

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ANA CAROLINA VASCONCELOS FERNANDES

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS
ASSOCIADAS A *Paspalum vaginatum* Swartz COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO E AGRÍCOLA PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL E BIOCONTROLE

SÃO CARLOS

2022

ANA CAROLINA VASCONCELOS FERNANDES

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS
ASSOCIADAS A *Paspalum vaginatum* Swartz COM POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO E AGRÍCOLA PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO
VEGETAL E BIOCONTROLE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia
pela Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

SÃO CARLOS

2022

Aos meus pais, Douglas e Márcia, pelo constante incentivo e investimento na minha educação. Mas, principalmente, por me apoiarem.

À minha irmã Gabriela, pelo apoio, amor e amizade.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Márcia e Douglas, pelo amor incondicional, pelos conselhos, por se fazerem presente mesmo estando longe, por serem meu alicerce e por sempre acreditarem no meu potencial, mesmo quando eu tive dúvidas. Jamais serei suficientemente grata!

À minha irmã, Gabriela, pelo amor incondicional, compreensão, longas horas de conversas, conselhos e apoio. Jamais serei suficientemente grata!

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava, por me receber em seu laboratório, por toda orientação, suporte e amizade.

Às minhas amigas Beatriz Gusson, Iara Ciancaglini, Ivana Gabrielle, Lais Caroline Rissatto e Sofia Dallastra Pedroso, que me acompanharam pelos anos de graduação, pela ajuda durante os estudos, os almoços e jantares com direito a muita risada e companheirismo.

Aos meus parceiros de laboratório, Ms. Paulo Henrique Gomes Lisboa e Dr. Paulo Henrique Marques de Andrade, que me ensinaram técnicas vitais para o meu desempenho laboratorial, sempre me ajudaram quando tive dúvidas e pela amizade.

Ao Dr. Wilson Malagó Júnior e Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna, que me ensinaram e ajudaram a desenvolver toda a etapa de Biologia Molecular no presente trabalho.

À Dra. Alessandra Fávero, por me receber em seu time, muito solícita, atenciosa e encorajadora.

À Prof. Dra. Fernanda de Freitas Anibal, pela amizade ímpar e apoio.

À Dra. Sônia Regina Nogueira Stephan pela parceria e por ceder a cepa de *Bipolaris* sp.

À minha família, pelo carinho e apoio. Especialmente à minha tia e madrinha Tânia, pelo incentivo, apoio e carinho. E ao meu tio Herbert, pelo constante incentivo na minha carreira como Biotecnologista.

Aos meus avós Mário e Eurípedes que me receberam em sua casa e fizeram parte de uma etapa fundamental da minha educação, obrigada por tanto!

À Embrapa Pecuária Sudeste, por fornecer o material necessário advindo do Banco de Germoplasma de *Paspalum* e estrutura para realização dos experimentos.

Ao Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da UFSCar, pelo fornecimento das condições necessárias para que a pesquisa acontecesse.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa nº 2020/11315-6.

RESUMO

Espécies de *Paspalum* são importantes constituintes nas pastagens nativas de regiões tropicais e subtropicais das Américas. *Paspalum vaginatum* é uma gramínea nativa de áreas litorâneas no Brasil e é amplamente utilizado em campos de golfe nos Estados Unidos devido sua robustez e tolerância a estresses abióticos como a seca, encharcamento e salinidade. Bactérias (endofíticas) localizadas no interior dessa espécie vegetal podem ser parcialmente responsáveis pela tolerância a essas condições extremas. O uso de bactérias capazes de promover o crescimento vegetal como inoculantes é uma estratégia ecologicamente correta para substituir os fertilizantes químicos e melhorar a produção vegetal. Este estudo objetivou isolar e avaliar o potencial de solubilização de fosfato inorgânico (SFI), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido 3-indolacético (AIA) e potencial antagonico contra fitopatógenos de bactérias endofíticas associadas a *P. vaginatum*. As bactérias foram isoladas de raízes e folhas de *P. vaginatum* e testadas *in vitro* para FBN, SFI, produção de AIA e antagonismo contra o fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp. Entre os 72 isolados bacterianos testados, 42 fixaram nitrogênio (58,3%), 28 solubilizam fosfato inorgânico (38,9%), 70 produziram AIA (97,2%), mesmo que em baixa quantidade, e 12 apresentaram potencial antagonico contra *Bipolaris* sp. (16,7%). As 24 bactérias com melhores resultados nos testes foram identificadas por sequenciamento do gene 16S rDNA. Os gêneros identificados foram *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. e *Streptomyces* sp.

