteriana foi observada em *P. rojasii*.

A frequência de isolamento encontrada no presente trabalho corrobora com os resultados encontrados por De Paula (2019) e Amaral et al. (2022), que encontraram o maior número de isolados bacterianos na rizosfera e raiz de diferentes espécies de *Paspalum*.

Tabela 3. Frequência de isolamento (FI) de bactérias de rizosfera, raiz e folha de *P. rojasii*, *P. lenticulare* e *P. compressifolium*.

Planta	Solo/tecido	FI (UFC g.solo ou tecido ⁻¹)
<i>P. rojasii</i>	Folha	1.56 x 10 ³
<i>P. lenticulare</i>	Folha	0.005 x 10 ³
<i>P. compressifolium</i>	Folha	0.005 x 10 ³
<i>P. rojasii</i>	Raiz	7.35 x 10 ³
<i>P. lenticulare</i>	Raiz	32.3 x 10 ³
<i>P. compressifolium</i>	Raiz	26.5 x 10 ³
<i>P. rojasii</i>	Rizosfera	350 x 10 ³
<i>P. lenticulare</i>	Rizosfera	1,090 x 10 ³
<i>P. compressifolium</i>	Rizosfera	289.5 x 10 ³

Foram selecionados 107 isolados bacterianos associados às três espécies de *Paspalum*, sendo 35 isolados de *P. rojasii* (BGP 272), 39 de *P. lenticulare* (BGP 281), e 31 de *P. compressifolium* (BGP 380). Quanto à origem do isolamento, 43 isolados foram

provenientes de raiz, 32 de rizosfera e 32 de folha. Entretanto, apenas 105 isolados permaneceram viáveis após purificação em meio de cultura e foram selecionados em testes *in vitro* para promoção de crescimento vegetal.

4.1.2 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos

Foram identificados 26 isolados bacterianos da rizosfera, raiz e folha das espécies *P. rojasii*, *P. compressifolium* e *P. lenticulare*, os quais apresentaram potencial para promoção de crescimento vegetal baseado nos testes *in vitro*. Foram encontrados dois filios, quatro classes e sete gêneros bacterianos, sendo todas as bactérias gram-negativas (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição taxonômica dos isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos de *Paspalum* spp.

Filo	Classe	Gênero	Número de isolados
Proteobacteria	α - Proteobacteria	<i>Agrobacterium</i>	2
	β - Proteobacteria	<i>Alcaligenes</i>	1
		<i>Enterobacter</i>	6
	γ - Proteobacteria	<i>Serratia</i>	3
		<i>Pantoea</i>	1
Bacteroidetes	Flavobacteriia	<i>Pseudomonas</i>	11
		<i>Flavobacterium</i>	2

Os resultados mostram a predominância do filo Proteobacteria e gênero *Pseudomonas* nos isolados identificados. Os únicos dois isolados pertencentes ao filo Bacteroidetes e gênero *Flavobacterium*, foram isolados das folhas de *P. rojasii*. O domínio de BPCVs do filo Proteobacteria também foi observado em diversos gêneros vegetais da família *Poaceae* (PATEL; ARCHANA, 2017), e abundância dos gêneros *Enterobacter*, *Pantoea* e *Pseudomonas* em *Paspalum* spp. (DE PAULA, 2019).

A microbiota associada à planta é diretamente influenciada pela variação da expressão gênica do seu hospedeiro, o qual pode alterar a comunidade microbiana presente nas raízes, rizosfera e folhas (LUNDBERG et al., 2012; HORTON et al., 2014; LEBEIS et al., 2015). Fatores bióticos/abióticos e idade da planta hospedeira são exemplos de condições que provocam variações genéticas em características vegetais funcionais, alterando o seu microbioma associado (WAGNER et al., 2016). Além disso, bactérias da

comunidade rizosférica podem se tornar endofíticas e vice-versa (HUANG et al., 2020). Diferenças nas comunidades bacterianas associadas a espécies de *Paspalum* de acordo com variações climáticas foram observadas por De Paula (2019), que encontrou bactérias do gênero *Bacillus* apenas quando o isolamento foi realizado em período de seca, e *Pantoea* spp. somente em período de chuva. Corroborando com esses resultados, no presente trabalho, no qual o isolamento foi realizado em estação chuvosa, nenhuma bactéria do gênero *Bacillus* foi encontrada dentre os isolados identificados, em contrapartida, foram encontradas bactérias do gênero *Pantoea* sp.

Considerando a dinâmica interação entre planta-bactéria, supõe-se que pode haver alteração na predominância de gêneros na comunidade microbiana das espécies de *Paspalum* do presente trabalho, dependendo das condições climáticas, idade da planta, interações bióticas, dentre outros fatores.

4.1.3 Potencial dos isolados bacterianos para promoção de crescimento vegetal *in vitro*

Dentre os 105 isolados bacterianos selecionados para testes de promoção de crescimento vegetal *in vitro*, 50 isolados (47.6%) solubilizaram fosfato inorgânico, 38 (36.2%) fixaram nitrogênio, e 93 (88.6%) produziram AIA (Tabela 5). Dentre as bactérias que solubilizaram fosfato inorgânico, o índice de solubilização de fosfato (ISF) variou de 1.32 a 4.71, e dentre aquelas que produziram AIA, a quantidade variou de 0.12 a 230.76 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Alta porcentagem de bactérias produtoras de AIA (81%) também foi encontrada em isolados de outras espécies da família *Poaceae* (PATEL; ARCHANA, 2017). Diferentemente dos resultados obtidos no presente trabalho, Amaral et al. (2021) constataram aproximadamente 16% de bactérias produtoras de AIA associadas a espécies de *Paspalum*, sendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ o máximo valor de AIA detectado. Isolados bacterianos de *Tripogon spicatus*, da família *Poaceae*, também apresentaram valores mais baixos de AIA (FERNANDES-JÚNIOR et al., 2015). Da mesma forma, Sarathambal et al. (2015) observaram variação de 11.3 ± 1.22 a 36.8 ± 1.24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ na produção de AIA em isolados bacterianos rizosféricos de gramíneas tropicais do semi-árido da Índia.

O AIA secretado pelas bactérias rizosféricas atuam em conjunto com o suprimento de AIA endógeno da planta. Deste modo, dependendo do nível de AIA secretado e a sensibilidade do tecido vegetal ao fitormônio, o AIA bacteriano pode ter um efeito positivo

ou negativo nas plantas (ALI et al., 2010). Apesar das plantas possuírem um sistema regulatório que mantém a homeostase de AIA, altos níveis de AIA proveniente das bactérias podem anular a regulação deste fitormônio, provocando efeitos deletérios, como inibição do crescimento das raízes primárias (LOMAX; MUDAY; RUBERY, 1995; DUCA et al., 2014). Sendo assim, o conhecimento do nível ótimo de AIA da planta alvo é imprescindível para a escolha adequada do inoculante para a promoção de crescimento vegetal.

Tabela 5. Identificação molecular e capacidade dos 105 isolados bacterianos para solubilizar fosfato, produzir ácido indol-3-acético e fixar nitrogênio.

Solo/tecido	Planta	Isolado	Gênero bacteriano	Número de acesso (GenBank)	ISF	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	FBN
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	1	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396669	1.69	15.32	+
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	2	NI	NI	1.44	14.15	-
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	3	<i>Alcaligenes</i> sp.	OK396670	2.25	37.43	+
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	4	NI	NI	0	23.55	+
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	5	NI	NI	2.06	12.5	-
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	6	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396656	4.71	24.69	+
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	7	NI	NI	0	13.3	-
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	8	NI	NI	2.36	13.3	-
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	9	NI	NI	1.59	14.42	+
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	10	NI	NI	0	4.82	-
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	11	NI	NI	0	4.35	-
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	12	NI	NI	0	16.16	-
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	13	NI	NI	1.6	2.58	-
Folha	<i>P. compressifolium</i>	14	NI	NI	0	1.91	-
Folha	<i>P. compressifolium</i>	15	NI	NI	1.45	2.73	-
Folha	<i>P. compressifolium</i>	16	NI	NI	0	5.96	+
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	17	NI	NI	0	8.67	-
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	18	NI	NI	1.39	1.34	+
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	19	NI	NI	0	1.46	-
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	20	NI	NI	0	31.88	-
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	21	<i>Agrobacterium</i> sp.	OK396671	2.4	55.32	-
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	22	NI	NI	0	0	-
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	23	NI	NI	0	4.92	+
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	24	NI	NI	0	7.08	-
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	25	NI	NI	0	1.34	+
Rizosfera	<i>P. rojasii</i>	26	NI	NI	0	13.72	-
Rizosfera	<i>P. rojasii</i>	27	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396657	2.03	20.02	+
Rizosfera	<i>P. rojasii</i>	28	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396672	2.04	46.24	+

Solo/tecido	Planta	Isolado	Gênero bacteriano	Número de acesso (GenBank)	ISF	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	FBN
Rizosfera	<i>P. rojasii</i>	29	NI	NI	1.2	12.11	+
Folha	<i>P. rojasii</i>	30	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396658	2.87	24.99	+
Folha	<i>P. rojasii</i>	31	<i>Enterobacter</i> sp.	OK396673	2	69.69	-
Folha	<i>P. rojasii</i>	32	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396659	2.29	26.58	+
Folha	<i>P. rojasii</i>	33	<i>Enterobacter</i> sp.	OK396660	2.18	25.69	+
Folha	<i>P. rojasii</i>	34	<i>Enterobacter</i> sp.	OK396674	1.76	111.29	-
Folha	<i>P. rojasii</i>	35	NI	NI	2.5	6.41	-
Folha	<i>P. rojasii</i>	36	<i>Enterobacter</i> sp.	OK396661	3.93	7.31	+
Folha	<i>P. rojasii</i>	37	NI	NI	0	22.63	+
Folha	<i>P. rojasii</i>	38	<i>Pantoea</i> sp.	OK396662	3.13	99.17	+
Folha	<i>P. rojasii</i>	39	<i>Flavobacterium</i> sp.	OK396675	2.02	93.9	-
Folha	<i>P. rojasii</i>	40	NI	NI	1.73	113.87	-
Folha	<i>P. rojasii</i>	41	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396663	2.33	23.3	+
Folha	<i>P. rojasii</i>	42	<i>Flavobacterium</i> sp.	OK396681	1.9	81.58	+
Raiz	<i>P. rojasii</i>	43	NI	NI	0	11.21	+
Raiz	<i>P. rojasii</i>	44	NI	NI	1.36	6.21	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	45	NI	NI	2.13	4.25	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	46	NI	NI	0	3.57	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	47	NI	NI	1.43	4.25	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	48	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396676	2.67	68.52	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	49	NI	NI	0	2.65	-
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	50	NI	NI	0	4.62	-
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	51	<i>Serratia</i> sp.	OK396664	2.29	2.68	+
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	52	<i>Serratia</i> sp.	OK396677	2.71	3.23	+
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	53	NI	NI	0	1.66	-
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	54	NI	NI	0	1.93	-
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	55	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396665	3	9.72	+
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	56	NI	NI	0	11.91	-
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	57	NI	NI	0	11.34	+
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	58	NI	NI	0	16.93	-
Folha	<i>P. lenticulare</i>	59	NI	NI	0	6.51	-
Folha	<i>P. lenticulare</i>	60	<i>Serratia</i> sp.	OK396678	1.35	11.98	+
Folha	<i>P. lenticulare</i>	61	NI	NI	2.6	1.96	-
Folha	<i>P. lenticulare</i>	62	NI	NI	1.39	0	-
Folha	<i>P. lenticulare</i>	63	NI	NI	0	10.51	-
Folha	<i>P. lenticulare</i>	64	NI	NI	1.4	7.8	-
Folha	<i>P. lenticulare</i>	65	NI	NI	0	16.21	+
Folha	<i>P. lenticulare</i>	66	NI	NI	0	7.65	-
Folha	<i>P. lenticulare</i>	67	NI	NI	0	0	-
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	68	NI	NI	1.98	2.28	-
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	69	NI	NI	0	1.04	-
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	70	NI	NI	1.45	4.54	+

Solo/tecido	Planta	Isolado	Gênero bacteriano	Número de acesso (GenBank)	ISF	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	FBN
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	71	NI	NI	0	103.72	-
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	72	NI	NI	0	9.4	-
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	73	NI	NI	1.73	3.4	+
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	74	NI	NI	0	8.2	+
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	75	NI	NI	0	2.21	-
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	76	NI	NI	2.19	0.71	+
Rizosfera	<i>P. compressifolium</i>	77	NI	NI	0	11.11	-
Folha	<i>P. compressifolium</i>	78	NI	NI	0	0.12	-
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	79	NI	NI	0	0.59	+
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	80	NI	NI	0	0.61	-
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	81	NI	NI	0	2.11	+
Raiz	<i>P. compressifolium</i>	82	NI	NI	0	10.66	-
Rizosfera	<i>P. rojasii</i>	83	<i>Enterobacter</i> sp.	OK396666	2.23	74.15	+
Rizosfera	<i>P. rojasii</i>	84	NI	NI	0	48.38	-
Rizosfera	<i>P. rojasii</i>	85	NI	NI	0	2.8	-
Folha	<i>P. rojasii</i>	86	<i>Enterobacter</i> sp.	OK396667	2.81	223.6	+
Raiz	<i>P. rojasii</i>	87	<i>Agrobacterium</i> sp.	OK396679	0	230.76	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	88	NI	NI	0	0	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	89	NI	NI	0	0	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	90	NI	NI	0	12.26	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	91	NI	NI	0	6.26	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	92	NI	NI	0	0	-
Raiz	<i>P. rojasii</i>	93	NI	NI	0	6.81	-
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	94	NI	NI	1.39	6.19	-
Rizosfera	<i>P. lenticulare</i>	95	NI	NI	0	0	-
Folha	<i>P. lenticulare</i>	96	NI	NI	0	39.47	-
Folha	<i>P. lenticulare</i>	97	NI	NI	1.48	2.36	-
Folha	<i>P. lenticulare</i>	98	NI	NI	0	24.1	+
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	99	NI	NI	2.19	79.69	-
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	100	NI	NI	0	4.67	-
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	101	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396668	3.02	11.09	+
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	102	<i>Pseudomonas</i> sp.	OK396680	1.9	12.16	+
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	103	NI	NI	0	0	-
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	104	NI	NI	1.32	10.99	-
Raiz	<i>P. lenticulare</i>	105	NI	NI	3.55	0	-

ISF = índice de solubilização de fosfato; AIA = produção de ácido idol-3-acético; FBN = fixação biológica de nitrogênio (“+” = positivo, “-” = negativo; NI = não identificado).

Dos 105 isolados bacterianos, foram encontradas 26 bactérias que apresentaram os três parâmetros de promoção de crescimento vegetal analisados (Figura 1), 22 bactérias solubilizadoras de fosfato e produtoras de AIA, mas que não fixaram N, 12 fixadoras de N

e produtoras de AIA, que, entretanto, não solubilizaram fosfato. Nenhum isolado somente fixou N, ou solubilizou fosfato e fixou N simultaneamente.

A maioria dos isolados bacterianos foi capaz de produzir AIA, mesmo que em baixa quantidade, e 36 bactérias apenas produziram AIA e não apresentaram os outros mecanismos promotores de crescimento vegetal avaliados. A presença do AIA nas bactérias está diretamente relacionada à sua estratégia de colonização e sobrevivência, promovendo o crescimento vegetal e inibindo o mecanismo de defesa da planta hospedeira, o qual é ativado quando a planta entra em contato com o microrganismo (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). Dessa forma, a produção de AIA pelas bactérias é capaz de auxiliar na interação planta-bactéria e na eficiência da colonização bacteriana (PATTEN; GLICK, 2002). Considerando o papel do AIA na colonização bacteriana, os resultados encontrados no presente trabalho reforçam que o AIA é provavelmente necessário para a sobrevivência das bactérias associadas às plantas.

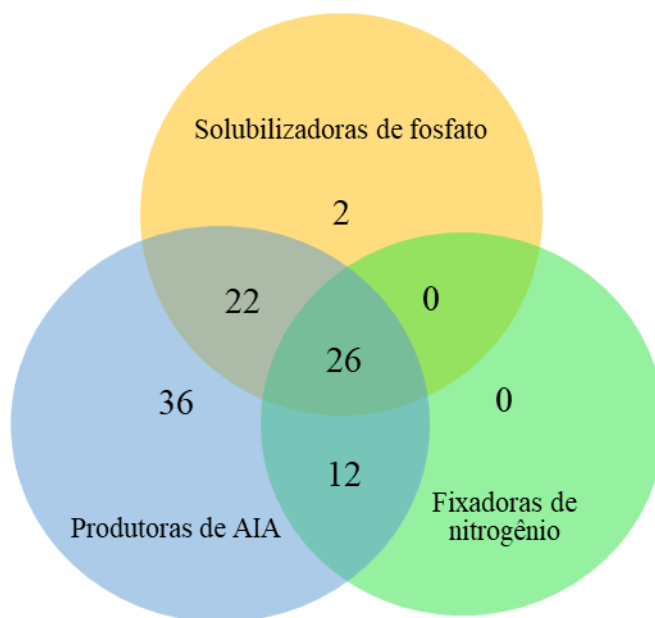


Figura 1. Diagrama de Venn resumindo o número de bactérias isoladas de *P. rojasii*, *P. lenticulare*, e *P. compressifolium* que apresentaram resultados positivos os parâmetros de promoção de crescimento vegetal. Laranja: bactérias solubilizadoras de fosfato; Azul: bactérias produtoras de AIA; Verde: bactérias fixadoras de nitrogênio.

A análise de componentes principais (ACP) indicou que o primeiro e o segundo componente principal explicaram 80.33% da variância dos dados dentro dos parâmetros ISF, FBN e AIA (Tabela 6). O componente principal 1 (CP1) explicou 48.80% e o componente principal 2 (CP2) explicou 31.53% da variância dos dados.

Tabela 6. Análise dos componentes principais dos parâmetros avaliados no experimento de promoção de crescimento vegetal *in vitro*.

Componente	Autovalor	% da variância
1	1.46	48.80
2	0.95	31.53
3	0.59	19.66

No CP1, o parâmetro índice de solubilização de fosfato foi o que mais explicou a variância dos dados, seguido por fixação biológica de nitrogênio e produção de AIA (Tabela 7). Todos os parâmetros apresentaram cargas fatoriais positivas no CP1, mostrando que estes estão positivamente correlacionados entre si. No CP2, o parâmetro produção de AIA foi o que mais contribuiu para a variância dos dados, seguido por fixação biológica de nitrogênio. Os parâmetros índice de solubilização de fosfato e fixação biológica de nitrogênio apresentam carga fatorial negativa e estão positivamente correlacionados entre si, mas negativamente correlacionados com produção de AIA.

Tabela 7. Contribuição dos parâmetros avaliados no experimento de promoção de crescimento vegetal *in vitro* para cada componente principal (CP1 e CP2). Parâmetros avaliados: índice de solubilização de fosfato (ISF), fixação biológica de nitrogênio (FBN) e produção de ácido indol-3-acético (AIA).

Parâmetro	CP1	CP2
ISF	0.684	- 0.060
FBN	0.595	- 0.531
AIA	0.422	0.846

De acordo com o gráfico de dispersão dos componentes principais 1 e 2 (Figura 2), os isolados que apenas produziram AIA ou não apresentaram resultados positivos para parâmetro algum, estão distribuídos ao lado superior esquerdo do gráfico. Os isolados distribuídos ao lado superior direito do gráfico, apresentaram altos valores para produção de AIA. A maioria desses isolados com alta produção de AIA foi obtida de *P. rojasii* (Tabela 5).