Palavras-chave: Ácido 3-indolacético; Bactérias endofíticas. Controle biológico. Banco Ativo de Germoplasma (BAG). Fixação biológica de nitrogênio. *Paspalum*. Promoção de crescimento vegetal. Solubilização de fosfato inorgânico.

ABSTRACT

Paspalum species are important constituents in native pastures of tropical and subtropical regions of the Americas. *Paspalum vaginatum* is a grass native to coastal areas in Brazil and is widely used on golf courses in the United States due to its robustness and tolerance to abiotic stresses such as drought, waterlogging and salinity. Bacteria (endophytic) located within this species may be partially responsible for tolerance to these extreme conditions. The use of bacteria capable of promoting plant growth as inoculants is an ecologically correct strategy to replace chemical fertilizers and improve plant production. This study aimed to isolate and evaluate the potential for solubilization of inorganic phosphate (ISF), biological nitrogen fixation (NFB), production of 3-indoleacetic acid (IAA) and antagonistic potential of endophytic bacteria associated with *P. vaginatum*. The bacteria were isolated from roots and leaves of *P. vaginatum* and tested *in vitro* for NFB, ISF, IAA production and antagonism against the phytopathogenic fungi *Bipolaris* sp. Among the 72 bacterial isolates tested, 42 fixed nitrogen (58,3%), 28 solubilized inorganic phosphate (38.9%), 70 produced AIA (97.2%), even in low amounts, and 12 showed antagonistic potential against *Bipolaris* sp. (16.7%). The 24 bacteria with the best results in the tests were identified by sequencing the 16S rDNA. The genera *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. and *Streptomyces* sp. were identified by the 16S rDNA gene sequencing of the 24 selected isolates.

Keywords: 3-indole-acetic acid. Biological control. Biological nitrogen fixation. Endophytic bacteria. Germplasm Active Bank of *Paspalum*. Inorganic phosphate solubilization. *Paspalum*. Plant growth promotion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lígula e ponta da folha de <i>Paspalum vaginatum</i>	14
Figura 2 - Acesso BGP 114 de <i>Paspalum vaginatum</i> no BAG da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.	20
Figura 3 - Indivíduo de <i>Paspalum vaginatum</i> coletado aleatoriamente dentro da parcela do acesso BGP 114 no BAG <i>Paspalum</i>	21
Figura 4 - Amostras de raiz e folha de 10 indivíduos de <i>Paspalum vaginatum</i>	22
Figura 5 - Ilustração da desinfecção dos tecidos vegetais, obtenção, purificação e armazenamento de bactérias endofíticas de <i>Paspalum vaginatum</i>	22
Figura 6 - Representação de uma placa de Petri com a metodologia para triagem de antagonismo <i>in vitro</i> de bactérias endofíticas associadas <i>Paspalum vaginatum</i> , em relação ao fungo fitopatogênico <i>Bipolaris</i> sp.	25
Figura 7 - Representação de uma placa de Petri com a técnica de pareamento direto <i>in vitro</i> para avaliação do potencial antagônico dos isolados endofíticos associados a <i>Paspalum vaginatum</i> , em relação ao fungo <i>Bipolaris</i> sp.	26
Figura 8 – Representação esquemática do ensaio de pareamento direto <i>in vitro</i> utilizando duas placas de Petri, com os diâmetros utilizados para determinação da %inibição dos isolados endofíticos associados a <i>Paspalum vaginatum</i> , em relação ao fungo <i>Bipolaris</i> sp. A) Placa do tratamento em que $D_t =$ Diâmetro micelial no Tratamento; B) Placa do controle em que $D_c =$ Diâmetro micelial no Controle.	27
Figura 9 - Gel de 1,5% de agarose para confirmação da amplificação dos fragmentos de 752pb do gene 16S rDNA. Os números das amostras e os padrões de peso molecular estão indicados em vermelho.....	30
Figura 10 - Diagrama de Venn agrupando bactérias endofíticas isoladas de <i>P. vaginatum</i> com resultado positivo para os testes de Fixação Biológica de Nitrogênio (azul), Solubilização de Fosfato Inorgânico (vermelho) e produção de ácido 3-indolacético (amarelo).....	34
Figura 11 - À esquerda, fixação de nitrogênio observada pela formação da película em meio livre de nitrogênio semi-sólido. À direita, controle em que não há inoculação de algum isolado.....	36
Figura 12 - Placa de petri contendo fosfato de cálcio insolúvel, na qual foram inoculadas quatro bactérias. Os halos indicadores de solubilização (D_h) e do diâmetro da colônia (D_c) são representados na parte superior da placa e formados por isolado bacteriano positivo. Na	