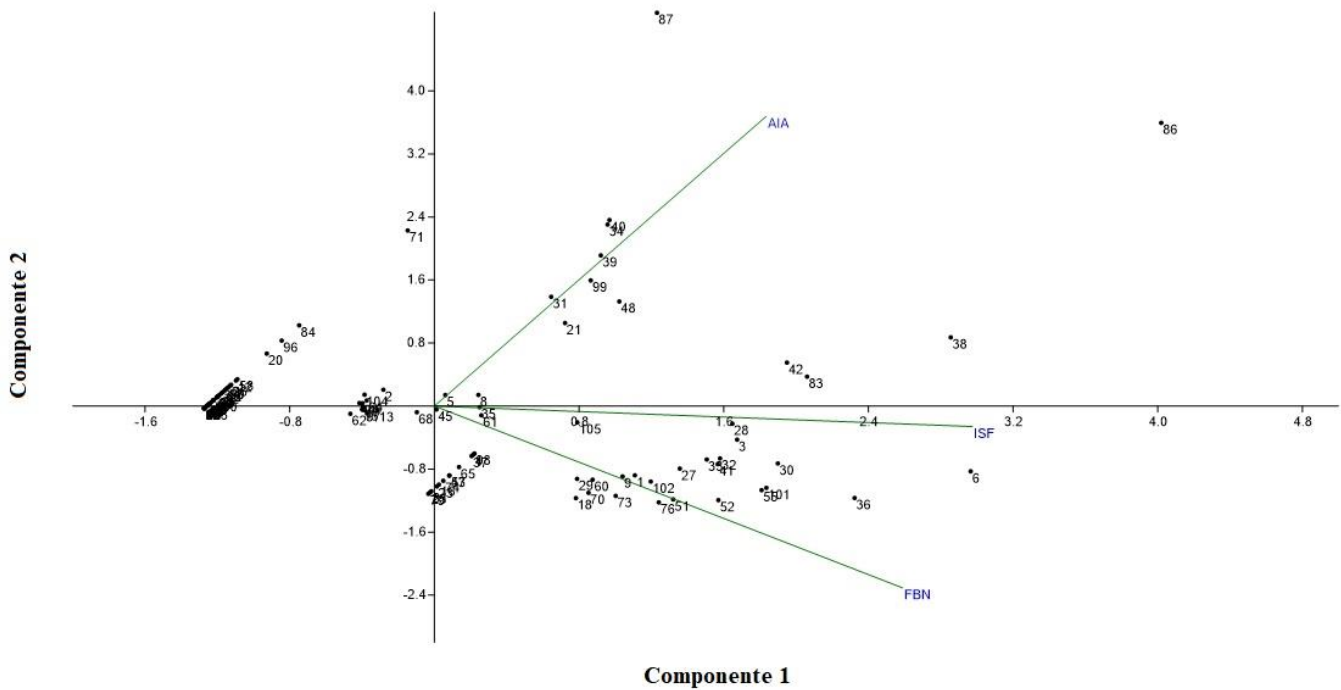


Figura 2. Gráfico de dispersão dos componentes principais 1 e 2 considerando os descritores: produção de ácido-indol-3-acético (AIA), índice de solubilização de fosfato (ISF), e fixação biológica de nitrogênio (FBN). Todos os 105 isolados submetidos aos testes de promoção de crescimento vegetal *in vitro* estão distribuídos no gráfico. Fonte: programa estatístico Past, versão 2.17c.

A bactéria 87, pertencente ao gênero *Agrobacterium*, destacou-se por produzir a maior quantidade de AIA, $230.76 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, entretanto, não apresentou capacidade de solubilizar fosfato e fixar nitrogênio. A bactéria 86, do gênero *Enterobacter*, exibiu o segundo maior valor para produção de AIA, $223.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, e foi capaz de fixar nitrogênio e apresentou capacidade média de solubilizar fosfato. Similarmente, em estudo realizado com isolados bacterianos de *Paspalum* spp., foi encontrado que endofíticos do gênero *Enterobacter* exibiram de 105.05 a $263.74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AIA (DE PAULA, 2019). Diferentemente, Verma et al. (2017) relataram que o endofítico de arroz *Enterobacter asburiae* produziu $70.81 \pm 0.98 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de AIA (VERMA et al., 2017). A bactéria 38, do gênero *Pantoea*, apresentou altos valores para solubilização de fosfato (ISF = 3.13) e produção de AIA ($99.17 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), e também fixou nitrogênio. As três bactérias mencionadas são endofíticas de *P. rojasii*, sendo a *Agrobacterium* sp. isolada da raiz, e *Enterobacter* sp. e *Pantoea* sp. isoladas da folha.

Os isolados bacterianos que apresentaram valores mais altos para solubilização de fosfato e fixaram nitrogênio, distribuíram-se ao lado direito inferior do gráfico. A bactéria 6, isolada da rizosfera de *P. compressifolium* e pertencente ao gênero *Pseudomonas*, destacou-se por exibir o maior índice de solubilização de fosfato, 4.71, além disso, apresentou valores positivos para produção de AIA e FBN. A bactéria 36, do gênero *Enterobacter* e isolada da folha de *P. rojasii*, exibiu o segundo maior ISF (3.93), fixou nitrogênio e produziu AIA. Amaral et al. (2021) relataram que os isolados bacterianos de outras espécies de *Paspalum* pertencentes ao mesmo Banco Ativo de Germoplasma (BAG) apresentaram valores mais baixos para solubilização de fosfato inorgânico, sendo o maior valor de ISF = 2.36, proveniente de um isolado bacteriano de raiz. Outros estudos com bactérias rizosféricas de plantas da família *Poaceae* encontraram máximo ISF = 3.5, em isolados de gramíneas (HAIYAMBO et al., 2015), e ISF = 3.5, em isolados de milho (MANZOOR et al., 2017). Esses dados indicam que foram encontrados altos valores de ISF no presente trabalho.

Dentre os gêneros bacterianos encontrados na rizosfera da planta, o gênero *Pseudomonas* está constantemente associado à rizosfera e raiz de diversas espécies vegetais (LI et al., 2017; NIU et al., 2017; SCHREITER et al., 2018; MOLINA et al., 2020). No presente trabalho, a maior parte das *Pseudomonas* spp. foi isolada da raiz e rizosfera de plantas de *Paspalum*. Considerando a essencialidade de P na nutrição das plantas, a capacidade de *Pseudomonas* spp. em solubilizar fosfato insolúvel tem ganhado enfoque (SELVAKUMAR et al., 2013). Deste modo, várias espécies solubilizadoras de fosfato dentro deste gênero foram relatadas na literatura, por exemplo, *P. stutzeri* (HAIYAMBO et al., 2015), *P. putida* (PASTOR et al., 2014), *P. lutea* (KWAK et al., 2016), *P. frederiksbergensis* (ZENG et al., 2016), *P. fluorescens* (YADAV et al., 2016), e *P. aeruginosa* (PAUL; SINHA, 2017).

Em relação à fixação biológica de nitrogênio, no presente estudo, todos os isolados do gênero *Pseudomonas*, exceto o isolado 48, fixaram nitrogênio. Esses resultados eram esperados, pois, como mencionado anteriormente, bactérias desse gênero colonizam as raízes das plantas, local com baixo nível de oxigênio, onde ocorre a fixação biológica de N por bactérias diazotróficas (ARAÚJO et al., 2014). Patel e Archana (2017) utilizaram o mesmo método *in vitro* para selecionar bactérias fixadoras de nitrogênio (meio NFb), e

confirmaram a eficiência do método pela detecção do gene *nifH* em cada isolado, gene marcador utilizado para identificar bactérias que possuem a capacidade de fixar N. Os mesmos autores detectaram *Pseudomonas* spp. na comunidade diazotrófica de três espécies de planta da família *Poaceae* (PATEL; ARCHANA, 2017). Dentro do gênero *Pseudomonas*, a espécie fixadora de N mais comum é a *P. stutzeri* (VENIERAKI et al., 2014). Bactérias rizosféricas e diazotróficas dessa espécie foram encontradas em gramíneas, como trigo (VENIERAKI et al., 2011), sorgo (YU et al., 2011), arroz (PHAM et al., 2017), e milho (KE et al., 2019).

Os membros da família Enterobacteriaceae também são conhecidos fixadores de N. Na rizosfera de gramíneas, 82% das bactérias diazotróficas pertencem à essa família (SARATHAMBAL et al., 2015). No presente trabalho, dentro da família Enterobacteriaceae, foram encontradas bactérias fixadoras de N dos gêneros *Enterobacter*, *Pantoea* e *Serratia*.

4.1.4 Atividade antagonista

Os isolados 3 (*Alcaligenes* sp.), 41 (*Pseudomonas* sp.), 51 (*Serratia* sp.) e 86 (*Enterobacter* sp.), os quais apresentaram resultados positivos para todos os parâmetros de promoção de crescimento testados *in vitro*, foram avaliados quanto às suas atividades antagonistas contra os fungos *Claviceps purpurea* e *Fusarium oxysporum*, por serem importantes fitopatógenos de diversas culturas de interesse agrônomo.

Em geral, os membros do gênero *Claviceps*, incluindo *C. purpurea*, afetam cereais e gramíneas, causando a doença do Ergot, que resulta na substituição dos grãos por escleródios, estruturas de resistência do fungo. Os alcaloides contidos nessas estruturas podem causar intoxicação severa em mamíferos (TUDZYNSKI; SCHEFFER, 2004). Em gramíneas do gênero *Paspalum*, Ergot é causada, principalmente, por *Claviceps paspali*, tornando-se um sério problema na produção de forragem, devido aos potentes danos cerebrais provocados em bovinos (SCHARDL et al., 2013; OBERTI et al., 2020). *C. paspali* e *C. purpurea* fazem parte do mesmo clado dentro do gênero *Claviceps*, sendo, portanto, espécies filogeneticamente próximas (PAŽOUTOVÁ, 2001; 2008). Os processos de infecção dessas duas espécies em gramíneas são similares, ocorrendo principalmente através do estigma (LUTTRELL, 1977). O fungo *Fusarium oxysporum* infecta culturas de

interesse econômico mundialmente, atacando inicialmente as raízes, causando murchamento e posterior morte da planta (GORDON, 2017).

Os resultados encontrados no presente trabalho mostram que todas as bactérias testadas apresentaram alguma atividade antagonista contra *C. purpurea* (Figura 3). *Enterobacter* sp./isolado 86 (Figura 3B) foi o isolado que melhor inibiu o desenvolvimento de *C. purpurea*, seguido por *Serratia* sp./isolado 51, que formou um halo de inibição (Figura 3A). O fitopatógeno *C. purpurea* apresentou maior redução no crescimento micelial na presença de *Enterobacter* sp., e em menor grau, na presença de *Alcaligenes* sp./isolado 3 (Figura 3D). Espécies do gênero *Serratia*, são descritas por apresentarem atividade antifúngica contra vários fitopatógenos, devido à atuação do pigmento prodigiosina em sinergia com outros compostos (JIMTHA et al., 2017). O presente trabalho mostra a ausência de contato entre *Serratia* sp. e *C. purpurea* na placa (Figura 3A), sugerindo atividade antagonista.

A inibição do crescimento de *C. purpurea* no presente trabalho pode ser atribuída à competição por nutrientes, espaço, produção de substâncias tóxicas pelos antagonistas, ou por parasitismo, como pode ser o caso dos isolados 86 (*Enterobacter* sp.) e 3 (*Alcaligenes* sp.), que colonizaram os fungos nas placas (Figura 3B, 3D, respectivamente). O controle de Ergot é dificultoso devido à alta quantidade de escleródios que permanecem no solo por longos períodos (DUNG et al., 2016). O uso de bactérias como agentes de biocontrole são uma opção eficiente e sustentável, pois podem diminuir a abundância dos escleródios no solo, reduzindo a infecção do fungo na planta ao mesmo tempo em que promovem o seu crescimento (KAUR et al., 2016).

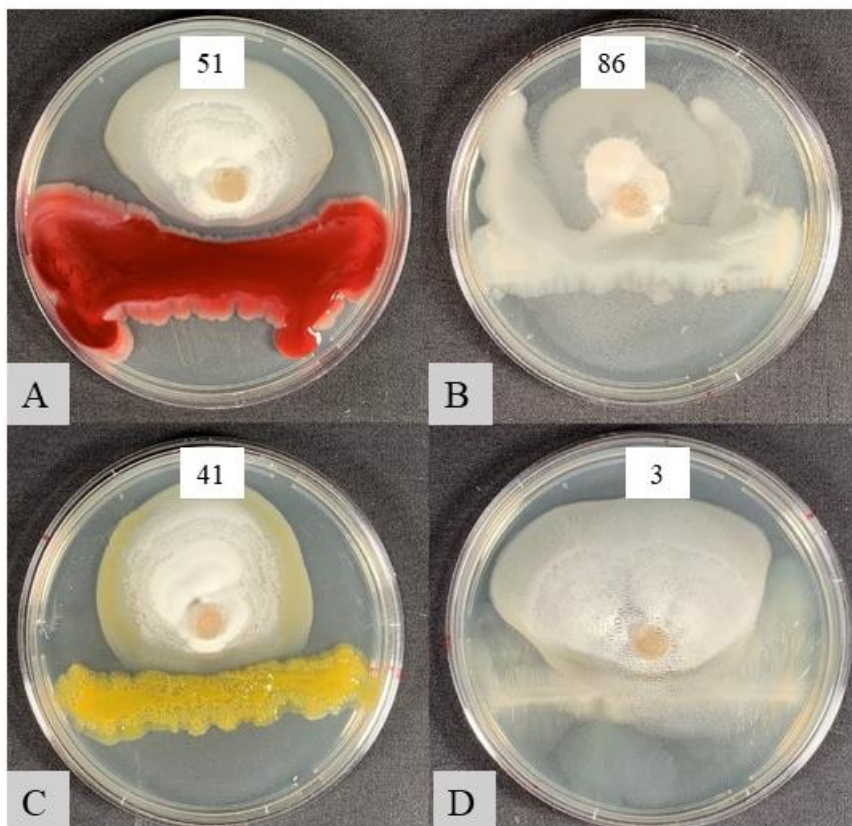


Figura 3. Teste de antagonismo contra o fungo *Claviceps purpurea*. A) *Serratia* sp./Isolado 51 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, B) *Enterobacter* sp./Isolado 86 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, C) *Pseudomonas* sp./Isolado 41 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, D) *Alcaligenes* sp./Isolado 3 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa.

Nenhum dos isolados apresentou atividade antagonista contra *F. oxysporum* (Figura 4). Observou-se crescimento do fungo sobre todos os isolados testados, em menor grau na presença de *Serratia* sp. (Figura 4A). *F. oxysporum* exibiu o maior crescimento micelial na presença do isolado *Enterobacter* sp. (Figura 4B). Esses resultados sugerem que *F. oxysporum* inibe o crescimento bacteriano de todos os isolados testados.

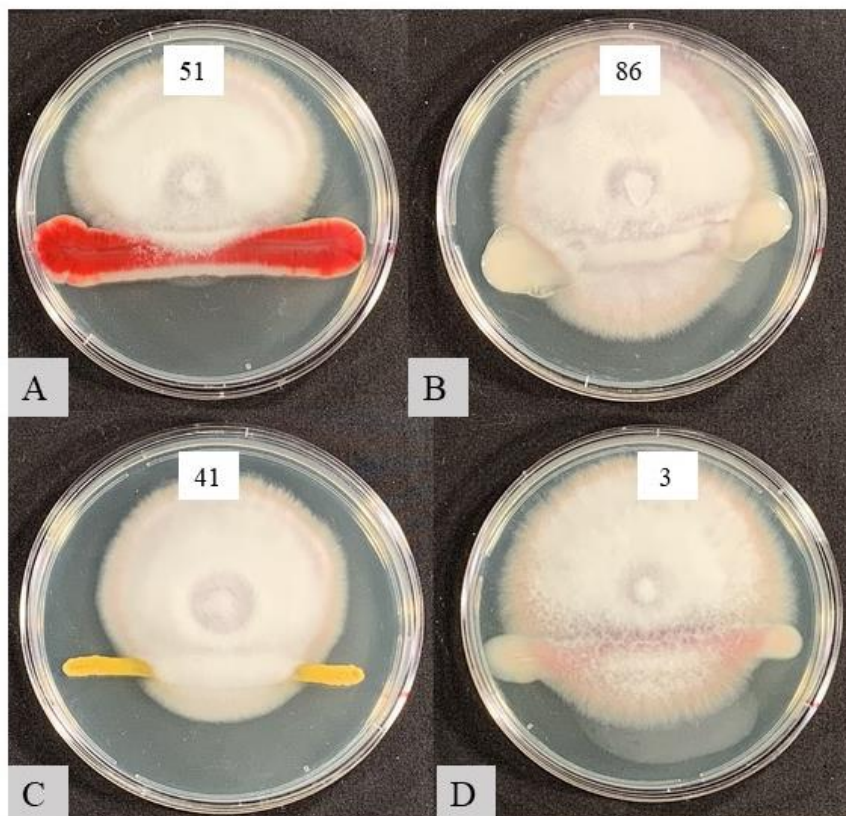


Figura 4. Teste de antagonismo contra o fungo *Fusarium oxysporum*. A) *Serratia* sp./Isolado 51 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, B) *Enterobacter* sp./Isolado 86 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, C) *Pseudomonas* sp./Isolado 41 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa, D) *Alcaligenes* sp./Isolado 3 ao lado inferior e fungo ao lado superior da placa.

Embora as espécies de fungo testadas não sejam descritas como patogênicas em *Paspalum* spp., testes antagonísticos contra importantes fungos fitopatogênicos de outras culturas são de extrema importância, pois os isolados bacterianos antagonistas podem ser testados e possivelmente utilizados para controle biológico em outras espécies vegetais de interesse econômico. Além disso, as bactérias endofíticas de *Paspalum* spp. antagonistas podem inibir o crescimento e a propagação de um fitopatógeno que infecta culturas localizadas ao seu redor.

4.2 Promoção de crescimento vegetal *in vivo* por bactérias endofíticas e rizosféricas de *Paspalum* spp.

4.2.1 Experimento com *P. notatum* em substrato

Para o teste de promoção de crescimento vegetal *in vivo*, foram selecionados os isolados bacterianos que apresentaram resultados positivos nos testes *in vitro* para solubilização de fosfato inorgânico, fixação biológica de nitrogênio e produção de AIA. Além disso, priorizou-se a escolha de diferentes gêneros bacterianos entre si, abordagem de isolados das três espécies de *Paspalum* e produção variada de AIA. Tratamentos incluindo o fungo fitopatogênico *Fusarium oxysporum* também foram inoculados para observação da interação do fungo com as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs) e *P. notatum*.

Considerando os tratamentos compostos apenas por bactérias (Figura 5), todos os isolados aumentaram a germinação das sementes e peso seco de raiz (PSR) de *P. notatum* em relação ao controle (Tabela 8), sendo que o tratamento com *Serratia* sp. apresentou o maior valor para esses dois parâmetros. Os maiores valores para comprimento de raiz (CR) foram observados nos tratamentos com *Enterobacter* sp e *Serratia* sp. Nos parâmetros relacionados à folha, os tratamentos com *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., e *Enterobacter* sp. aumentaram o comprimento de folha (CF) e o tratamento com *Alcaligenes* sp. exibiu o menor valor de CF, e apenas o tratamento com *Pseudomonas* sp. aumentou ligeiramente o peso seco de folha (PSF). *Serratia* sp. foi a bactéria que promoveu o maior crescimento vegetal de plântulas de *P. notatum*, seguido por *Enterobacter* sp., quando considerados os tratamentos compostos por bactérias e controle.

A bactéria *Serratia* sp., obtida da rizosfera de *P. lenticulare* apresentou médio ISF (2.29) e fixou nitrogênio, entretanto, exibiu o menor valor para produção de AIA (2.68 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) dentre os isolados testados em plântulas de *P. notatum*. Em contrapartida, *Enterobacter* sp., extraída da folha de *P. rojasii*, apresentou o maior valor de AIA (223.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) dentre os isolados testados em plântulas, e o segundo maior valor para esse parâmetro dentre os 105 isolados bacterianos. Apesar de exibirem valores de AIA tão discrepantes, os tratamentos compostos por esses isolados foram estatisticamente iguais para comprimento de raiz, e *Enterobacter* sp. apresentou menores valores para os outros

parâmetros em relação à *Serratia* sp. Auxinas, como AIA, são os maiores aceleradores de crescimento de brotos, junto com as giberelinas (TANIMOTO, 2005). Além disso, induzem a formação de raízes adventícias em gramíneas, incluindo o colo da raiz, as quais são estruturas extremamente importantes para a arquitetura das raízes de plantas desse gênero (HOCHHOLDINGER; ZIMMERMANN, 2008; McSTEEN, 2010). Contudo, a concentração endógena de AIA da planta desempenha um papel crítico para o crescimento da raiz e depende de vários parâmetros (TANIMOTO, 2005). Portanto, a promoção de crescimento pela bactéria produtora de AIA vai depender do nível interno desse fitormônio na planta (DUCA et al., 2014), podendo explicar parcialmente o comportamento similar de *Serratia* sp. e *Enterobacter* sp. nas plântulas de *P. notatum* do presente trabalho.

Ao colonizar a planta, a BPCV pode apresentar comportamento diferente daquele observado nos testes *in vitro* para parâmetros de crescimento vegetal, devido a diversos fatores, como aspectos relacionados ao sistema de defesa da planta (TEIXEIRA et al., 2019), ou ainda, pode haver uma interação espécie-específica da bactéria com a planta em que foi isolada, podendo ser o caso da bactéria *Alcaligenes* sp., a qual não promoveu crescimento nas plântulas de *P. notatum*. Amaral et al. (2021) investigaram o efeito de BPCVs isoladas de diferentes espécies de *Paspalum*, e concluíram que a resposta da planta à inoculação bacteriana não possui relação com os genótipos hospedeiros de *Paspalum*. Similarmente aos resultados encontrados no presente trabalho, esses mesmos autores observaram que *Pseudomonas* sp. isolada das plantas de *Paspalum* apenas aumentou o peso seco de raiz, mas não promoveu aumento nos outros parâmetros de crescimento em *P. malacophyllum*. Diferentemente, em estudo feito com *Panicum virgatum*, gramínea de estação quente, Gagne-Bourgue et al. (2013) encontraram que *Pseudomonas fluorescens* solubilizadora de fosfato e produtora de AIA foi capaz de promover o seu crescimento. Algumas espécies de *Pseudomonas* solubilizadoras de fosfato também promoveram o crescimento das gramíneas *Cynodon dactylon*, *Poa annua* e arroz (VERMA et al., 2018). Corroborando com os resultados encontrados no presente estudo, Kotoky et al. (2019) relataram que *Serratia marcescens* com capacidade de solubilizar fosfato, produzir AIA e sideróforos, induziu alto crescimento na raiz em plantas de arroz. Em outro estudo, a inoculação de *Enterobacter* sp. cepa 15S melhorou o sistema radicular em plantas de milho sob deficiência de fósforo (P) e aumentou a concentração apenas nas P nas raízes

(ZULUAGA et al., 2021). O tratamento com *Enterobacter* sp., no presente estudo, apresentou o maior comprimento de raiz e o maior valor para solubilização de fosfato (ISF = 2.83) dentre os isolados utilizados no experimento *in vivo*. O crescimento das raízes dessas plântulas pode ter sido estimulado pelo aumento da disponibilidade de P ocasionado pelas bactérias.

Tabela 8. Efeitos dos isolados bacterianos de *Paspalum* spp. e *Fusarium oxysporum* na germinação, comprimento de raiz (CR), comprimento de folha (CF), peso seco de raiz (PSR) e peso seco de folha (PSF) de plântulas de *Paspalum notatum*. Todas os isolados foram inoculados na presença e ausência de *F. oxysporum*.

Gênero bacteriano/Isolado	<i>F. oxysporum</i>	Germinação (%)	CR (cm)	CF (cm)	PSR (mg)*	PSF (mg)*
Controle	-	70.0	0.68 ± 0.25b	5.78 ± 1.18bcd	0.08	0.71
<i>Alcaligenes</i> sp./3	-	73.3	0.90 ± 0.34b	5.00 ± 0.60d	0.20	0.59
<i>Pseudomonas</i> sp./41	-	80.0	1.02 ± 0.58b	6.13 ± 1.26abc	0.13	0.72
<i>Serratia</i> sp./51	-	90.0	2.73 ± 0.52a	6.59 ± 0.74ab	0.26	0.70
<i>Enterobacter</i> sp./86	-	86.7	2.83 ± 0.42a	6.18 ± 0.79abc	0.19	0.69
-	+	93.3	2.57 ± 0.58a	6.24 ± 1.12abc	0.16	0.68
<i>Alcaligenes</i> sp./3	+	86.7	2.75 ± 0.77a	6.26 ± 0.91abc	0.20	0.79
<i>Pseudomonas</i> sp./41	+	63.3	2.77 ± 0.56a	5.63 ± 0.96cd	0.20	0.69
<i>Serratia</i> sp./51	+	70.0	2.91 ± 0.55a	6.13 ± 0.96abc	0.23	0.71
<i>Enterobacter</i> sp./86	+	80.0	2.82 ± 0.54a	6.80 ± 0.87a	0.19	0.83

*Média do peso total dividido pelo número de plântulas

Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0.05$). O erro padrão é apresentado ao lado das médias para comprimento de raiz e comprimento de folha.

("+" = presença de *F. oxysporum*, "-" = ausência de *F. oxysporum*).

Considerando todos os tratamentos, aqueles que incluíram *F. oxysporum* aumentaram comprimento e peso seco de raiz, e em menor escala, comprimento de folha em relação ao controle, exceto o tratamento com *Pseudomonas* sp. e *F. oxysporum*. Esse mesmo tratamento diminuiu germinação, comprimento e peso de folha. O tratamento com *Enterobacter* sp. e *F. oxysporum* apresentou o maior comprimento e peso seco de folha dentre todos os tratamentos.

Quando comparados os tratamentos compostos apenas por bactérias e bactéria + *F. oxysporum*, diferentes respostas são observadas de acordo com o gênero bacteriano. A bactéria *Alcaligenes* sp. inoculada com o fungo, aumentou G, CR, e PSF, mas não houve diferença em PSR, comprovado visualmente pelas raízes mais finas e fracas. Da mesma

forma, a adição de *F. oxysporum* à bactéria *Enterobacter* sp., aumentou CF e PSF. Por outro lado, o tratamento com *Serratia* sp. e *F. oxysporum*, diminuiu G, CF e PSR em relação ao tratamento somente com *Serratia* sp. O tratamento composto apenas por *F. oxysporum* aumentou todos os parâmetros em relação ao controle, exceto PSF.

Apesar de *Fusarium* ter aumentado ou mantido os parâmetros de crescimento vegetal na maioria dos tratamentos, as plântulas que foram inoculadas com todos os tratamentos contendo *F. oxysporum*, exibiram raízes e folhas extremamente finas e fracas (Figura 6), e pouco solo aderido às raízes. De acordo com o teste de antagonismo *in vitro*, os isolados bacterianos não apresentaram atividade inibitória ao *F. oxysporum*. Bitas et al. (2015) mostraram que cepas de *F. oxysporum* geneticamente e ecologicamente diferentes promoveram o crescimento de *Arabidopsis thaliana* e tabaco por meio da produção de compostos voláteis que afetam o transporte e sinalização de auxinas na planta. Os compostos voláteis produzidos pelo fungo aumentaram comprimento e biomassa de raiz, e duplicaram a densidade de raízes laterais (BITAS et al., 2015). No entanto, uma das cepas utilizada no estudo havia sido anteriormente caracterizada como patogênica de *A. thaliana* (OSPINA-GIRALDO et al., 2003; CZYMMEK et al., 2007). A formação de raízes laterais e aumento da superfície radicular induzidos pela produção de compostos voláteis, facilitam o potencial de colonização tanto de cepas simbióticas como a infecção por cepas patogênicas na planta, uma vez que aumentam os pontos de entrada para o sistema vascular vegetal (BITAS et al., 2015).

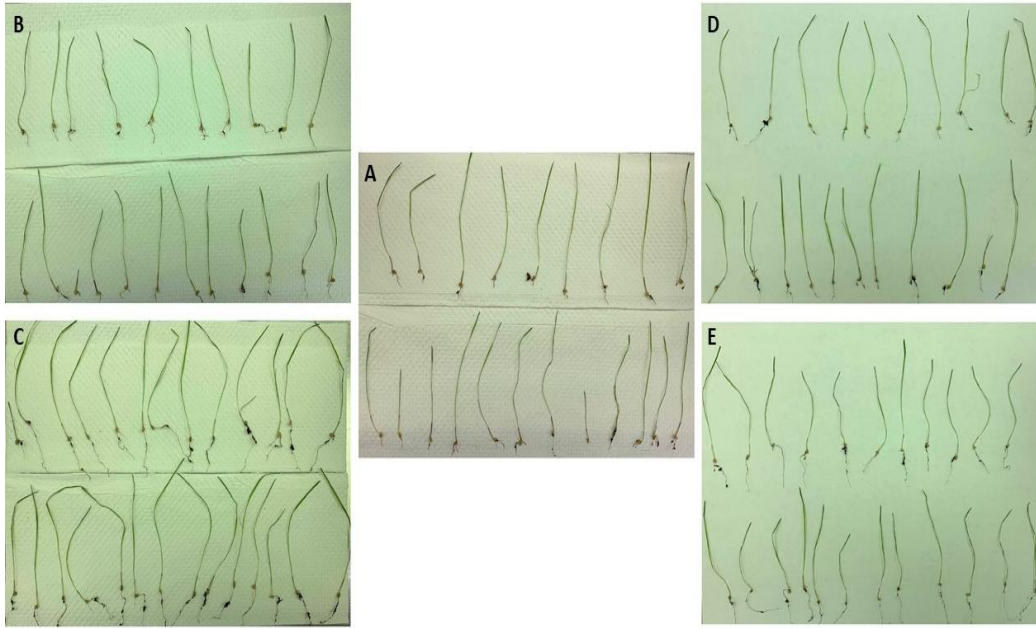


Figura 5. Plântulas de *P. notatum* submetidas a tratamentos somente com bactérias. A) Controle; B) *Alcaligenes* sp./isolado 3; C) *Serratia* sp./isolado 51; D) *Pseudomonas* sp./isolado 41; E) *Enterobacter* sp./isolado 86.

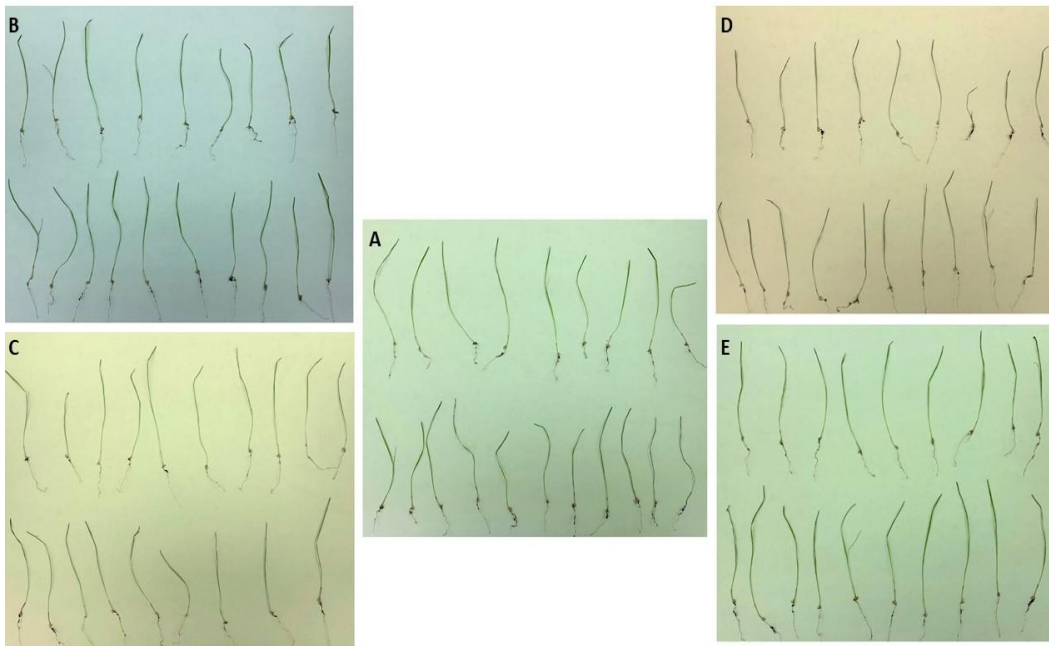


Figura 6. Plântulas de *P. notatum* submetidas a tratamentos com bactérias e *F. oxysporum*. A) *F. oxysporum*; B) *Alcaligenes* sp./isolado 3 + *F. oxysporum*; C) *Serratia* sp./isolado 51 + *F. oxysporum*; D) *Pseudomonas* sp./isolado 41 + *F. oxysporum*; E) *Enterobacter* sp./isolado 86 + *F. oxysporum*.

O crescimento das plântulas de *P. notatum* inoculadas com *F. oxysporum* no presente trabalho pode ter sido estimulado pelos compostos voláteis produzidos pelo fungo, entretanto, são necessários experimentos de maior duração em casa de vegetação para avaliação de plantas adultas a fim de confirmar se a cepa de *F. oxysporum* inoculada é benéfica ou patogênica em *P. notatum*. Devido à fragilidade observada nas plântulas tratadas com *F. oxysporum*, é provável que elas não se desenvolveriam de forma saudável ou até mesmo não sobreviveriam a longo prazo. Em geral, quando patogênico, os membros dessa espécie de fungo invadem a planta através das raízes e conseqüentemente bloqueiam a passagem de água e minerais através do xilema (CZYMMEK et al., 2007; MICHELSE; REP, 2009; RISPAIL; DI PIETRO, 2009).

Sementes de alta qualidade são fator crítico para o sucesso no estabelecimento de pastagens (GASPARETTO et al., 2021). A presença de microrganismos patogênicos nas sementes pode prejudicar a germinação, o desenvolvimento e qualidade de gramíneas (DA SILVA et al., 2020). Ainda, o patógeno presente na semente pode se disseminar para outras regiões através do solo e contaminar outras áreas e culturas (LAZAROTTO et al., 2012). O gênero *Fusarium* foi encontrado em sementes de *P. notatum* (ROSSI DE AGUIAR et al., 2013) e *P. guenoarum* (GASPARETTO et al., 2021), demonstrando que esse fungo pode estar associado à redução do poder germinativo dessas sementes. No presente estudo, apenas as sementes tratadas com *Pseudomonas* sp. e *F. oxysporum* simultaneamente apresentaram germinação reduzida em relação ao controle.

4.2.2 Experimento com *Poa annua* em agarose

As BPCVs de *Paspalum* spp. induziram diferentes respostas em plântulas de *Poa annua*. A inoculação das bactérias do gênero *Pseudomonas* (isolados 27 e 41) promoveram os maiores crescimentos nas plântulas e provocaram diferentes padrões nos pelos radiculares (Tabela 9). Em contrapartida, as plântulas inoculadas com bactérias do gênero *Enterobacter* (isolados 33, 83 e 86) apresentaram redução das raízes, embora tenham exibido pelos radiculares longos e abundantes. Todos os isolados, exceto o isolado 33, aumentaram significativamente o comprimento de folha.

Poa annua é uma gramínea com adaptabilidade a diversas condições climáticas, habitando desde regiões polares até desertos (VARGAS; TURGEON, 2003). Devido ao seu

alto valor nutritivo, é considerada uma espécie economicamente importante para pastagem de ovelhas e gados (MASSEY et al., 2007). No presente estudo, essa espécie foi utilizada como outro modelo de gramínea para triagem do potencial de crescimento vegetal dos isolados bacterianos de *Paspalum* spp. Observou-se que o isolado 41 (*Pseudomonas* sp.) não promoveu crescimento significativo em *P. notatum*, embora tenha sido um dos isolados que promoveu o maior crescimento de plântulas de *P. annua* (Figura 7). Por outro lado, o isolado 86 (*Enterobacter* sp.) diminuiu o crescimento da raiz de *Poa annua*, mas aumentou comprimento de raiz de *P. notatum*. Apesar de serem experimentos em condições distintas, pode-se inferir que esses isolados apresentam comportamentos diferentes nas duas espécies de gramínea. Corroborando com os resultados encontrados no presente trabalho, White et al. (2018) constataram que diferentes isolados do gênero *Pseudomonas* promoveram aumento significativo de raiz e folha de *P. annua*.

Os resultados obtidos da inoculação de isolados de *Paspalum* spp. em *P. annua* mostraram que bactérias do mesmo gênero apresentaram comportamento similar em relação ao crescimento de plântulas de *P. annua*, e revelaram que mesmo que tais bactérias não promovam o crescimento de *P. notatum*, essas podem ser inoculantes promissores para outras gramíneas ou até mesmo outras culturas de interesse agrícola.

Tabela 9. Efeitos dos isolados bacterianos de *Paspalum* spp. nos pelos radiculares, comprimento de raiz (CR) e comprimento de folha (CF) em plântulas de *Poa annua*.

Tratamentos	Isolado	Pelos radiculares	CR (cm)	CF (cm)
Controle	-	Poucos/curtos	1.20 ± 0.30b	1.47 ± 0.60b
<i>Pseudomonas</i> sp.	27	Muitos/longos e irregulares	1.88 ± 0.35a	2.21 ± 0.47a
<i>Enterobacter</i> sp.	33	Muitos/longos	0.70 ± 0.18c	1.85 ± 0.42ab
<i>Pseudomonas</i> sp.	41	Poucos/longos	1.99 ± 0.28a	2.08 ± 0.36a
<i>Enterobacter</i> sp.	83	Muitos/longos	0.59 ± 0.15c	2.34 ± 0.29a
<i>Enterobacter</i> sp.	86	Muitos/longos e ondulados	0.44 ± 0.13c	2.12 ± 0.41a

Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes entre as médias de acordo com o teste de Tukey ($P \leq 0.05$). O erro padrão é apresentado ao lado das médias de comprimento de raiz e comprimento de folha.

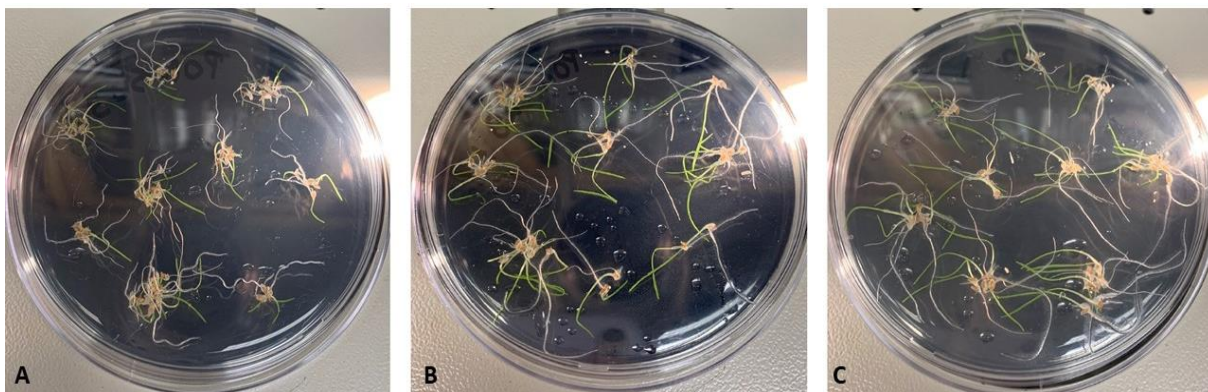


Figura 7. Plântulas de *Poa annua* inoculadas com isolados bacterianos de *Paspalum* spp. em agarose 0.7%. A) Plântula controle, B) Plântula inoculada com isolado 27 (*Pseudomonas* sp.), C) Plântula inoculada com isolado 41 (*Pseudomonas* sp.).

4.2.3 Visualização microscópica de raízes de *Paspalum notatum* e *Poa annua*

A desinfecção superficial das sementes de *P. notatum* para remoção de microrganismos reduziu a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), como mostra a raiz de plântula controle que exibe coloração mais clara que as demais (Figura 8A). As plântulas de *P. notatum* inoculadas com os isolados bacterianos apresentaram maior produção de ERO, representada pela coloração mais escura das raízes (Figuras 8B, 8C e 8D). Irizarry e White (2018) relataram que plântulas de algodão inoculadas com *Bacillus amyloliquefaciens* também apresentaram maior acúmulo de ERO nas raízes do que as plântulas não inoculadas. Nas plântulas controle, houve ausência ou redução do número e tamanho dos pelos radiculares, enquanto todas as plântulas inoculadas com bactérias exibiram pelos radiculares longos e abundantes. As mesmas características foram observadas em outros experimentos com gramíneas, onde as sementes que tiveram a maior parte dos seus endofíticos removidos, desenvolveram plântulas menores com pelos radiculares reduzidos ou ausentes, e a reinoculação dos endofíticos nas sementes promoveu o crescimento das plântulas e formação de pelos radiculares (VERMA et al., 2017; 2018).

Foi possível observar a colonização intracelular das bactérias em todas as plântulas inoculadas de *P. notatum* e *Poa annua*. Nas Figuras 8C e 8D é possível visualizar as bactérias saindo pelas extremidades dos pelos radiculares.