parte inferior da placa, é representado resultado negativo pela ausência da formação de halo.

.....37

Figura 13 - Quantificação de AIA, após a adição do reagente de Salkowski. A exibição das colorações mais intensas reflete a maior concentração de AIA, enquanto colorações mais transparentes exibem concentrações mais baixas. A primeira cubeta é referente ao controle, ou seja, não há produção de AIA.....39

Figura 14 – Exemplos dos resultados dos ensaios de antagonismo *in vitro* entre o fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp. e bactérias endofíticas isoladas de *Paspalum vaginatum*. A) Controle – fungo fitopatogênico crescendo na ausência de bactérias e B) Tratamento – pareamento direto em que o fungo fitopatogênico cresce na presença das bactérias endofíticas. 1) *Bacillus* sp.; 2) *Bacillus* sp.; 3) *Streptomyces* sp.....43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Frequência de isolamento de bactérias endofíticas associadas a folha e raiz de <i>Paspalum vaginatum</i>	29
Gráfico 2 - Fixação biológica de nitrogênio de bactérias isoladas de folha e raiz de <i>Paspalum vaginatum</i>	35
Gráfico 3 – Quantidade de bactérias isoladas de <i>Paspalum vaginatum</i> que fazem solubilização de fosfato inorgânico.	38
Gráfico 4 - Dispersão dos isolados endofíticos associados a <i>Paspalum vaginatum</i> em relação à produção de AIA.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Abundância bacteriana de folha e raiz de <i>Paspalum vaginatum</i>	28
Tabela 2 - Identificação dos isolados bacterianos endofíticos associados a <i>Paspalum vaginatum</i>	31
Tabela 3 - Resultados referentes aos testes de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, produção de AIA e antagonismo ao fungo <i>Bipolaris</i> sp. para os isolados endofíticos associados a <i>Paspalum vaginatum</i> (“+” = positivo, “-” = negativo; NI = não identificado).....	34
Tabela 4 - Porcentagem de inibição dos isolados bacterianos endofíticos de <i>P. vaginatum</i> referente ao fitopatógeno <i>Bipolaris</i> sp.....	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	<i>Paspalum vaginatum</i> Swartz.....	13
2.2	Bactérias endofíticas	14
2.3	Fixação biológica de nitrogênio.....	15
2.4	Solubilização de fosfato inorgânico	17
2.5	Produção de ácido 3-indolacético	18
2.6	Controle biológico e <i>Bipolaris</i> sp.....	18
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	Objetivo geral	19
3.2	Objetivos específicos	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	Coleta do material vegetal	20
4.2	Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados bacterianos endofíticos....	21
4.3	Contagem e frequência de isolamento.....	23
4.4	Experimentos de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i>	23
4.4.1	Fixação biológica de nitrogênio (FBN).....	23
4.4.2	Solubilização de fosfato inorgânico (SFI)	24
4.4.3	Produção de ácido 3-indolacético (AIA)	24
4.4.4	Atividade antagonista a <i>Bipolaris</i> sp. e pareamento direto <i>in vitro</i>	25
4.5	Identificação taxonômica dos isolados bacterianos.....	27
4.5.1	Extração de DNA bacteriano	27
4.5.2	Amplificação parcial do gene 16S do DNA ribossomal	27
4.5.3	Purificação do DNA amplificado, sequenciamento, edição e análise das sequências.....	28
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	28
5.1	Abundância bacteriana e frequência de isolamento	28
5.2	Identificação taxonômica dos isolados bacterianos.....	29
5.3	Potencial de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i>	32
5.3.1	Fixação biológica de nitrogênio.....	35
5.3.2	Solubilização de fosfato inorgânico	37
5.3.3	Produção de ácido 3-indolacético	39
5.3.4	Atividade antagonista a <i>Bipolaris</i> sp.	41
6	CONCLUSÃO	44
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	44
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