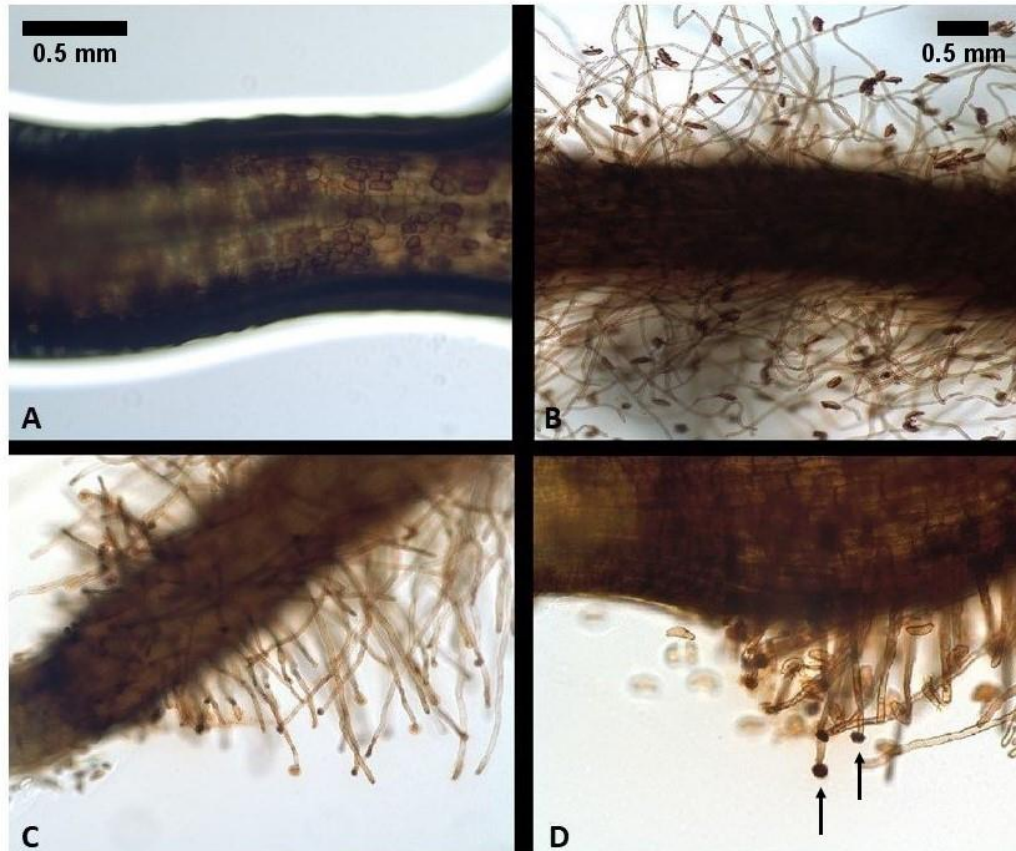


Figura 8. Coloração das raízes de *P. notatum* com DAB. A) Raiz de plântula controle, B) Raiz e pelos radiculares de plântula inoculada com o isolado 86 (*Enterobacter* sp.), C) Raiz e pelos radiculares de plântula inoculada com o isolado 41 (*Pseudomonas* sp.) (referência de escala em Figura B), D) Bactérias saindo pelas extremidades dos pelos radiculares (setas) de plântula inoculada com o isolado 86 (*Enterobacter* sp.) (referência de escala em Figura A).

As raízes das plântulas do grupo controle de *Poa annua* apresentaram alta produção de ERO, possível de ser detectada pela coloração mais escura da raiz (Figura 9A), embora tenham exibido poucos ou nenhum pelo radicular. As plântulas inoculadas com os isolados bacterianos também apresentaram alta produção de ERO, porém produziram muitos e longos pelos radiculares (Figura 9C e 9D), exceto aquelas inoculadas com a bactéria 41 (*Pseudomonas* sp.), que desenvolveram pelos irregulares (longos e curtos) e escassos (Figura 9B).

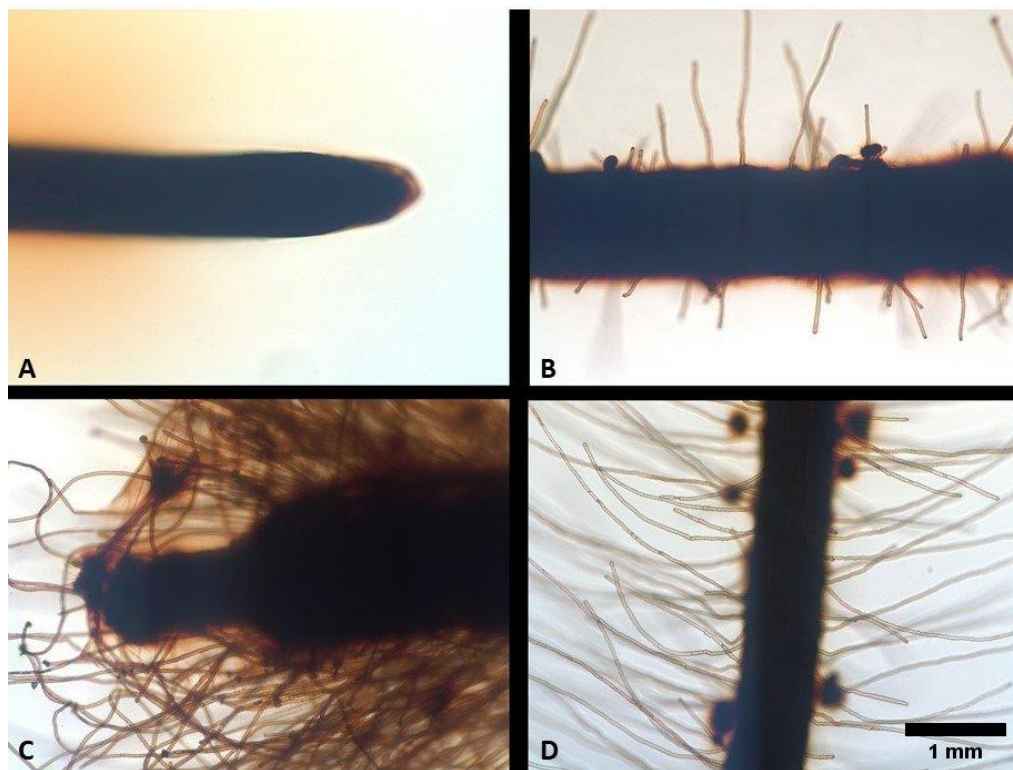


Figura 9. Coloração das raízes de *Poa annua* com DAB. A) Raiz de plântula controle, B) Raiz e pelos radiculares de plântula inoculada com isolado o 41 (*Pseudomonas* sp.), C) Raiz e pelos radiculares de plântula inoculada com o isolado 86 (*Enterobacter* sp.), D) Raiz e pelos radiculares de plântula inoculada com o isolado 27 (*Pseudomonas* sp.).

Quando submetidas a condições de estresse, as células vegetais aumentam a produção de ERO, como superóxido, radicais hidroperoxila, peróxido de hidrogênio, e radicais hidroxila. Da mesma forma, o sistema de defesa da planta é ativado nos estágios iniciais da colonização endofítica, produzindo ERO (LATA et al., 2018). Como a técnica de coloração DAB torna visível a produção de oxigênio reativo (H_2O_2) produzido ao redor da bactéria localizada no interior das raízes (WHITE et al., 2014), raízes de coloração mais escura representam maior produção de ERO.

De acordo com White et al. (2018), a exposição das bactérias ao oxigênio reativo provoca o vazamento de eletrólitos dos protoplastos bacterianos, dessa forma, os componentes bacterianos oxidados podem ser absorvidos através da membrana plasmática pelas células da raiz vegetal. Esse processo acontece durante o ciclo rizofágico, no qual as bactérias captam nutrientes presentes no solo, se tornam endofíticas através das extremidades da raiz da planta, que extrai esses nutrientes das células bacterianas por meio da produção de ERO. Após esgotadas de nutrientes, as bactérias sobreviventes são ejetadas

através dos pelos radiculares, retornando para o solo começando o ciclo novamente (WHITE et al., 2018b). Na Figura 10 é possível observar as bactérias saindo através da extremidade do pelo radicular de *Poa annua*, o qual apresenta rompimento da parede celular.

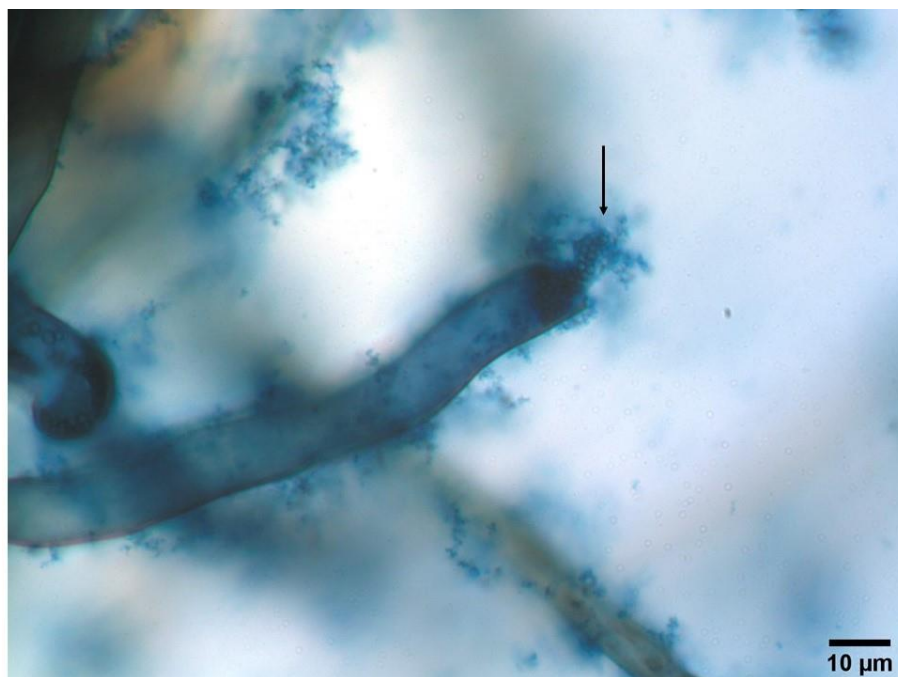


Figura 10. Bactérias saindo através da extremidade do pelo radicular de *Poa annua* (seta).

Os pelos radiculares possuem a função de aumentar a superfície de contato das raízes para melhor captação de nutrientes do solo, como fósforo e potássio (JUNGK, 2001). O alongamento dos pelos radiculares nas plântulas inoculadas é, provavelmente, causado pela sinalização do óxido nítrico das bactérias sobreviventes que se acumulam nas extremidades dessas estruturas (WHITE et al., 2018b). No presente trabalho, as bactérias *Enterobacter* sp. diminuíram o comprimento de raiz, mas aumentaram significativamente o comprimento de folha das plântulas de *Poa annua*, possivelmente pelo aumento da captação de nutrientes gerado pela alta quantidade de pelos radiculares (Figura 10C). O aumento dos pelos radiculares em *P. annua* mostra que os isolados bacterianos de *P. notatum* do presente estudo também possuem potencial em promover o crescimento de *P. annua*.

5. CONCLUSÃO

Foi possível isolar as bactérias endofíticas e rizosféricas cultiváveis de *P. rojasii*, *P. lenticulare* e *P. compressifolium*. Foram encontrados 26 isolados bacterianos capazes de solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e produzir AIA simultaneamente.

As bactérias dos gêneros *Serratia* sp. e *Enterobacter* sp. foram capazes de diminuir o crescimento de *Claviceps purpurea in vitro*, porém nenhuma bactéria apresentou atividade antagônica a *Fusarium oxysporum*.

No experimento *in vivo* com plântulas de *P. notatum*, *Serratia* sp. promoveu o maior crescimento vegetal, seguido por *Enterobacter* sp. O crescimento das plântulas de *P. notatum* não foi inibido na presença de *F. oxysporum*, e promoveu o maior crescimento vegetal quando inoculado com *Enterobacter* sp. Entretanto, todas as plântulas inoculadas com *F. oxysporum* exibiram raízes e folhas finas e frágeis.

Os mesmos isolados bacterianos provocaram diferentes efeitos em *P. notatum* e *Poa annua*. Os dois isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foram os melhores tratamentos para promover o crescimento de plântulas de *Poa annua*.

As BPCVs promoveram desenvolvimento de pelos radiculares com diferentes características de acordo com o gênero bacteriano. Foi possível observar a colonização bacteriana intracelular nas raízes das plântulas e maior produção de ERO nas raízes inoculadas com bactérias.

O presente estudo identificou potenciais bactérias promotoras de crescimento vegetal para serem futuramente aplicadas como inoculantes em *Paspalum* spp. e *Poa annua* e reduzir o uso de agroquímicos, como *Serratia* sp. (isolado 51), *Enterobacter* sp. (isolado 86), *Pseudomonas* sp. (isolados 27 e 41). Entretanto, efeitos adversos que possam ser causados aos seres vivos pelas BPCVs devem ser investigados para uso seguro na agricultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS-AKBARI, GH.; MEHDI ARAB, S.; ALIKHANI, H. A; ALLAHDADI, I.; ARZANESH, M. H. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 3, n. 4, p. 523-529, 2007.

ABD EL-DAIM, I. A.; BEJAI, S.; MEIJER, J. Improved heat stress tolerance of wheat seedlings by bacterial seed treatment. **Plant and Soil**, v. 379, n. 1, p. 337-350, 2014.

AGUIAR, A. et al. Antagonismo a fungos associados às sementes de *Paspalum notatum* Flügge por *Trichoderma*. **Enciclopédia biosfera**, v. 9, n. 17, p. 197-204, 2013.

AGUIAR, A. R. **Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas em *Paspalum notatum* Flügge**. 2014. 95 p. Dissertação (mestrado) em Agrobiologia, UFSM, 2014.

ALI, B.; SABRI, A. N.; HASNAIN, S. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1379-1384, 2010.

AMARAL, M. B.; RIBEIRO, T. G.; ALVES, G. C.; et al. The occurrence of rhizobacteria from *Paspalum* genotypes and their effects on plant growth. **Scientia Agricola**, v. 79, n. 2, e20200240, 2022.

ARAÚJO, W. L., QUECINE, M. C., LACAVAL, P. T., AGUILAR-VILDOSO, C. I., MARCON, J., LIMA, A. O. S., ... & AZEVEDO, J. **Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização**. Santarém: UFOPA, PA, Brasil, 2014.

ATES, S.; KELES, G.; INAL, F.; GUNES, A.; DHEHIBI, B. Performance of indigenous and exotic x indigenous sheep breeds fed different diets in spring and the efficiency of feeding system in crop-livestock farming. **Journal of Agricultural Science**, v. 153, n. 3, p. 554-569, 2015.

AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, W. L. Diversity and applications of endophytic fungi isolated from tropical plants. In: GANGULI, B. N., DESMHMUKH, S. K. (Org.). **Fungi: multifaceted microbes**. Boca Raton: CRC Press, 2007, p.189-207.

AZEVEDO, J. L. MACCHERONI JR, W.; PEREIRA, J. O.; DE ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 15-16, 2000.

BAO, Z.; SASAKI, K.; OKUBO, T.; et al. Impact of *Azospirillum* sp. B510 inoculation on rice-associated bacterial communities in a paddy field. **Microbes and Environments**, v. 28, n. 4, p. 487-490, 2013.

BATISTA, B. D.; LACAVALA, P. T.; FERRARI, A.; 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, 2000.

BAUDOIN, E.; LERNER, A.; MIRZA, M. S.; et al. Effects of *Azospirillum brasilense* with genetically modified auxin biosynthesis gene ipdC upon the diversity of the indigenous microbiota of the wheat rhizosphere. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 3, p. 219e226 2010.

BEATY, E. R., BROWN, R. H., & MORRIS, J. B. Response of Pensacola Bahiagrass to intense clipping. **Proceedings 11th int. Grassld Congr.**, Surfers Paradise, 1970, p. 538-42. Disponível em: < <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19700701488>>.

BEHERA, B. C.; SINGDEVSACHAN, S. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove - A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 97-110, 2014.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; et al. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94-104, 2013.

BITAS, V.; MCCARTNEY, N.; LI, N.; et al. *Fusarium oxysporum* volatiles enhance plant growth via affecting auxin transport and signaling. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1248, 2015.

BJÖRNSSON, L.; PRADE, T.; LANTZ, M. **Grass for biogas-arable land as a carbon sink**. Report 2016:280, 2016, 126 p.

BLOOM, A. J. The increasing importance of distinguishing among plant nitrogen sources. **Current Opinion in Plant Biology**, p. 10-16, 2015.

BLOUNT, A. R., ACUÑA, C. A. **Bahiagrass**. In: Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: CRC press, 2009, p. 86-106.

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, n. 2, p. 535-538, 1991.

DE BRUIJN, F. J. Biological nitrogen fixation. In: **Principles of plant-microbe interactions**. Springer, Cham, 2015. p. 215-224.

CASTRO, R. A.; DOURADO, M. N.; ALMEIDA, J. R. DE; et al. Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 59-66, 2018.

CHANG, X.; KINGSLEY, K. L.; WHITE, J. F. Chemical interactions at the interface of plant root hair cells and intracellular bacteria. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1041, 2021.

CHANG, S. T. et al. Antifungal compounds in the ethyl acetate soluble fraction of the extractives of Taiwania (*Taiwania cryptomerioides* Hayata) heartwood. **Holzforschung**, v. 53, p. 487-490, 1999.

CHATTERJEE, P.; SAMADDAR, S.; ANANDHAM, R.; et al. Beneficial soil bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* Os261 augments salt tolerance and promotes red pepper plant growth. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 705, 2017.

CHRISTIANSEN, S.; RYAN, J.; SINGH, M.; et al. Potential legume alternatives to fallow and wheat monoculture for mediterranean environments. **Crop and Pasture Science**, v. 66, n. 2, p. 113-121, 2015.

COHEN, A. C.; BOTTINI, R.; PONTIN, M.; et al. *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. **Physiologia Plantarum**, v. 153, n. 1, p. 79-90, 2015.

CZYMMEK, K. J.; FOGG, M.; POWELL, D. H.; et al. *In vivo* time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the *Arabidopsis* root vascular system by *Fusarium oxysporum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, n. 10, p. 1011-1023, 2007.

DAVIES, P. J. **Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!** Springer Science & Business Media, 2004.

DAVIS, A. S.; HILL, J. D.; CHASE, C. A.; JOHANNIS, A. M.; LIEBMAN, M. Increasing cropping system diversity balances productivity, profitability and environmental health. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, e47149, 2012.

DINATO N. B. **Criopreservação de grãos de pólen de espécies de *Paspalum* visando seu uso em programas de melhoramento genético.** 2020. 164 p. Tese (doutorado) em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, UFSCar, São Carlos, 2020.

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.

DÖBEREINER, J.; CAMPELO, A. B. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soils. **Plant and Soil**, v. 35, n. 1, p. 457-470, 1971.

DÖBEREINER, J. et al. Further research on *Azoto-bacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flüge. **Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, II**, v. 124, p. 224-230, 1970.

DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**, p. 535-536, 1980.

DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, p. 85-125, 2014.

DUNG, J. K. S.; ALDERMAN, S. C.; WALENTA, D. L.; HAMM, P. B. Spatial patterns of ergot and quantification of sclerotia in perennial ryegrass seed fields in eastern Oregon. **Plant Disease**, v. 100, n. 6, p. 1110-1117, 2016.

ENTZ, M. H.; BARON, V. S.; CARR, P. M.; et al. Potential of forages to diversify cropping systems in the northern Great Plains. *Agronomy Journal*. **Anais...** v. 94, p. 240-250, 2002.

ESKIN, N.; VESSEY, K.; TIAN, L. Research progress and perspectives of nitrogen fixing bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in monocot plants. **International Journal of Agronomy**, 2014.

ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A.; HOSSEINI, H. M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. **MethodsX**, v. 2, p. 72-78, 2015.

ETESAMI, H.; BEATTIE, G. A. Mining halophytes for plant growth-promoting halotolerant bacteria to enhance the salinity tolerance of non-halophytic crops. **Frontiers in Microbiology**, p. 148, 2018.

ETESAMI, H.; MIRSEYED HOSSEINI, H.; ALIKHANI, H. A. Bacterial biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase, a useful trait to elongation and endophytic colonization of the roots of rice under constant flooded conditions. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 20, n. 4, p. 425-434, 2014.

FAO. The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050 | Global Perspectives Studies | Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and Agriculture Organization**, 2018.

FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; AIDAR, S. DE T.; MORGANTE, C. V.; et al. The resurrection plant *Tripogon spicatus* (*Poaceae*) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern brazilian caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 4, p. 993-1002, 2015.

FERREIRA, A.; QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T.; et al. Diversity of endophytic bacteria from Eucalyptus species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 287, n. 1, p. 8-14, 2008.

GAGNE-BOURGUE, F.; ALIFERIS, K. A.; SEGUIN, P.; et al. Isolation and characterization of indigenous endophytic bacteria associated with leaves of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) cultivars. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 3, p. 836-853, 2013.

GASPARETTO, B. F.; RADUNZ, L. L.; LOPES, R. R.; FRANKE, L. B.; MARTINELLI, J. A. Fungi associated with *Paspalum guenoarum* seeds: Their impact on physiology and control. **Ciencia Rural**, v. 51, n. 9, 2021.

GATES, Roger N.; QUARIN, Camilo L.; PEDREIRA, Carlos GS. Bahiagrass. **Warm-season (C4) grasses**, v. 45, p. 651-680, 2004.

GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; DE FREITAS, J. R.; SEIB, A. M. Diversity of root-associated bacteria associated with field-grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, n. 1, p. 43-50, 1998.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, v. 2012, 2012.

GONÇALVES, T. M.; VIGNA, B. B. Z.; AZEVEDO, A. L. S.; FERREIRA, J. R. G., POZZOBON, M. T.; FÁVERO, A. P. Reproductive mode and DNA content of *Paspalum* accessions from Plicatula group: Reproduction and DNA content of *Paspalum*. **Flora**, v. 279, p. 151810, 2021.

GOND, S. K.; TORRES, M. S.; BERGEN, M. S.; HELSEL, Z.; WHITE, J. F. Induction of salt tolerance and up-regulation of aquaporin genes in tropical corn by rhizobacterium *Pantoea agglomerans*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 392-399, 2015.

GORDON, T. R. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* Wilt Syndrome. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, p. 23-39, 2017.