A projeção populacional mundial para 2050 é de 9,7 bilhões de pessoas (FAO, 2018), para suprir a necessidade do aumento populacional a produção agrícola deve aumentar 60% e a pecuária 37%, até o mesmo ano (FAO, 2018). O contínuo crescimento na produção de alimentos culmina no aumento do uso de agroquímicos e fertilizantes químicos, ambos ambientalmente prejudiciais. Fertilizantes fosfatados e nitrogenados, bem como agroquímicos, podem causar sérios impactos ambientais, como lixiviação, poluição do ar, contaminação de lençóis freáticos e alteração da biodiversidade (RANI *et al.*, 2021; CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Por conseguinte, o desenvolvimento de alternativas sustentáveis de práticas agrícolas que sustentem o aumento populacional demonstra-se fundamental.

Microrganismos associados às plantas, como bactérias endofíticas, podem auxiliar no crescimento vegetal direta ou indiretamente, por meio de mecanismos como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, produção de fitormônios (como o ácido 3-indolacético) e ação antagonista a fitopatógenos. Diante desse contexto, bactérias endofíticas podem ser usadas como inoculantes, como alternativa sustentável no manejo agrícola (AFZAL *et al.*, 2019; AZEVEDO *et al.*, 2018; SHAH *et al.*, 2021; ZICCA *et al.*, 2020).

Pesquisas têm sido desenvolvidas em diversos tipos de culturas para identificar potenciais bactérias promotoras de crescimento vegetal, sua influência no desenvolvimento das plantas e possível uso comercial, como em milho (BATISTELA; KOZUSNY-ANDREANI; ANDREANI JUNIOR 2018; AQUINO *et al.*, 2019; MANZOOR; ABBASI; SULTAN, 2017), cana de açúcar (MUANGTHONG; YOUPENSUK; RERKASEM, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016; ANTUNES *et al.*, 2022; SIMÕES *et al.*, 2019), arroz (JI; GURURANI; CHUN, 2014; VERMA *et al.*, 2017) e soja (WAHYUDI *et al.*, 2011; ZHAO; XU; LAI 2018).

Espécies de *Paspalum* são importantes constituintes nas pastagens brasileiras (AGUIAR, 2014). *Paspalum vaginatum* Swartz é nativo de áreas litorâneas no Brasil e é amplamente utilizado em campos de golfe nos Estados Unidos devido sua robustez e tolerância a estresses abióticos como a seca, encharcamento e salinidade (DUNCAN; CARROW, 2000; LONARD; JUDD; STALTER, 2015). Ademais, bactérias localizadas no interior dos tecidos dessa espécie (endofíticas) podem ser parcialmente responsáveis pela tolerância a essas condições de estresse (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015).

Diante do exposto, bactérias endofíticas associadas a *Paspalum vaginatum* Swartz com potencial para promoção do crescimento vegetal via solubilização de fosfato inorgânico,

fixação biológica de nitrogênio, produção de ácido 3-indolacético e ação antagonista a fitopatógenos podem aumentar a produtividade de culturas desse gênero, bem como auxiliar na diminuição do uso de insumos sintéticos, contribuindo para o aumento de alternativas sustentáveis de práticas agrícolas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Paspalum vaginatum* Swartz

Paspalum é um gênero que contém mais de 400 espécies pertencentes à família Poaceae e subfamília Panicoideae que incluem um grupo diversificado de gramíneas encontradas, em sua maioria, em latitudes tropicais e subtropicais (CHASE, 1929; ZULOAGA & MORRONE, 2005).

Dentre tais espécies, o *Paspalum vaginatum* Swartz (também conhecido como seashore *Paspalum*) é uma planta litorânea perene, rizomatosa (apresenta rizoma, caule que cresce horizontalmente abaixo do solo), estolonífera (contém estolões, colmos rasteiros com enraizamento nos nós) e heliófita (necessita de alta exposição solar) (CHASE, 1929; ZULOAGA & MORRONE, 2005; DUNCAN; CARROW, 2000).

Paspalum vaginatum Swartz é nativo da América e foi disperso no mundo por meio de navios de escravos e transportado por aves e correntes marítimas. Ele é encontrado em áreas litorâneas, pântanos salobros, margens de manguezais, habitats adjacentes a riachos e locais sazonalmente inundados (DUNCAN; CARROW, 2000; LONARD; JUDD; STALTER, 2015).

Tal gramínea é resistente a condições de seca e também pode suportar longos períodos de inundação e condições de hipersalinidade. A espécie é considerada halófito e tolera a salinidade por meio da regulação da quantidade de sal na parte aérea ao mesmo tempo que retém água suficiente para ajustes osmóticos. Um mecanismo auxilia nesse processo através do transporte do excesso de sal de folhas maduras para folhas senescentes (LONARD; JUDD; STALTER, 2015).

O *Paspalum vaginatum* chega a cerca de 65 cm de altura, as lâminas foliares têm de 4 a 19 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro e possuem alguns pelos nas margens próximas às lígulas que são membranosas e têm 0,5 a 2mm de comprimento (Figura 1). As bainhas são glabras (não apresentam pelo), sobrepostas e achatadas (CHASE, 1929; ZULOAGA & MORRONE, 2005; LONARD; JUDD; STALTER, 2015).

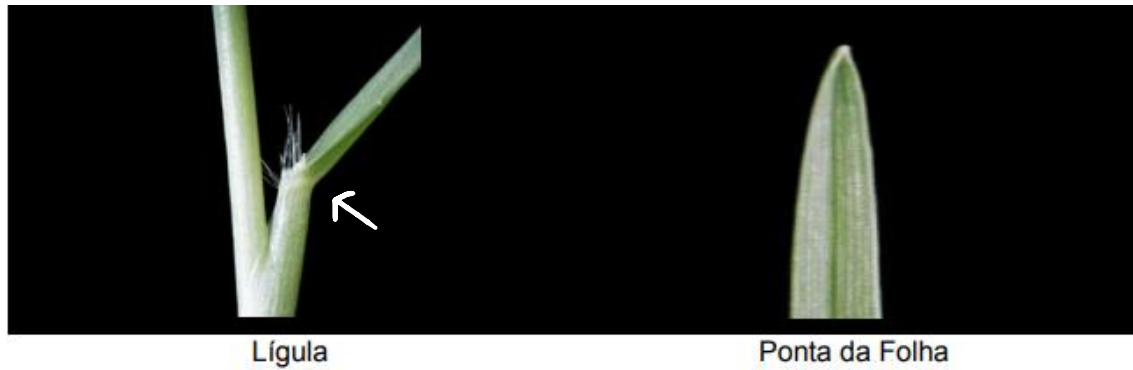


Figura 1 - Lígula e ponta da folha de *Paspalum vaginatum*.
Fonte: GURGEL, 2003.