GURIKAR, C.; NAIK, M. K.; SREENIVASA, M. Y. *Azotobacter*: PGPR activities with special reference to effect of pesticides and biodegradation. In: **Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity**. Springer, New Delhi, 2016. p. 229-244.

GYANESHWAR, P.; NARESH KUMAR, G.; PAREKH, L. J.; POOLE, P. S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, p. 83-93, 2002.

HAIYAMBO, D. H.; CHIMWAMUROMBE, P. M.; REINHOLD-HUREK, B. Isolation and screening of rhizosphere bacteria from grasses in east Kavango region of Namibia for plant growth promoting characteristics. **Current Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 566-571, 2015.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, p. 895-914, 1997.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica**, v. 4, n. 1, p. 9, 2001.

HOAGLIN, D. C.; IGLEWICZ, B. Fine-tuning some resistant rules for outlier labeling. **Journal of the American Statistical Association**, v. 82, n. 400, p. 1147-1149, 1987.

HOANG, N. T.; TÓTH, K.; STACEY, G. The role of microRNAs in the legume-*Rhizobium* nitrogen-fixing symbiosis. **Journal of Experimental Botany**, v. 71, n. 5, p. 1668-1680, 2020.

HOCHHOLDINGER, F.; ZIMMERMANN, R. Conserved and diverse mechanisms in root development. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 70-74, 2008.

HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, v. 35, n. 2, p. 227-240, 1997.

HONGYU, K. **Comparação do GGE biplot ponderado e AMMI- ponderado com outros modelos de interação genótipo × ambiente**. 2015. 155p. Tese (Doutorado em Estatística e Experimentação Agronômica) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

HONGYU, K.; SANDANIELO, V. L. M.; JUNIOR, G. J. DE O. Análise de Componentes Principais: Resumo Teórico, Aplicação e Interpretação. **E&S Engineering and Science**, v. 5, n. 1, p. 83-90, 2016.

HORTON, M. W.; BODENHAUSEN, N.; BEILSMITH, K.; et al. Genome-wide association study of *Arabidopsis thaliana* leaf microbial community. **Nature Communications**, v. 5, 2014.

HRISTOV, A. N.; OH, J.; FIRKINS, J. L.; et al. Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal - SPECIAL TOPICS. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 5045-5069, 2013.

HUANG, C. L.; SARKAR, R.; HSU, T. W.; et al. Endophytic microbiome of biofuel plant *Miscanthus sinensis* (*Poaceae*) interacts with environmental gradients. **Microbial Ecology**, v. 80, n. 1, p. 133-144, 2020.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413-425, 2010.

HUSEN, E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. **Indonesian Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 1, p. 27-31, 2016.

IRIZARRY, I.; WHITE, J. F. *Bacillus amyloliquefaciens* alters gene expression, ROS production and lignin synthesis in cotton seedling roots. **Journal of Applied Microbiology**, v. 124, n. 6, p. 1589-1603, 2018.

IVLEVA, N. B.; GROAT, J.; STAUB, J. M.; STEPHENS, M. Expression of active subunit of nitrogenase via integration into plant organelle genome. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160951, 2016.

JOHN JIMTHA, C.; JISHMA, P.; SREELEKHA, S.; CHITHRA, S.; RADHAKRISHNAN, E. Antifungal properties of prodigiosin producing rhizospheric *Serratia* sp. **Rhizosphere**, v. 3, p. 105-108, 2017.

JOHNSON, R. A., WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis**. Madison: Prentice Hall International, 1998, 816 p.

JUNGK, A. Root hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 164, n. 2, p. 121-129, 2001.

KADMIRI, I. M.; CHAOUQUI, L.; AZAROUAL, S. E.; et al. Phosphate-solubilizing and auxin-producing rhizobacteria promote plant growth under saline conditions. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 43, n. 7, 2018.

KANDEL, S. L.; JOUBERT, P. M.; DOTY, S. L. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 77, 2017.

KAUR, N. et al. Prospects for ergot disease management with biocontrol products. **Seed production research at Oregon State University USDA-ARS Cooperating**, p. 38-40, 2016.

KE, X.; FENG, S.; WANG, J.; et al. Effect of inoculation with nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 on maize plant growth and the microbiome indigenous to the rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 248-260, 2019.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, M.; OVES, M.; WANI, P. A. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - Current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 56, n. 1, p. 73-98, 2010.

KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In: **Phosphate solubilizing microorganisms**. Springer, Cham, 2014. p. 31-62.

KIRKBY, E. A. Plant growth in relation to nitrogen supply. **Ecological Bulletins**, p. 249-267, 1981.

KOTOKY, R.; NATH, S.; KUMAR MAHESHWARI, D.; PANDEY, P. Cadmium resistant plant growth promoting rhizobacteria *Serratia marcescens* S2I7 associated with the growth promotion of rice plant. **Environmental Sustainability**, v. 2, n. 2, p. 135-144, 2019.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244-1251, 2004.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Mol. Biol. Evol.**, v. 35, n. 6, p. 1547–9, 2018.

KWAK, Y.; PARK, G. S.; SHIN, J. H. High quality draft genome sequence of the type strain of *Pseudomonas lutea* OK2T, a phosphate-solubilizing rhizospheric bacterium. **Standards in Genomic Sciences**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 2016.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic bacteria: A biotechnological potential in agrobiological system. In: **Bacteria in agrobiological crop productivity**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2013. p. 1-44.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological control of insect-pest and diseases by endophytes. In: **Advances in Endophytic research**. Springer, New Delhi, 2014. p. 231-256.

LACAVA, P. T.; MACHADO, P. C.; DE ANDRADE, MARQUES, P. H. Phosphate solubilization by endophytes from the tropical plants. In: **Sustainable Development and Biodiversity**. 26ed. Springer Nature Switzerland AG: Springer International Publishing, v. 3, p. 207-226, 2021.

LACAVA, P. T.; MELO, I. S.; PEREIRA, J. O. Controle biológico e simbiótico de insetos-pragas e doenças por micro-organismos endofíticos. **Bioteconol Microb Ambiental**, v. 1, p. 83-104, 2018.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. John Wiley & Sons, Chichester, 1991, pp. 115-175.

LATA, R.; CHOWDHURY, S.; GOND, S. K.; WHITE, J. F. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 268-276, 2018. 2018.

LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M.F.B.; BELTRAME, R.; SANTOS, A.F.; MACIEL, C.G.; LONGHI, S.J. Sanidade, transmissão via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrella fissilis* procedentes da região sul do Brasil. **Ciência Florestal**, v.22, n.3, p.493-503, 2012.

LEBEIS, S. L.; PAREDES, S. H.; LUNDBERG, D. S.; et al. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa. **Science**, v. 349, n. 6250, p. 860-864, 2015.

LI, H. B.; SINGH, R. K.; SINGH, P.; et al. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1268, 2017.

LI, H.; DING, X.; WANG, C.; et al. Control of tomato yellow leaf curl virus disease by *Enterobacter asburiae* BQ9 as a result of priming plant resistance in tomatoes. **Turkish Journal of Biology**, v. 40, n. 1, p. 150-159, 2016.

LISBOA, P. H. G.; ANDRADE, P. H. M.; MACHADO, P. C.; SOUSA, C. P.; LACAVA, P.T. Isolation and *in vitro* screening of plant growth-promoting rhizobacteria from *Solanum lycocarpum* St. Hil., an endemic plant of the Brazilian tropical savannah. **African Journal of Microbiology Research**, v. 15, p. 253-261, 2021.

LOPES, M. J. S.; DIAS-FILHO, M. B.; GURGEL, E. S. C. Successful plant growth-promoting microbes: Inoculation methods and abiotic factors. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 48, 2021.

LUNDBERG, D. S.; LEBEIS, S. L.; PAREDES, S. H.; et al. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 86-90, 2012.

LUTTRELL, E. S. The disease cycle and fungus-host relationships in dallisgrass ergot. **Phytopathology**, v. 67; n.12, p. 1461-1468, 1977.

MALHOTRA, H.; VANDANA; SHARMA, S.; PANDEY, R. Phosphorus nutrition: Plant growth in response to deficiency and excess. In: **Plant nutrients and abiotic stress tolerance**. Springer, Singapore, 2018. p. 171-190.

MANZOOR, M.; ABBASI, M. K.; SULTAN, T. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their potential for rock phosphate solubilization–mineralization and plant growth promotion. **Geomicrobiology Journal**, v. 34, n. 1, p. 81-95, 2017.

MARQUEZ-SANTACRUZ, H. A.; HERNANDEZ-LEON, R.; OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; VELAZQUEZ-SEPULVEDA, I.; SANTOYO, G. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 9, n. 4, p. 2372-2380, 2010.

MARRA, L. M.; SOUSA SOARES, C. R. F.; DE OLIVEIRA, S. M.; et al. Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. **Plant and Soil**, v. 357, n. 1, p. 289, 2012.

MASCIARELLI, O.; URBANI, L.; REINOSO, H.; LUNA, V. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains

and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590-597, 2013.

MASSEY, F. P.; ENNOS, A. R.; HARTLEY, S. E. Grasses and the resource availability hypothesis: The importance of silica-based defences. **Journal of Ecology**, v. 95, n. 3, p. 414-424, 2007.

MARTHA JÚNIOR, G. B.; VILELA, L.; BARIONI, L. G.; DE SOUSA, D. M. G.; BARCELLOS, A. O. Pasto eficiente. **Revista Cultivar**, p. 18-20. 2004. Disponível em: <https://www.grupocultivar.com.br/ativemanager/uploads/arquivos/artigos/bovinos14_past_oeiciente.pdf>.

MCSTEEN, P. Auxin and monocot development. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 3, p. a001479, 2010.

MELO, I. S. DE; VALARINI, P. J. Potencial de rizobactérias no controle de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. em pepino (*Cucumis sativum* L.). **Scientia Agricola**, v. 52, n. 2, p. 326-330, 1995.

MICHIELSE, C. B.; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 3, p. 311-324, 2009.

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.

MOLINA, L.; SEGURA, A.; DUQUE, E.; RAMOS, J. L. The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment. **Advances in Applied Microbiology**. v. 110, p. 149-180, 2020.

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects *in vitro*. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21-28, 2012.

MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; et al. Database indexing for production MegaBLAST searches. **Bioinformatics**, v. 24, n. 24, p. 1757-1764, 2008.

MORRISON, D. F. **Multivariate statistical methods**. 2.ed. Singapore: McGraw, Hill. 1976, 415 p.

MORRONE, O.; AAGESEN, L.; SCATAGLINI, M. A.; et al. Phylogeny of the *Panicaceae* (*Poaceae: Panicoideae*): Integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, v. 28, n. 4, p. 333-356, 2012.

NEYRA, C. A.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. In: **Advances in Agronomy**. Academic Press, 1977. p. 1-38.

NIU, B.; PAULSON, J. N.; ZHENG, X.; KOLTER, R. Simplified and representative bacterial community of maize roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 12, p. E2450-E2459, 2017.

NOREEN, S.; ALI, B.; HASNAIN, S. Growth promotion of *Vigna mungo* (L.) by *Pseudomonas* spp. exhibiting auxin production and ACC-deaminase activity. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 411-417, 2012.

NOVO, P. E.; VALLS, J. F. M.; GALDEANO, F.; et al. Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *P. oteroi*: A key tool for forage breeding. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 4, p. 356-362, 2016.

OBERTI, H.; DALLA RIZZA, M.; REYNO, R.; et al. Diversity of *Claviceps paspali* reveals unknown lineages and unique alkaloid genotypes. **Mycologia**, v. 112, n. 2, p. 230-243, 2020.

DE OLIVEIRA, F. A.; VIGNA, B. B. Z.; DA SILVA, C. C.; et al. Coexpression and Transcriptome analyses identify active Apomixis-related genes in *Paspalum notatum* leaves. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2020.

OSPINA-GIRALDO, M. D.; MULLINS, E.; KANG, S. Loss of function of the *Fusarium oxysporum* SNF1 gene reduces virulence on cabbage and Arabidopsis. **Current Genetics**, v. 44, n. 1, p. 49-57, 2003.

PACIFICO, D. et al. The role of the endophytic microbiome in the grapevine response to environmental triggers. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 1256, 2019.

PASTOR, N.; ROSAS, S.; LUNA, V.; ROVERA, M. Inoculation with *Pseudomonas putida* PCI2, a phosphate solubilizing rhizobacterium, stimulates the growth of tomato plants. **Symbiosis**, v. 62, n. 3, p. 157-167, 2014.

PATEL, J. K.; ARCHANA, G. Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from Poaceae plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat. **Plant and Soil**, v. 417, n. 1-2, p. 99-116, 2017.

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.

DE PAULA, A. F. Identificação taxonômica, potencial agrícola e biotecnológico de bactérias endofíticas e rizosféricas associadas a *Paspalum atratum* e *P. notatum*. 2019. 87 p. **Embrapa Pecuária Sudeste-Tese/dissertação (ALICE)**, 2019.

PAUL, D.; SINHA, S. N. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 1, p. 130-136, 2017.

PAŽOUTOVÁ, S. The genus *Claviceps*: Evolution at work. **Sorghum and Millets Diseases**, p. 135, 2008.

PAŽOUTOVÁ, S. The phylogeny and evolution of the genus *Claviceps*. **Mycological Research**, v. 105, n. 3, p. 275-283, 2001.

PHAM, V. T. K.; REDIERS, H.; GHEQUIRE, M. G. K.; et al. The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. **Archives of Microbiology**, v. 199, n. 3, p. 513-517, 2017.

PISLARIU, C. I.; SINHAROY, S.; TORRES-JEREZ, I.; et al. The nodule-specific PLAT domain protein NPD1 is required for nitrogen-fixing symbiosis. **Plant Physiology**, v. 180, n. 3, p. 1480-1497, 2019.

PRADHAN, N.; SUKLA, L. B. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 10, 2006.

PROVAZI, M. **Avaliação de espécies de *Paspalum* sob pastejo**. 2006. 25 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/95218>>.

QUECINE, M.; BATISTA, B.; LACAVALA, P. Diversity and biotechnological potential of plant-associated endophytic bacteria. **Biotechnology**, v. 2, p. 377-423, 2014.

RASHID, M.; KHALIL, S.; AYUB, N.; ALAM, S.; LATIF, F. Organic Acids Production and Phosphate Solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 187-196, 2004.

RAZAQ, M.; ZHANG, P.; SHEN, H. Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of *Acer mono*. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171321, 2017.

REDMAN, R. S.; SHEEHAN, K. B.; STOUT, R. G.; RODRIGUEZ, R. J.; HENSON, J. M. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v. 298, n. 5598, p. 1581-1581, 2002.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: Bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435-443, 2011.

RISPAIL, N.; DI PIETRO, A. *Fusarium oxysporum* Ste12 controls invasive growth and virulence downstream of the Fmk1 MAPK cascade. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 22, n. 7, p. 830-839, 2009.

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.

ROMERO, F. M.; MARINA, M.; PIECKENSTAIN, F. L. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, n. 2, p. 187-194, 2014.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

RUDEL, T. K.; PAUL, B.; WHITE, D.; et al. LivestockPlus: Forages, sustainable intensification, and food security in the tropics. **Ambio**, v. 44, n. 7, p. 685-693, 2015.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, 2016.

SANTOYO, G.; DEL OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; GOVINDAPPA, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 8, p. 855-872, 2012.

SARATHAMBAL, C.; ILAMURUGU, K.; BALACHANDAR, D.; CHINNADURAI, C.; GHARDE, Y. Characterization and crop production efficiency of diazotrophic isolates from the rhizosphere of semi-arid tropical grasses of India. **Applied Soil Ecology**, v. 87, p. 1-10, 2015.

SCHARDL, C. L.; FLOREA, S.; PAN, J.; et al. The epichloae: Alkaloid diversity and roles in symbiosis with grasses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 16, n. 4, p. 480-488, 2013.

SCHREITER, S.; BABIN, D.; SMALLA, K.; GROSCH, R. Rhizosphere competence and biocontrol effect of *Pseudomonas* sp. RU47 independent from plant species and soil type at the field scale. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 97, 2018.

SELVAKUMAR, G.; JOSHI, P.; SUYAL, P.; et al. Rock phosphate solubilization by psychrotolerant *Pseudomonas* spp. and their effect on lentil growth and nutrient uptake under polyhouse conditions. **Annals of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 1353-1362, 2013.

SENEVIRATNE, M.; GUNARATNE, S.; BANDARA, T.; et al. Plant growth promotion by *Bradyrhizobium japonicum* under heavy metal stress. **South African Journal of Botany**, v. 105, p. 19-24, 2016.

SHI, Y.; YANG, H.; ZHANG, T.; SUN, J.; LOU, K. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of *Tianshan mountain*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 14, p. 6375-6385, 2014.

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, n. 2, 2000.

DA SILVA, S. Á. C. G.; DOS SANTOS, A. G.; LOGES, V.; DE CASTRO, A. C. R.; DA ROSA, R. C. T. Sanitary quality of seed of *Paspalum* species. **Ornamental Horticulture**, v. 26, n. 3, p. 328-332, 2020.

SMITH, P. Do grasslands act as a perpetual sink for carbon? **Global Change Biology**, v. 20, n. 9, p. 328-332, 2014.

DE SOUSA, C. P.; SERRANO, N. F. G.; LACAVAL, P. T. Endophytic microorganisms of the tropical savannah: A promising source of bioactive molecules. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer, Cham, 2017. p. 57-70.

DE SOUZA, F. H. D., ARAGÃO, F. A. S., LOGES, V., SILVA, T. F., CAFÉ, F. B. S., SILVA, E. B., ... & ROSA, R. C. T. Characterization of *Paspalum* accessions as ornamental lawn. In: **XXV International EUCARPIA Symposium Section Ornamentals: Crossing Borders 1087**, 2015, p. 255-259.

DE SOUZA, F. H. D.; CAVALLARI, M. M.; GUSMAO, M. R. Produção comercial de sementes de *Paspalum notatum* var. *notatum*. **Embrapa Pecuária Sudeste-Documentos (INFOTECA-E)**, 2020.

SPAEPEN, S.; DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; VANDERLEYDEN, J. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1, p. 15-23, 2008.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448, 2007.

SPAEPEN, S.; VERSÉES, W.; GOCKE, D.; et al. Characterization of phenylpyruvate decarboxylase, involved in auxin production of *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 21, p. 7626-7633, 2007.

SRIVASTAVA, SUCHI; BIST, V.; SRIVASTAVA, SONAL; et al. Unraveling aspects of *Bacillus amyloliquefaciens* mediated enhanced production of rice under biotic stress of *Rhizoctonia solani*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 587, 2016.

STRAPASSON, E.; VENCOVSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Seleção de Descritores na caracterização de germoplasma de *Paspalum* sp. por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p. 373-381, 2000.

TANIMOTO, E. Regulation of root growth by plant hormones - Roles for auxin and gibberellin. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 4, p. 249-265, 2005.

TEIXEIRA, P. J. P.; COLAIANNI, N. R.; FITZPATRICK, C. R.; DANGL, J. L. Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. **Current Opinion in Microbiology**, v. 49, p. 7-17, 2019.

THAWEENUT, N.; HACHISUKA, Y.; ANDO, S.; YANAGISAWA, S.; YONEYAMA, T. Two seasons' study on nifH gene expression and nitrogen fixation by diazotrophic endophytes in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids): Expression of nifH genes similar to those of rhizobia. **Plant and Soil**, v. 338, n. 1, p. 435-449, 2011.

TUDZYNSKI, P.; SCHEFFER, J. *Claviceps purpurea*: Molecular aspects of a unique pathogenic lifestyle. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 5, p. 377-388, 2004.

VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. **Plant Physiology**, v. 127, n. 2, p. 390-397, 2001.

VARGAS JR, J. M.; TURGEON, Alfred J. *Poa annua*: **Physiology, culture, and control of annual bluegrass**. John Wiley & Sons, 2003, 84 p.

VASSILEV, N.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; VASSILEVA, M. Stress-Tolerant P-solubilizing microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 4, p. 851-859, 2012.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; PERGALIS, P.; et al. The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. **Microbial Ecology**, v. 61, n. 2, p. 277-285, 2011.

VENIERAKI, A.; DIMOU, M.; VEZYRI, E.; et al. The nitrogen-fixation island insertion site is conserved in diazotrophic *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas* sp. isolated from distal and close geographical regions. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e105837, 2014.

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, n. 2-3, p. 127-141, 2001.

VERMA, S. K.; KINGSLEY, K.; BERGEN, M.; et al. Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease. **Plant and Soil**, v. 422, n. 1-2, 2018.

VERMA, S. K.; KINGSLEY, K.; IRIZARRY, I.; et al. Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. **Journal of Applied Microbiology**, v. 422, n. 1, p. 223-238, 2017.

VERMA, S. K.; KINGSLEY, K. L.; BERGEN, M. S.; KOWALSKI, K. P.; WHITE, J. F. Fungal disease prevention in seedlings of rice (*Oryza sativa*) and other grasses by growth-promoting seed-associated endophytic bacteria from invasive *Phragmites australis*. **Microorganisms**, v. 6, n. 1, p. 21, 2018.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003.

VIVES-PERIS, V.; GÓMEZ-CADENAS, A.; PÉREZ-CLEMENTE, R. M. Salt stress alleviation in citrus plants by plant growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas putida* and *Novosphingobium* sp. **Plant Cell Reports**, v. 37, n. 11, p. 1557-1569, 2018.

WAHYUDI, A. T.; ASTUTI, R. P.; WIDYAWATI, A.; MERYANDINI, A.; NAWANGSIH, A. A. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 3, n. 2, p. 34-40, 2011.

WALLAU, M.; VENDRAMINI, J.; DUBEUX, J.; BLOUNT, A. Bahiagrass (*Paspalum notatum* Flueggé): Overview and Pasture Management. **EDIS**, v. 2019, n. 4, p. 10-10, 2019.

WALLER, F.; ACHATZ, B.; BALTRUSCHAT, H.; et al. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 38, p. 13386-13391, 2005.

WANG, Q.; DODD, I. C.; BELIMOV, A. A.; JIANG, F. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase growth and photosynthesis of pea plants under salt stress by limiting Na⁺ accumulation. **Functional Plant Biology**, v. 43, n. 2, p. 161-172, 2016.

WHITE, J. F.; CHEN, Q.; TORRES, M. S.; et al. Collaboration between grass seedlings and rhizobacteria to scavenge organic nitrogen in soils. **AoB PLANTS**, v. 7, n. 1, 2015.

WHITE, J. F. et al. Endophytic bacteria in grass crop growth promotion and biostimulation. **Grass Research**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 2021.

WHITE, J. F.; KINGSLEY, K. I.; KOWALSKI, K. P.; et al. Disease protection and allelopathic interactions of seed-transmitted endophytic pseudomonads of invasive reed grass (*Phragmites australis*). **Plant and Soil**, v. 422, n. 1-2, p. 195-208, 2018a.

WHITE, J. F.; KINGSLEY, K.; VERMA, S.; KOWALSKI, K. Rhizophagy cycle: An oxidative process in plants for nutrient extraction from symbiotic microbes. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 95, 2018b.

WHITE, J. F.; TORRES, M. S.; SOMU, M. P.; et al. Hydrogen peroxide staining to visualize intracellular bacterial infections of seedling root cells. **Microscopy Research and Technique**, v. 77, n. 8, p. 566-573, 2014.

YADAV, A.; YADAV, K.; VASHISTHA, A. Phosphate solubilizing activity of *Pseudomonas fluorescens* PSM1 isolated from wheat rhizosphere. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 8, n. 1, p. 93-96, 2016.

YANG, B., WANG, Y.; QIAN, P. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. **BMC Bioinformatics**, v. 17, n. 135, p. 1-8, 2016.

YU, H.; YUAN, M.; LU, W.; et al. Complete genome sequence of the nitrogen-fixing and rhizosphere-associated bacterium *Pseudomonas stutzeri* strain DSM4166. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 13, 2011.

ZENG, Q.; WU, X.; WEN, X. Identification and characterization of the rhizosphere phosphate-solubilizing bacterium *Pseudomonas frederiksbergensis* JW-SD2 and its plant growth-promoting effects on poplar seedlings. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 4, p. 1343-1354, 2017.

ZHANG, T.; HU, F.; MA, L. Phosphate-solubilizing bacteria from safflower rhizosphere and their effect on seedling growth. **Open Life Sciences**, v. 14, n. 1, p. 246-254, 2019.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v. 7, n. 1-2, p. 203-214, 2000.

ZHAO, L. F.; XU, Y. J.; LAI, X. H. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 269-278, 2018.

ZULUAGA, M. Y.; MARTINEZ DE OLIVEIRA, A. L.; VALENTINUZZI, F.; et al. Can inoculation with the bacterial biostimulant *Enterobacter* sp. strain 15S be an approach for the smarter p fertilization of maize and cucumber plants? **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 719873, 2021.

CAPÍTULO 2

Formulações à base de nanosílica e bactérias para promoção de crescimento em *Paspalum notatum*

1. INTRODUÇÃO

Biofertilizante é um produto composto por microrganismos vivos ou latentes (inoculantes) com a finalidade de promover o crescimento vegetal através do aumento da disponibilidade de nutrientes para a planta hospedeira, podendo ser aplicado nas sementes, folhas ou solo (BARDI; MALUSÀ, 2012; MALUSÀ; VASSILEV, 2014). Sua formulação fornece fácil manuseio e armazenamento prolongado, atuando como um instrumento de entrega de microrganismos no campo (SAHU; BRAHMAPRAKASH, 2016; KOUR et al., 2020). Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs), como solubilizadoras de fosfato, fixadoras de nitrogênio e agentes de biocontrole, são mundialmente utilizadas como componentes de biofertilizantes (MOHAMMAD; SOHRABI, 2012; SAHU; BRAHMAPRAKASH, 2016). Estima-se que o mercado global de bioestimulantes para plantas aumentará 12% ao ano e atingirá mais de USD 3,0 milhões em 2022 (METICULOUS MARKET RESEARCH, 2017).

Embora as BPCVs sejam usadas comercialmente como biofertilizantes em culturas agrícolas, sua aplicação prática pode não ter o desempenho esperado na planta hospedeira, devido a problemas referentes à estabilidade no solo, aplicações em campo e sistemas de distribuição (KOUL, 2019). Diversos fatores influenciam a colonização bacteriana na planta, muitas vezes resultando em rápida queda da população bacteriana após a inoculação, reduzindo a sua atividade. Para evitar esse declínio no campo, as BPCVs necessitam de um microambiente adequado e proteção física por período prolongado (BASHAN et al., 2014; TIMMUSK et al., 2017). A aplicação dos inoculantes requer turfeiras ou veículos líquidos para estabilizar e auxiliar as bactérias durante o armazenamento e transporte (NAMASIVAYAM et al., 2014). No entanto, substâncias líquidas fornecem uma distribuição desigual de bactérias nas sementes, reduzindo sua eficácia (COVARRUBIAS et al., 2012). Dessa forma, torna-se necessária a exploração de materiais alternativos para preservação da qualidade e eficácia do inóculo ao mesmo tempo em que reduz custos para o agricultor e impactos negativos ao meio ambiente (HERRMANN; LESUEUR, 2013).

Nos últimos anos, a nanotecnologia tem sido amplamente utilizada na agricultura de precisão. Devido ao pequeno tamanho e propriedades exclusivas em comparação aos seus

materiais em tamanho original, as nanopartículas estão sendo prospectadas para contornar alguns obstáculos enfrentados no uso de biofertilizantes, como reprodutibilidade, estabilidade no armazenamento, desidratação e sensibilidade à temperatura (BANSAL et al., 2014; DUHAN et al., 2017). Materiais nanoestruturados provaram ser capazes de aumentar o potencial das BPCVs como inoculantes, conhecidos como nano-biofertilizantes e nano-biopesticidas. Nanopartículas de sílica, prata, zinco, titânio e ouro foram capazes de aumentar a população bacteriana e melhorar seus atributos para promoção de crescimento vegetal em diferentes espécies vegetais (DIMKPA et al., 2012; KARUNAKARAN et al., 2013; RANGARAJ et al., 2014; PALMQVIST et al., 2015; SHUKLA et al., 2015; ZAND et al., 2020).

Nanopartículas (NPs) são estruturas com dimensões compreendidas entre 1 e 100 nm e são utilizadas para o desenvolvimento de materiais ou dispositivos com aplicações variadas em materiais estratégicos (ARIVALAGAN et al., 2011). A exploração de nanopartículas é uma área de intensa pesquisa científica, uma vez que esses materiais possuem propriedades novas, aprimoradas e sintonizáveis, com potenciais aplicações em diversas áreas, como física, química, biologia, ciências da saúde e agricultura.

Nanopartículas de óxido de silício (SiO_2), também conhecidas como sílica, estão entre as NPs mais utilizadas (NEETHIRAJAN et al., 2009), podendo ser tanto extraídas do ambiente como sintetizadas. As NPs de sílica são amplamente utilizadas em diversas áreas do conhecimento devido à facilidade e baixo custo de síntese, sendo possível a obtenção de grandes quantidades de sílica com morfologia e tamanho controlados, além de sua biocompatibilidade, inércia química e ampla área superficial (RAO et al., 2005; JEELANI et al., 2020). Uma de suas principais aplicações é a utilização em sistemas de liberação controlada, permitindo o carregamento de diversos compostos, como fármacos, DNA, RNA, proteínas, fertilizantes e pesticidas. Além disso, a sílica é capaz de melhorar a eficiência das moléculas (HOM et al., 2009; XU et al., 2019). Seu uso na agricultura também foi relatado na formulação de pesticidas inteligentes e biorremediação para aumentar a viabilidade de sementes de milho (ELANGO et al., 2011; KUMARI; SINGH, 2016; LIANG et al., 2020). Além disso, a aplicação de silício (Si) como fertilizante tem sido uma potencial opção sustentável para a redução de estresses bióticos e abióticos em diversas culturas (ETESAMI; JEONG, 2018).

Nanoformulações aplicadas aos biofertilizantes são capazes de aumentar a estabilidade e reprodutibilidade das BPCVs no meio ambiente, uma vez que promovem resistência à dessecação, radiação UV e calor (VANDERGHEYNST et al. 2007; GHORMADE et al. 2011). Nesse contexto, a associação de materiais nanoestruturados e BPCVs pode ser uma ferramenta eficiente para aumentar a estabilidade e especificidade dos biofertilizantes na agricultura, promovendo benefícios econômicos e ambientais (MORAES et al., 2021).

Diante dessa perspectiva, explorar o potencial agrícola e biotecnológico de espécies de *Paspalum* por meio de bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas a nanopartículas de sílica torna-se uma estratégia interessante e inovadora dentro do agronegócio. O presente trabalho é o pioneiro em explorar a associação de bactérias promotoras de crescimento vegetal e nanopartículas de sílica em plantas do gênero *Paspalum*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de bactérias endofíticas e rizosféricas isoladas de *Paspalum* spp. associadas a nanopartículas de sílica em plântulas de *Paspalum notatum*, visando a formulação de nano-biofertilizantes para promoção de crescimento vegetal.

2.2 Específicos

- Atestar o potencial e interação das bactérias e nanopartículas de sílica para promoção de crescimento vegetal por meio da avaliação das plântulas inoculadas;
- Analisar e diagnosticar a colonização bacteriana intracelular por meio de microscopia óptica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de SiO₂

As nanopartículas de SiO₂ foram desenvolvidas no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica (LIEC) da UFSCar, São Carlos, em colaboração com o Prof. Dr. Emerson Rodrigues de Camargo e o doutorando Lucas da Silva Ribeiro.

Nanopartículas esféricas de SiO₂ foram obtidas pelo método de Stöber et al. (1968). As quantidades de ortosilicato de tetraetilo TEOS e hidróxido de amônio utilizadas foram baseadas no estudo de Arantes et al. (2012), que mostrou que é possível alterar o tamanho das esferas modificando a proporção de TEOS/NH₃. Nesta síntese, 70 mL de etanol anidro (Synth 98.9%), 25 mL de água destilada, 1 mL de hidróxido de amônio (Synth 27%) e 6 mL de TEOS (Sigma Aldrich 98%) foram adicionados, respectivamente, nessa ordem, em um Becker. A mistura foi mantida sob agitação constante por 24 h em temperatura ambiente. Para remoção do hidróxido de amônio, as nanopartículas foram centrifugadas a 23000 rpm por 15 minutos três vezes com etanol anidro. Para confirmar a formação da sílica, foi realizada a análise do espectro infravermelho por Espectroscopia por Refletância Difusa no Infravermelho com Transformada de Fourier (DRIFT) utilizando a região 4000-400 cm⁻¹, no equipamento Bruker Equinox 55. O tamanho e a morfologia das nanopartículas foram determinados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em SEM-FEG ZEISS modelo SUPRA 35.

3.2 Isolados bacterianos de *Paspalum* spp.

As bactérias utilizadas no presente estudo foram isoladas de plantas de diferentes espécies de *Paspalum* (Tabela 1) conservadas no Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* localizado na Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos, São Paulo, Brasil (21.9887° S, 47.8787° O).

Tabela 1. Origem das bactérias utilizadas no presente estudo.

Gênero	Isolado	Planta	Parte
<i>Alcaligenes</i> sp.	3	<i>Paspalum compressifolium</i> (BGP 380)	Rizosfera
<i>Enterobacter</i> sp.	86	<i>Paspalum rojasii</i> (BGP 272)	Folha
<i>Serratia</i> sp.	51	<i>Paspalum lenticulare</i> (BGP 281)	Rizosfera

Os isolados bacterianos utilizados no presente estudo foram selecionados com base nos testes *in vitro* para fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção do fitormônio ácido indol-3-acético previamente realizados, descritos no capítulo 1. As três bactérias apresentaram resultados positivos para os parâmetros mencionados, sendo consideradas potenciais promotoras de crescimento vegetal.

3.3 Crescimento bacteriano na presença de nanopartículas

O experimento foi conduzido no Laboratório do Prof. Dr. James White, na Rutgers University - The State University of New Jersey, New Brunswick, NJ, USA.

Cada isolado bacteriano foi cultivado em caldo Luria-Bertani (LB) contendo 0.05 mg/mL e 0.1 mg/mL de nanopartículas de SiO₂ (85 nm) por 24 horas a 28 °C sob agitação constante, e posteriormente, centrifugadas e lavadas com água esterilizada por duas vezes para remoção total do meio de cultura do pellet bacteriano. As suspensões bacterianas foram padronizadas a 10⁶-10⁸ UFC.mL⁻¹.

3.4 Material vegetal

O presente estudo foi realizado com sementes de *Paspalum notatum* cultivar Argentine, da marca Wonderlawn[®], lote 8340.

3.4.1 Desinfecção superficial das sementes de *Paspalum notatum*

As sementes de *P. notatum* foram submetidas a tratamento com H₂SO₄ a 98% por 10 minutos, em seguida, lavadas com água esterilizada, e posteriormente desinfetadas com NaOCl (Clorox[®]) a 4% por 30 minutos sob agitação constante. Após desinfetadas, as

sementes foram lavadas com água esterilizada e duplamente destilada para a remoção completa de NaOCl das superfícies das sementes (WHITE et al., 2018a).

3.5 Experimentos de promoção de crescimento vegetal

As sementes desinfectadas foram submersas em soluções dos diferentes tratamentos (Tabela 2) por 2 horas (50 sementes para 1 mL de cada solução), e em seguida transferidas para placas de Petri contendo 0.7% de agarose (10 sementes por placa) (VERMA et al., 2018).

Em outro experimento, as sementes desinfectadas e igualmente submetidas aos diferentes tratamentos (Tabela 2) foram colocadas em caixas Magenta contendo 15 gramas de substrato composto por turfa, areia e perlita na proporção de 2:2:1, e 40 mL de água esterilizada (10 sementes por caixa) (WHITE et al., 2018a).

Os experimentos em agarose e substrato foram realizados em triplicata e incubados em ambiente controlado com temperatura de 30 °C durante o dia, 20 °C durante a noite, e 12 horas de fotoperíodo. Após 25 dias, foram avaliados os parâmetros: comprimento de raiz, comprimento de folha, e taxa de germinação das plântulas germinadas em substrato. Os comprimentos de raiz e folha foram baseados na maior raiz e maior folha de cada plântula. Em seguida, as plântulas foram transferidas para estufa a 70 °C por 48 h, e então as raízes e as folhas foram pesadas em balança eletrônica separadamente.

Tabela 2. Composição dos onze tratamentos aplicados às sementes de *P. notatum* e controle. Estão indicados o número do tratamento, concentração de nanopartículas (NPs) e gêneros bacterianos utilizados em cada tratamento.

Tratamento	Concentração NPs (mg/mL)	Bactéria
Controle	-	-
1	0.05	-
2	0.1	-
3	-	<i>Serratia</i> sp.
4	0.05	<i>Serratia</i> sp.
5	0.1	<i>Serratia</i> sp.
6	-	<i>Alcaligenes</i> sp.
7	0.05	<i>Alcaligenes</i> sp.
8	0.1	<i>Alcaligenes</i> sp.

Tratamento	Concentração NPs (mg/mL)	Bactéria
9	-	<i>Enterobacter</i> sp.
10	0.05	<i>Enterobacter</i> sp.
11	0.1	<i>Enterobacter</i> sp.

3.6 Visualização das bactérias e nanopartículas em microscópio óptico por coloração com 3,3'-Diaminobenzidina (DAB)

Após 25 dias de incubação em 0.7% de agarose, as raízes das plântulas foram coradas por inundação em placas de Petri com 2.5 mM de tetracloreto de 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) por 15 horas. DAB é utilizado para visualização do efeito do oxigênio reativo (H_2O_2) produzido ao redor e no interior das células bacterianas (WHITE et al., 2015). Em seguida, as raízes foram coradas com anilina azul para melhor visualização em microscópio óptico de campo claro com lentes oculares de 10x e objetivas de 10x, 40x e 100x.

3.7 Análise estatística

Para discriminação dos tratamentos, para os parâmetros comprimento de raiz e comprimento de folha das plântulas em substrato, foi realizada a análise de variância (ANOVA) para 1 fator seguida pelo teste de médias Scott-Knott com nível 0.05 de significância, utilizando o programa Sisvar, versão 5.7 (FERREIRA, 2011).

Foi realizada a Análise dos Componentes Principais (ACP) para todos os parâmetros avaliados utilizando o programa estatístico Past, versão 2.17c (HAMMER et al., 2001).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das nanopartículas de SiO_2

O método de Stöber é amplamente utilizado porque permite a obtenção de nanopartículas esféricas de tamanho controlado. Neste método, as nanopartículas são formadas através da hidrólise de um precursor de sílica (TEOS). A reação é catalisada por

hidróxido de amônia, resultando em um tetraedro de Si(OH)_4 , o qual é subsequentemente condensado, formando a estrutura tridimensional da sílica.

A análise do espectro infravermelho foi realizada para confirmação da formação da sílica, sendo possível a visualização do espectro da nanopartícula sintetizada (Figura 1A). As principais bandas relacionadas à sílica são o trecho do grupo -OH na região de $3700\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$, o trecho antissimétrico do grupo Si-O-Si na região de $1320\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$, o trecho do grupo Si-OH na região de $980\text{-}880\text{ cm}^{-1}$, e a deformação do grupo -OH na região $845\text{-}765\text{ cm}^{-1}$. As nanopartículas sintetizadas apresentam tamanho aproximado de $85 \pm 11\text{ nm}$ (Figura 1B) com morfologia esférica (Figura 1C).

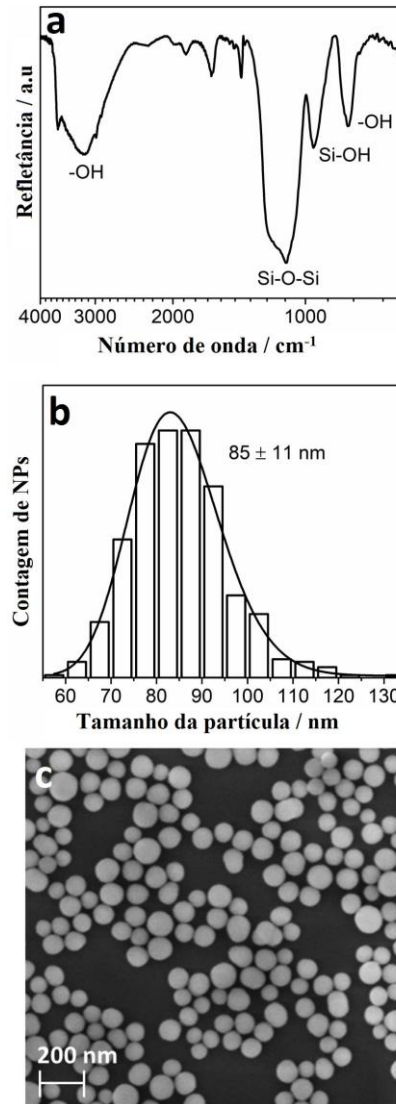


Figura 1. Características das nanopartículas (NPs) de sílica sintetizadas. A) Espectro infravermelho da NP sintetizada; B) Diâmetro das NPs; C) Imagem da morfologia esférica das NPs em MEV. Aumento = 50.00 KX; Tensão de aceleração = 3.0 kV.

4.2 Análise de componentes principais e teste de médias

A análise de componentes principais indicou que os dois primeiros componentes explicaram 84.72% da variância dos parâmetros avaliados, sendo que o componente principal 1 (CP1) explicou 68.05% e o componente principal 2 (CP2) reteve 16.67% da variação dos dados (Tabela 3). Os autovalores ordenados são as variâncias amostrais dos componentes principais (MORRISON, 1976).

Tabela 3. Análise de componentes principais dos parâmetros morfológicos avaliados.

Componente	Autovalor	% da variância
1	3.40	68.05
2	0.83	16.67
3	0.44	8.76
4	0.26	5.19
5	0.07	1.33

Na tabela 4 estão apresentados os parâmetros que mais explicaram a variação observada entre os tratamentos dentro dos componentes principais 1 e 2.

No CP1, o descritor comprimento de raiz foi o que mais explicou a variância dos dados, seguido por peso seco de raiz, peso seco de folha, germinação e comprimento de folha. Todos os parâmetros apresentaram cargas fatoriais positivas no CP1. No CP2, comprimento de folha e peso seco de folha estão positivamente correlacionados entre si, e negativamente correlacionados com comprimento de raiz, peso seco de raiz e germinação. Comprimento de folha foi o parâmetro que mais contribuiu para a variação observada entre os tratamentos, apresentando alta carga fatorial positiva no CP2.

Tabela 4. Contribuição dos parâmetros morfológicos para a análise de componentes principais. Parâmetros avaliados: comprimento de raiz (CR), comprimento de folha (CF), peso seco de raiz (PSR), peso seco de folha (PSF) e germinação (G).

Parâmetro	CP1	CP2
CR	0.490	-0.410
CF	0.400	0.642
PSR	0.460	-0.408
PSF	0.442	0.472
G	0.441	-0.176

De acordo com o gráfico de dispersão dos componentes principais 1 e 2 (Figura 2), o controle (C) e os tratamentos somente com nanopartículas se distribuíram ao lado superior esquerdo do gráfico e oposto aos vetores dos parâmetros germinação (G), comprimento de raiz (CR) e peso seco de raiz (PSR), pois apresentaram os menores valores para esses parâmetros (Tabela 5). Portanto, os tratamentos que se caracterizaram por altos valores para G, CR e PSR, encontram-se ao lado inferior direito do gráfico. Os tratamentos que apresentaram os maiores valores para comprimento de folha (CF) e peso seco de folha (PSF) se concentraram ao lado superior direito do gráfico, e em contrapartida, aqueles que apresentaram baixos valores para CF e PSF se distribuíram ao lado inferior esquerdo.

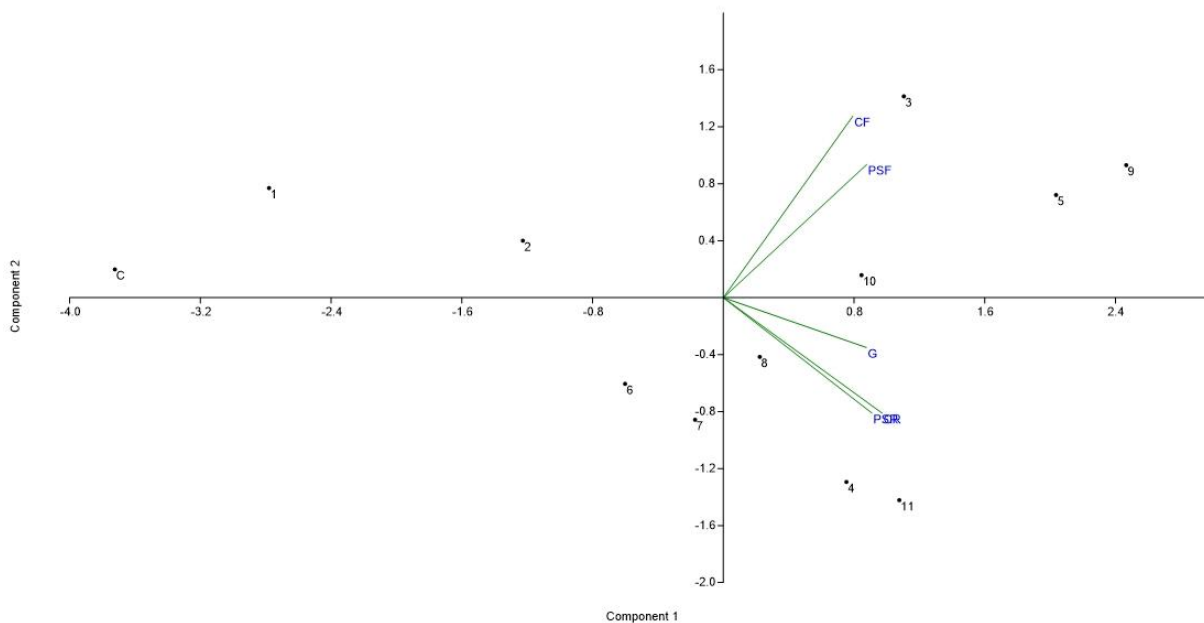


Figura 2. Gráfico de dispersão dos componentes principais 1 e 2 considerando os parâmetros: comprimento de folha (CF), peso seco de folha (PSF), comprimento de raiz (CR), peso seco de raiz (PSR) e germinação (G). Todas as plântulas submetidas aos 11 tratamentos e plântulas controle (C), estão distribuídas no gráfico. Fonte: programa estatístico Past, versão 2.17c.

Os tratamentos 4 (0.05 mg/mL NPs + *Serratia* sp.) (Figura 3F), 5 (0.1 mg/mL NPs + *Serratia* sp.) (Figura 3E), 8 (0.1 mg/mL NPs + *Alcaligenes* sp.), 9 (*Enterobacter* sp.), 10 (0.05 mg/mL NPs + *Enterobacter* sp.) e 11 (0.1 mg/mL NPs + *Enterobacter* sp.), apresentaram os maiores comprimentos de raiz, indicando que as duas concentrações de NPs de SiO₂ aumentaram e mantiveram o crescimento da raiz quando associadas às bactérias *Serratia* sp. e *Enterobacter* sp., respectivamente, e apenas a concentração de 0.1 mg/mL de NPs promoveu diferença significativa no comprimento da raiz nos tratamentos com *Alcaligenes* sp. (Tabela 5). Os mesmos tratamentos, exceto o tratamento 5 (0.1 mg/mL NPs + *Serratia* sp.), também apresentaram os maiores valores para peso de raiz.

Com relação aos parâmetros referentes à folha, os tratamentos 3 (*Serratia* sp.) (Figura 3D) e 9 (*Enterobacter* sp.) se destacaram por apresentarem os maiores CF. Os tratamentos 5 (0.1 mg/mL NPs + *Serratia* sp.) e 10 (0.05 mg/mL NPs + *Enterobacter* sp.) também promoveram o crescimento foliar em comparação ao controle. Da mesma forma,

os tratamentos 3 (*Serratia* sp.), 5 (0.1 mg/mL NPs + *Serratia* sp.), 9 (*Enterobacter* sp.) e 10 (0.05 mg/mL NPs + *Enterobacter* sp.), apresentaram os maiores PSF.

A taxa de germinação foi maior nos tratamentos 3 (*Serratia* sp.), 5 (0.1 mg/mL NPs + *Serratia* sp.), 7 (0.05 mg/mL NPs + *Alcaligenes* sp.), 9 (*Enterobacter* sp.) e 11 (0.1 mg/mL NPs + *Enterobacter* sp.), sendo que os tratamentos 5 e 11 apresentaram 100% de sementes germinadas.

Tabela 5. Efeitos dos tratamentos na germinação, comprimento de raiz, peso seco de raiz, comprimento de folha e peso seco de folha de plântulas de *Paspalum notatum*.

Tratamento	Germinação (%)	Comprimento de raiz (cm)	Peso seco de raiz (mg)*	Comprimento de folha (cm)	Peso seco de folha (mg)*
C	80.0	1.70 ± 0.71d	0.092	5.96 ± 1.14c	0.77
1	76.66	1.63 ± 1.02d	0.16	6.36 ± 1.03c	0.83
2	86.66	2.24 ± 1.05c	0.19	6.41 ± 0.83c	0.88
3	96.66	2.92 ± 0.79b	0.21	7.68 ± 1.22a	0.91
4	93.33	3.72 ± 0.75a	0.28	6.32 ± 0.59c	0.88
5	100.0	3.47 ± 0.68a	0.24	7.04 ± 1.03b	1.01
6	90.0	2.80 ± 0.87b	0.23	6.18 ± 1.05c	0.87
7	96.66	3.15 ± 1.25b	0.21	6.21 ± 1.10c	0.86
8	83.33	3.38 ± 0.76a	0.28	6.75 ± 0.95c	0.87
9	96.66	3.44 ± 0.56a	0.29	7.40 ± 0.89a	1.01
10	86.66	3.31 ± 0.59a	0.28	6.97 ± 0.70b	0.92
11	100.0	3.44 ± 0.71a	0.31	6.64 ± 0.78c	0.83

*Média do peso total dividido pelo número de plântulas

Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes entre as médias de acordo com o teste de Scott-Knott ($P \leq 0.05$). O erro padrão é apresentado ao lado das médias para comprimento de raiz e comprimento de folha

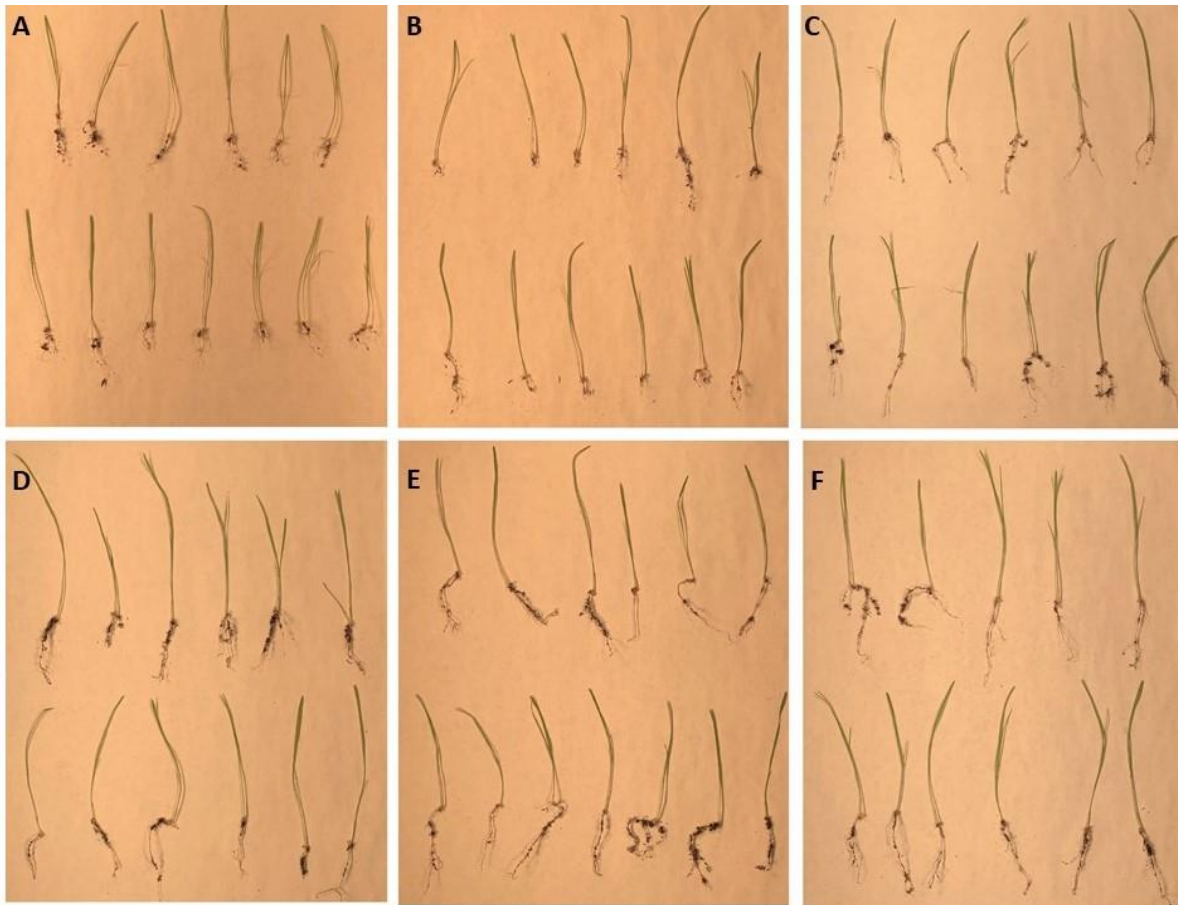


Figura 3. Plântulas de *P. notatum* controle e inoculadas com diferentes tratamentos. A) Controle; B) 0.05 mg/mL de NPs de sílica; C) 0.1 mg/mL de NPs de sílica; D) *Serratia* sp.; E) *Serratia* sp. e 0.05 mg/mL de NPs de sílica; F) *Serratia* sp. e 0.1 mg/mL de NPs de sílica.

Apesar das bactérias terem sido isoladas de outras espécies de *Paspalum*, os resultados obtidos no presente estudo mostram que essas bactérias podem ser promissoras promotoras de crescimento em *P. notatum*, indicando que há a possibilidade de elas também serem benéficas para outras espécies desse gênero vegetal. Considerando apenas os tratamentos com bactérias, o tratamento 9 (*Enterobacter* sp.) apresentou os melhores resultados para todos os parâmetros avaliados, confirmando seu potencial para promoção de crescimento em *P. notatum*. As duas concentrações de NPs adicionadas à essa bactéria não modificaram o comprimento de raiz, mas diminuíram o comprimento e peso de folha. A concentração de 0.1 mg/mL de NPs associada à essa bactéria aumentou a taxa de germinação e peso seco de raiz, sendo o maior valor dentre todos os tratamentos para esse descritor (0.31 mg). Esses resultados corroboram com Boroumand et al. (2020) que

também relatam o maior peso seco de raiz em plantas de agrião (*Barbarea verna*) quando tratadas com bactérias solubilizadoras de fosfato associadas à nanosílica.

Serratia sp. promoveu alta taxa de germinação, grande aumento no comprimento e peso seco de folha e aumento no comprimento e peso seco de raiz, comparado ao controle. As duas concentrações de NPs adicionadas à essa bactéria melhoraram seu desempenho para os parâmetros comprimento e peso seco de raiz. A concentração de 0.1 mg/mL de NPs aumentou o potencial dessa bactéria para germinação de sementes e peso seco de folha (1.01 mg).

Alcaligenes sp. aumentou a germinação, comprimento e peso seco de raiz, e peso seco de folha, embora não tenha aumentado o comprimento de folha, comparado ao controle. NPs na concentração de 0.1 mg/mL aumentaram o potencial dessa bactéria para comprimento e peso seco de raiz, porém diminuiu a taxa de germinação e não modificou comprimento e peso seco de folha.

Nenhum dos tratamentos de BPCV associada às NPs de sílica promoveu aumento no comprimento das folhas em comparação aos tratamentos somente com BPCV, apesar de ter ocorrido aumento no peso seco das folhas, como é o caso do tratamento 5 (0.1 mg/mL NPs + *Serratia* sp.). Em contrapartida, as NPs associadas às BPCVs apresentaram efeito positivo na germinação de sementes e parâmetros associados à raiz. O aumento do comprimento e superfície da raiz é importante vantagem para a planta, pois possibilita maior alcance para captação de água e nutrientes. A produção do fitormônio AIA pelas BPCVs é um dos fatores que promove modificação na arquitetura do sistema radicular das plantas, uma vez que aumentam a quantidade de pelos radiculares e a área da superfície radicular (ETESAMI et al., 2015; KAUSHAL; WANI, 2016). Estudos sugerem que o silício promove a homeostase de fitormônios nas plantas, induzindo resistência sob condições de estresse (YIN et al., 2013).

Karunakaram et al. (2013) constataram que quanto maior a concentração de nanosílica, maior a viabilidade e crescimento de BPCVs. Além disso, a nanosílica promoveu 100% de germinação e aumento do teor de nitrogênio, fósforo e cálcio (NPK) em plantas de milho (*Zea mays*). Similarmente, Pour et al. (2019) encapsularam BPCVs em NPs de sílica e relataram aumento no comprimento das raízes, biomassa vegetal e comprimento de brotos em plantas de pistache UCB-1. No presente estudo, o aumento da

germinação e parâmetros das raízes em alguns tratamentos com BPCV + NPs de sílica pode ser explicado pela potencialização da atividade bacteriana pela sílica, que provavelmente age como um substrato ou estimulante para os microrganismos (BOROUMAND et al., 2020). A interação entre a nanosílica e a bactéria pode ser explicada pela propriedade de hidratação da superfície das NPs de sílica, facilitando a atração da bactéria, e consequentemente aumentando sua resistência em meio ácido (GORDIENKO; KURDISH, 2007; HIROTA et al., 2010).

Em relação aos tratamentos compostos apenas com NPs, quando comparados ao controle, a concentração de 0.05 mg/mL de NPs (Figura 3B) diminuiu a taxa de germinação, mas promoveu pequeno aumento no peso seco de raiz e folha. Já a concentração de 0.1 mg/mL de NPs (Figura 3C) aumentou a taxa de germinação, comprimento e peso seco de raiz, e peso seco de folha. Resultado similar foi encontrado por Siddiqui e Al-Whaibi (2014), que relataram que a nanosílica beneficiou plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), aumentando a taxa de germinação e o peso seco de plântulas.

O silício (Si) é um elemento abundante nos solos (WAINWRIGHT, 1997) que é absorvido pelas plantas e facilita o crescimento das raízes através do aumento da extensão da parede celular (ETESAMI; JEONG, 2018; HAMEED et al., 2013; VACULÍK et al., 2009). No presente trabalho, a concentração de 0.1 mg/mL de nanosílica promoveu crescimento significativo da raiz em relação ao controle e ao tratamento com 0.05 mg/mL de nanosílica, entretanto, os maiores comprimentos de raiz foram obtidos quando a nanosílica estava associada às BPCVs.

Em geral, as plantas demandam sílica para controle de estresses bióticos e abióticos (MA, 2004), incluindo melhoria da eficiência da captação de água e potencial fotossintético nas plantas, promovendo força mecânica e rigidez às folhas, prevenindo-as de tombamento e ataques de patógenos (DATNOFF et al., 1997; JIAN et al., 2006; NAMAGANDA et al., 2009). As gramíneas (família Poaceae), como *Paspalum* spp., contêm de dez a vinte vezes a mais de concentração de sílica quando comparadas às leguminosas e outras dicotiledôneas (RUSSELL, 1961). No presente estudo, foi observado que as plântulas inoculadas com nanopartículas de sílica eram mais vigorosas e eretas, assim como suas raízes mais espessas e fortes, enquanto as raízes dos controles eram muito finas e frágeis.

As plantas absorvem a sílica solúvel presente no solo através das raízes, e posteriormente transportam-na para as folhas, onde esse elemento é depositado na forma de corpos silicosos (SiO_2) (TUBANA et al., 2016; DESHMUKH et al., 2017). Desse modo, o aumento no peso seco das raízes das plântulas tratadas somente com NPs de sílica pode ser explicado pelo acúmulo das NPs de sílica nas raízes e aumento da absorção de água do solo, visto que o silício atua na regulação osmótica da planta (WANG et al., 2015; ZHU et al., 2015).

Os resultados do presente trabalho mostram que as nanopartículas de sílica podem ser utilizadas com as BPCVs *Alcaligenes* sp., *Enterobacter* sp. e *Serratia* sp. na formulação de nano-biofertilizantes para *Paspalum notatum*. Mesmo que a nanosílica não modifique o desempenho da bactéria na planta, ela ainda pode ser considerada promissora para proteger e estabilizar a bactéria no campo contra estresses abióticos. Além disso, a sílica fornece defesa à planta contra estresses bióticos, como relataram Rangaraj et al. (2014) em estudo que provou que o tratamento composto por nanosílica e BPCV aumentou a rigidez foliar e a produção de compostos fenólicos, fornecendo barreira física e resistência induzida contra doenças em plantas de milho. Ainda, esses mesmos autores e outro estudo, realizado por Karunakaran et al. (2013), constataram que as NPs de sílica associadas às BPCVs foram mais eficientes do que outras fontes de silício em plantas de milho.

De acordo com os resultados encontrados no presente trabalho, nanopartículas de sílica possuem potencial para serem utilizadas na formulação de nano-biofertilizantes para *Paspalum notatum*. Contudo, esse é um estudo preliminar em que apenas plântulas foram avaliadas em condições ambientais controladas, por isso, são necessários ensaios em campo e avaliações de plantas maduras para análise dos efeitos desses tratamentos influenciados por fatores bióticos e abióticos a longo prazo.

4.3 Análise microscópica das raízes de *Paspalum notatum*

As raízes das plântulas de *P. notatum* inoculadas com os diferentes tratamentos foram observadas em microscópio óptico para visualização e confirmação da colonização bacteriana nas plântulas. As bactérias colonizaram as raízes das plântulas e induziram a

formação de oxigênio reativo, indicado pela coloração marrom nos pelos radiculares (Figuras 4 e 5).

Observou-se o aparecimento de pontos transparentes no interior dos pelos radiculares nas tanto nas plântulas tratadas apenas com NPs como aquelas tratadas com bactéria + NPs (Figura 4), que podem, possivelmente, ser nanopartículas de sílica absorvidas pelas plântulas. As plantas absorvem diretamente alguns nutrientes dos microrganismos endofíticos em um processo denominado ciclo rizofágico (WHITE et al., 2018b). No ciclo rizofágico, os microrganismos na fase de vida livre captam nutrientes do solo e se tornam endofíticos/intracelulares ao penetrarem as extremidades das raízes das plantas, onde a planta hospedeira extrai esses nutrientes através de um processo oxidativo. Depois de esgotados de nutrientes, os microrganismos saem da planta através dos pelos radiculares, e se recarregam de nutrientes na rizosfera, iniciando o ciclo novamente (WHITE et al., 2018b). Seguindo essa lógica, hipotetiza-se que as bactérias utilizadas no presente trabalho carregaram as NPs de sílica para dentro da plântula hospedeira, que, por sua vez, produziu oxigênio reativo para extraí-las das bactérias, e então a sílica permaneceu dentro dos tecidos radiculares.



Figura 4. Imagens de pelos radiculares de plântulas de *Paspalum notatum* tratadas com nanopartículas de sílica observadas em microscópio óptico. As imagens mostram pontos transparentes no interior dos pelos radiculares (setas). A) Plântula inoculada com tratamento 1; B) Plântula inoculada com tratamento 4; C) Plântula inoculada com tratamento 10. Tratamento 1: 0.05 mg/mL NPs; Tratamento 4: 0.05 mg/mL NPs + *Serratia* sp.; Tratamento 10: 0.05 mg/mL NPs + *Enterobacter* sp.

Na figura 5 é possível visualizar as bactérias (coradas em azul) saindo da plântula de *P. notatum* através do pelo radicular, indicando a colonização dessas bactérias na plântula. Diferentemente das imagens microscópicas das plântulas inoculadas com nanosílica, a plântula inoculada apenas com bactéria (Figura 5) não apresenta pontos transparentes no interior de seus pelos radiculares.



Figura 5. Bactérias saindo dos pelos radiculares de plântulas de *Paspalum notatum* inoculadas com *Serratia* sp. (setas) e observadas em microscópio óptico.

5. CONCLUSÃO

Os tratamentos compostos com as bactérias sem a presença de nanopartículas promoveram crescimento nas plântulas de *P. notatum*. Nanopartículas de sílica na concentração de 0.1 mg/mL associadas a *Serratia* sp. e *Enterobacter* sp. promoveram 100% de germinação das sementes e o maior valor para peso seco de folha. A nanosílica também melhorou parâmetros relacionados à raiz quando associadas a *Alcaligenes* sp., *Enterobacter* sp., e *Serratia* sp. Os tratamentos que promoveram os melhores resultados nas plântulas de *P. notatum* foram *Serratia* sp. + 0.1 mg/mL de NPs de sílica, *Enterobacter* sp. + 0.05 mg/mL de NPs de sílica, e somente *Enterobacter* sp. Contudo, considerando as vantagens da inclusão da nanosílica às formulações de biofertilizantes, o tratamento composto por *Enterobacter* sp. + 0.05 mg/mL de NPs de sílica seria mais vantajoso do que o tratamento apenas com *Enterobacter* sp. para aplicação na agricultura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., & LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ARANTES, T. M., PINTO, A. H., LEITE, E. R., LONGO, E., CAMARGO, E. R. Synthesis and optimization of colloidal silica nanoparticles and their functionalization with methacrylic acid. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 415, p. 209-217, 2012.

ARIVALAGAN, K., RAVICHANDRAN, S., RANGASAMY, K. Nanomaterials and its potential applications. **Int. J. Chem Tech Res.** v. 3, p. 534–538, 2011.

BANSAL, P., DUHAN, J. S., GAHLAWAT, S. K. Biogenesis of nanoparticles: a review. **Afr. J. Biotechnol.** v. 13, p. 2778–2785, 2014.

BARDI, L., MALUSÀ, E. Drought and nutritional stresses in plant: alleviating role of rhizospheric microorganisms. abiotic stress: new research. **Nova Science Publishers Inc.**, p. 1–57, 2012.

BASHAN, Y., DE-BASHAN, L. E., PRABHU, S. R., HERNANDEZ, J.-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). **Plant Soil**, v. 378, p. 1–33, 2014.

BASHAN, Y. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. **J. Gen. Microbiol.**, v. 132, p. 3407–3414, 1986.

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, p. 23–32, 2000.

BOROUMAND N, BEHBAHANI M, DINI G. Combined effects of phosphate solubilizing bacteria and nanosilica on the growth of Land Cress Plant. **J. Soil Sci. Plant. Nutr.**, v. 20, p. 232–243, 2020.

COVARRUBIAS, S. A., DE-BASHAN, L. E., MORENO, M., & BASHAN, Y. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 2669–2680, 2012.

DATNOFF, L. E., DEREN, C. W., SNYDER, G. H. Silicon fertilization for disease management of rice in Florida. **Crop protection**, v. 16, p. 525-531, 1997.

DESHMUKH, R. K., MA, J. F., BÉLANGER, R. R. **Role of silicon in plants**. Frontiers Media, Lausanne, 2017.

DIMKPA, C. O., MCLEAN, J. E., BRITT, D.W., ANDERSON, A. J. CuO and ZnO nanoparticles differently affect the secretion of fluorescent siderophores in the beneficial root colonizer, *Pseudomonas chlororaphis* O6. **Nanotoxicology**, v. 6, p. 635–642, 2012.

DUHAN, J. S., KUMAR, R., KUMAR, N., KAUR, P., NEHRA, K., & DUHAN, S. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotech. Reports**, v. 15, p. 11-23, 2017.

DUNN, B.; ZINK, J. I. Molecules in glass: probes, ordered assemblies, and functional materials. **Accounts of chemical research**, v. 40, n. 9, p. 747-755, 2007.

ELANGO, V., VENKATACHALAM, R., PERIASAMY, P. Influence of nanosilica powder on the growth of maize crop (*Zea Mays* L.). **Int. J. of Green Nanotech.**, v. 3, p. 180-190, 2011.

ETESAMI, H., ALIKHANI, H. A., HOSSEINI, H. M. Indole-3-acetic acid and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase: bacterial traits required in rhizosphere, rhizoplane and/or endophytic competence by beneficial bacteria. In: **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem**. Springer, p. 183–258, 2015.

ETESAMI, H., JEONG, B. R. Silicon (Si): Review and future prospects on the action mechanisms in alleviating biotic and abiotic stresses in plants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 147, p. 881–896, 2018.

FERREIRA, A., QUECINE, M. C., LACAVAL, P. T., ODA, S., AZEVEDO, J. L., ARAÚJO, W. L. Diversity of endophytic bacteria from *Eucalyptus* species seeds and colonization of seedlings by *Pantoea agglomerans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 287, p. 8–14, 2008.

FERREIRA, D. F. Sisvar: um sistema computacional de análise estatística. **Ciência e agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FRENCH, P. C., STANTON, F., LAWLESS, E. G., O' RIORDAN, F. J., MONAHAN, P. J., CAFFREY, A. P., MOLONEY. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass, grass silage, or concentrate-based diets. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2849-2855, 2000.

GERMIDA, J. J.; SICILIANO, S. D.; FREITAS, J. R.; SEIB, A. M. 1998. Diversity of root-associated bacteria associated with field grown canola (*Brassica napus* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.). **FEMS Microbiol. Ecol.**, v. 26, p. 43–50, 1998.

GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V.; PAKNIKAR, K. M. Perspectives for nanobiotechnology enabled protection and nutrition of plants. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 792-803, 2011.

GLICK, B. R. **Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications.** Scientifica, 2012.

GOND, S. K., TORRES, M. S., BERGEN, M. S., HELSEL, Z., WHITE, J. F. JR. Induction of salt tolerance and upregulation of aquaporin genes in tropical corn by rhizobacterium *Pantoea agglomerans*. **Lett. App. Microbiol.**, v. 60, p. 392–399, 2015.

GORDIENKO, A. S., KURDISH, I. K. (2007). Surface electrical properties of *Bacillus subtilis* cells and the effect of interaction with silicon dioxide particles. **Biophysics**, v. 52, p. 217–219, 2007.

HALLMANN, J., QUADT-HALLMANN, A., MAHAFFEE, W. F., KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 895–914, 1997.

HAMEED, A., SHEIKH, M. A., JAMIL, A., BASRA, S. M. A. Seed priming with sodium silicate enhances seed germination and seedling growth in wheat (*Triticum aestivum* L.) under water deficit stress induced by polyethylene glycol. **Pak. J. Life Soc. Sci.**, v. 11, p. 19–24, 2013.

HAMMER, Ø., HARPER, D. A., & RYAN, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Paleontologia electronica**, v. 4, p. 9, 2001.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 20, p. 8859-8873, 2013.

HIROTA R, HATA Y, IKEDA T, ISHIDA T, KURODA A. The silicon layer supports acid resistance of *Bacillus cereus* spores. **J. Bacteriol.**, p. 111–116, 2010.

HOM, C., LU, J., TAMANOI, F. Silica nanoparticles as a delivery system for nucleic acid-based reagents. **J. of Mat. Chem.**, v. 19, p. 6308-6316, 2009.

HRISTOV, A. N., OH FIRKINS, J. L., DIJKSTRA, J., KEBREAB, E., WAGHORN, G., TRICARICO, J. M. Special Topics - mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 5045-5069, 2013.

JEELANI, P. G., MULAY, P., VENKAT, R., AND RAMALINGAM, C. Multifaceted application of silica nanoparticles. A Review. **Silicon**, v. 12, p. 1337–1354, 2020.

KARUNAKARAN, G., SURIYAPRABHA, R., MANIVASAKAN, P., YUVAKKUMAR, R., RAJENDRAN, V., PRABU, P., KANNAN, N. Effect of nanosilica and silicon sources on plant growth promoting rhizobacteria, soil nutrients and maize seed germination. **IET Nanobiotechnol.**, v. 7, p. 70–77, 2012.

KOUL, O. **Nano-biopesticides today and future perspectives**. Jalandhar: Academic Press., 2019. 100 p.

KAUSHAL, M., WANI, S.P. Rhizobacterial-plant interactions: strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. **Agric. Ecosyst. Environ.**, v. 231, p. 68–78, 2016.

KOUR, D., RANA, K. L., YADAV, A. N., YADAV, N., KUMAR, M., KUMAR, V., ... & SAXENA, A. K. Microbial biofertilizers: Bioresources and eco-friendly technologies for agricultural and environmental sustainability. **Bioc. and Agri. Biotech.**, v. 23, p. 101487, 2020.

KUMARI, B., SINGH, D. P. A review on multifaceted application of nanoparticles in the field of bioremediation of petroleum hydrocarbons. **Ecol. Eng.**, v. 97, p. 98–105, 2016.

LIANG, Y., GAO, Y., WANG, W., DONG, H., TANG, R., YANG, J., NIU, J., ZHOU, Z., JIANG, N., CAO, Y. Fabrication of smart stimuli-responsive mesoporous organosilica nano-vehicles for targeted pesticide delivery. **J. Hazard. Mater.**, v. 389, p. 122075, 2020.

JIAN, F.M., TAMAI, K., YAMAJI, N., MITANI, N., KONISHI, S., KATSUHARA, M., ISHIGURO, M., MURATA, Y., YANO, M. A silicon transporter in rice. **Nature**, v. 440, 2006, p. 688-691, 2006.

MA, J. F.: 'Role of silicon in enhancing the resistance of plants to biotic and abiotic stresses', **Soil Sci. Plant Nutr.**, v. 50, p. 11–18, 2004.

MALUSÀ, E.; VASSILEV, N. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 98, n.15, p. 6599–6607, 2014.

MARQUEZ-SANTACRUZ, H. A., HERNANDEZ-LEON, R., OROZCO-MOSQUEDA, M. C., VELAZQUEZ-SEPULVEDA, I., SANTOYO, G. Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. **Gen. Mol. Res.**, v. 9, p. 2372–2380, 2010.

MA, X., MAU, M., SHARBEL, T. F. Genome editing for global food security. **Trends in biotechnology**, v. 36, p. 123-127, 2018.

METICULOUS MARKET RESEARCH Pvt. Ltd. Bioestimulants market - global opportunity analysis and industry forecasts to 2022. **Research and Markets**, 226 p, 2017.

MOHAMMADI, K., SOHRABI, Y. Bacterial biofertilizers for sustainable crop production: a review. **ARNP J. Agric. Biol. Sci.**, v. 7, p. 307-316, 2012.

MORAES, A. C. P.; RIBEIRO, L. S.; CAMARGO, E. R.; LACAVA, P. T. The potential of nanomaterials associated with plant growth-promoting bacteria in agriculture. **3 Biotech**, v. 11, n. 7, p. 1-17, 2021.

MORRISON, D. F. **Multivariate statistical methods**. 2.ed. Singapore: McGraw, Hill. 1976, 415 p.

NAMAGANDA, M., KREKLING, T., LYE, K. A. Leaf anatomical characteristics of Ugandan species of *Festuca* L. (*Poaceae*). **South African Journal of Botany**, v. 75, p. 52-59, 2009.

NAMASIVAYAM, S. K. R., SAIKIA, S. L., BHARANI, R. A. Evaluation of persistence and plant growth promoting effect of bioencapsulated formulation of suitable bacterial bio-fertilizers. **Biosci. Biotech. Res. Asia**, v. 11, p. 407-415, 2014.

NEETHIRAJAN, S., GORDON, R., WANG, L. (2009). Potential of silica bodies (phytoliths) for nanotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 27, p. 461-467, 2009.

PALMQVIST, N. G. M., BEJAI, S., MEIJER, J., SEISENBAEVA, G. A., KESSLER, V. G. Nano titania aided clustering and adhesion of beneficial bacteria to plant roots to enhance crop growth and stress management. **Sci. Rep.**, v. 5, 10146, 2015.

PATLE, P. N., NAVNAGE, N. P., RAMTEKE, P. R. Endophytes in plant system: roles in growth promotion, mechanism and their potentiality in achieving agriculture sustainability. **Int. J. Chem. Stud.**, v. 6, p. 270-274, 2018.

POUR, M. M., SABERI-RISEH, R., MOHAMMADINEJAD, R., AND HOSSEINI, A. Nano-encapsulation of plant growth-promoting rhizobacteria and their metabolites using alginate-silica nanoparticles and carbon nanotube improves UCB1 pistachio micropropagation. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 29, p. 1096–1103, 2019.

RANGARAJ, S., GOPALU, K., RATHINAM, Y., PERIASAMY, P., VENKATACHALAM, R., NARAYANASAMY, K. Effect of silica nanoparticles on microbial biomass and silica availability in maize rhizosphere. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 61, p. 668–675, 2014.

RAO, K. S., EL-HAMI, K., KODAKI, T., MATSUSHIGE, K., MAKINO, K. A novel method for synthesis of silica nanoparticles. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 289, p. 125–131, 2005.

REDMAN, R. S., SHEEHAN, K. B., STOUT, R. G., RODRIGUEZ, R. J., HENSON, J. M. Thermo tolerance generated by plant/fungal symbiosis. **Science**, v. 298, p. 1581, 2002.

REINHOLD-HUREK, B., HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current opinion in plant biology**, v. 14, p. 435-443, 2011.

RUDEL, T. K., PAUL, B., WHITE, D., RAO, I. M., VAN DER HOEK, R., CASTRO, A., BOVAL, M., LERNER, A., SCHNEIDER, L., PETERS, M. Livestock Plus: Forages, sustainable intensification, and food security in the tropics. **Ambio**, v. 44, p. 1-9, 2015.

RUSSELL, E. W. **Soil Conditions and Plant Growth**. LWW, v. 71, n. 03, p. 247, 1951.

SAHU, P. K., BRAHMAPRAKASH, G. P. Formulations of biofertilizers—approaches and advances. In: **Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity**. Springer, New Delhi, p. 179-198, 2016.

SANTOYO, G., MORENO-HAGELSIEB, G., DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M., GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiol. Res.**, v. 183, p. 92–99, 2016.

SANTOYO, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C.; GOVINDAPPA, M. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, p. 855-872, 2012.

SENTHILKUMAR, M.; ANANDHAM, R.; MADHAIYAN, M.; VENKATESWARAN, V.; SA, T. Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production. In: **Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems**. Springer, p. 61–96, 2011.

SHUKLA, S. K., KUMAR, R., MISHRA, R. K., PANDEY, A., PATHAK, A., ZAIDI, M. G. H., ... & DIKSHIT, A. Prediction and validation of gold nanoparticles (GNPs) on plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a step toward development of nano-biofertilizers. **Nanotechnology Reviews**, v. 4, p. 439-448, 2015.

SIDDIQUI, M. H., AL-WHAIBI, M. H. Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* seeds Mill.). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, 2014, p. 13-17.

STÖBER, W., FINK, A., BOHN, E. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. **Journal of colloid and interface science**, v. 26, p. 62-69, 1968.

STRAPASSON, E., VENCOVSKY, R., BATISTA, L. A. R. Seleção de descritores na caracterização de germoplasma de *Paspalum* sp. por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p. 373-381, 2000.

STURZ, A. V., CHRISTIE, B. R., MATHESON, B. G., NOWAK, J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. **Biol. Fertil. Soils**, v. 25, p. 13–19, 1997.

TIMMUSK, S., BEHERS, L., MUTHONY, J., MURAYA, A., ARONSSON, A. Perspectives and challenges for microbial application for crop improvement. **Front. Plant Sci.**, v. 8, p. 49, 2017.

THOMPSON, J. P., SKERMAN, V. B. D. 1981. *Azorhizophilus paspali*, comb. nov. invalidation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 31, p. 215–218, 1981.

TUBANA, B. S., BABU, T., DATNOFF, L. E. A review of silicon in soils and plants and its role in US agriculture: history and future perspectives. **Soil Sci.**, v. 181, p. 393–411, 2016.

VACULÍK, M., LUX, A., LUXOVÁ, M., TANIMOTO, E., LICHTSCHEIDL, I. Silicon mitigates cadmium inhibitory effects in young maize plants. **Environ. Exp. Bot.**, v. 67, p. 2–58, 2009.

VANCE, C. P. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable sources. **Plant Physiol.**, v. 127, p. 390–397, 2001.

VANDERGHEYNST, J. et al. Water-in-oil emulsions that improve the storage and delivery of the biolarvacide *Lagenidium giganteum*. **BioControl**, v. 52, n. 2, p. 207–229, 2007.

WAINWRIGHT, M., AL-WAJEEH, K., GRAYSTON, S. J. Effect of silicic acid and other silicon compounds on fungal growth in oligotrophic and nutrient-rich media. **Mycological Research**, v. 101, p. 933–938, 1997.

WANG, S., LIU, P., CHEN, D., YIN, L., LI, H., DENG, X. Silicon enhanced salt tolerance by improving the root water uptake and decreasing the ion toxicity in cucumber. **Front Plant Sci.** v. 6, p. 759, 2015.

WHITE, J. F., CHEN, Q., TORRES, M. S., MATTERA, R., IRIZARRY, I., TADYCH, M., BERGEN, M. Collaboration between grass seedlings and rhizobacteria to scavenge organic nitrogen in soils. **AoB Plants**, v. 7, plu093, 2015.

WHITE, J. F., KINGSLEY, K. I., KOWALSKI, K.P., IRIZARRY, I., MICCI, A., SOARES, M. A., BERGEN, M. S. Disease protection and allelopathic interactions of seed transmitted endophytic pseudomonads of invasive seed grass (*Phragmites australis*). **Plant Soil**, v. 422, p. 195–208, 2018a.

WHITE, J. F., KINGSLEY, K. L., VERMA, S. K., KOWALSKI, K. P. Rhizophagy cycle: An oxidative process in plants for nutrient extraction from symbiotic microbes. **Microorganisms**, v. 6, p. 95, 2018b.

XU, C., LEI, C., YU, C. Mesoporous Silica Nanoparticles for Protein Protection and Delivery. **Frontiers in Chem.**, v. 7, p. 290, 2019.

YIN, L., WANG, S., LI, J., TANAKA, K., OKA, M., 2013. Application of silicon improves salt tolerance through ameliorating osmotic and ionic stresses in the seedling of *Sorghum bicolor*. **Acta Physiol. Plant.**, v. 35, p. 3099–3107, 2013.

YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H., CHUN, J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 67, 2017, p. 1613, 2017.

ZAND, A. D., MIKAEILI TABRIZI, A., VAEZI HEIR, A. Application of titanium dioxide nanoparticles to promote phytoremediation of Cd-polluted soil: contribution of PGPR inoculation. **Bioremediat. J.**, v. 24, p. 171–189, 2020.

ZHU, Y.-X., XU, X.-B., HU, Y.-H., HAN, W.-H., YIN, J.-L., LI, H.-L., GONG, H.-J. Silicon improves salt tolerance by increasing root water uptake in *Cucumis sativus* L. **Plant Cell Rep.** 34, p. 1629–1646, 2015.