Paspalum vaginatum é amplamente utilizado em campos de golfe, principalmente em regiões litorâneas dos Estados Unidos da América, devido sua robustez. Há também estudos de uso em telhado verde, visto sua possibilidade de irrigação com água salobra, águas residuais (água cinza) ou até água reciclada de chuva (NTOULAS; VARSAMOS, 2021). Tal gramínea apresentou potencial no uso de fitoremediação de sedimentos contaminados com poluentes orgânicos (hidrocarbonetos de petróleo) e inorgânicos (metais pesados) (BIANCHI *et al.*, 2011; HUE *et al.*, 2002). Além disso, *P. vaginatum* pode ser utilizado no combate e prevenção de erosão (BEGAM *et al.*, 2017). Pesquisas relacionadas à microbiota associada a essa espécie mostram-se fundamentais tanto sobre a promoção de crescimento vegetal, quanto no combate a fungos fitopatogênicos e no conhecimento da biodiversidade associada ao *P. vaginatum*.

O Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*) pertencente à Embrapa Pecuária Sudeste e detém a segunda maior coleção mundial de *Paspalum*, composto por mais de 450 acessos referentes a cerca de 60 espécies. A finalidade do acervo é possibilitar o enriquecimento, caracterização, conservação e disponibilização dos recursos genéticos de gramíneas.

2.2 Bactérias endofíticas

Bactérias endofíticas colonizam o interior dos tecidos vegetais (são isoladas de tecidos da planta esterilizados na superfície) e não causam danos às suas plantas hospedeiras (AFZAL *et al.*, 2019; AZEVEDO *et al.*, 2018). Bactérias endofíticas são consideradas um subconjunto das bactérias rizosféricas, já que foram capazes de estabelecer uma população rizosférica e posteriormente adquiriram a capacidade de invadir as raízes das plantas. Uma vez dentro das

raízes, as bactérias endofíticas podem colonizar tecidos adjacentes (AFZAL *et al.*, 2019; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010).

Diversas condições podem influenciar na diversidade da comunidade bacteriana endofítica de um vegetal, como a espécie e idade da planta hospedeira, o tipo de solo, a condição climática, condições do solo e estresse (HALLMANN; BERG, 2006; DING; MELCHER, 2016; ZIHONG *et al.* 1999; PEÑUELAS *et al.*, 2012; SICILIANO *et al.*, 2001). Os gêneros de endófitos comumente isolados de espécies vegetais são: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* (CHATURVEDI; SINGH, 2016; HALLMANN *et al.*, 1997).

As bactérias endofíticas podem proporcionar diversos efeitos benéficos para o vegetal, seja direta ou indiretamente (AFZAL *et al.*, 2019). O primeiro pode ser exemplificado pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de hormônios vegetais, como o ácido 3-indolacético, auxiliando as plantas na obtenção de nutrientes e na melhora do seu crescimento em condições usuais ou de estresse (SHAH *et al.*, 2021; AZEVEDO *et al.*, 2018). Já o segundo se dá quando tais endófitos diminuem ou impedem efeitos deletérios de algum organismo fitopatogênico pela produção de substâncias tais como antibióticos, toxinas entomopatogênicas e enzimas líticas (ZICCA *et al.*, 2020; AFZAL *et al.*, 2019).

O uso de tais microrganismos como inoculantes é pautado em seus efeitos benéficos na germinação das sementes e promoção crescimento vegetal, o que corrobora no potencial de substituição de fertilizantes químicos objetivando um plantio e cultura sustentável (AZEVEDO *et al.*, 2018). As bactérias endofíticas também apresentam potencial quanto à produção de enzimas que podem ser purificadas para uso em diversas indústrias, como a alimentícia, farmacêutica, têxtil, celulose e papel e processamento de couro (UNGARATTI; GOMES; VIEIRA, 2020; LI *et al.*, 2012; PRAYOGO *et al.*, 2020).

Um estudo da Universidade de Indiana, nos Estados Unidos da América, ao utilizar um compilado em escala global de $5,6 \cdot 10^6$ espécies (animais, plantas e microrganismos) indicou que a terra abriga mais de 1 trilhão de espécies de microrganismos. No entanto, apenas uma pequena porcentagem desses organismos já foi descoberta. A demasia destes representam um potencial biotecnológico desconhecido e imensurável (LOCEY; LENNON, 2016).

2.3 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é um dos quatro elementos químicos com maior porcentagem de átomos que compõe os seres vivos, isso porque ele está presente em diversos aminoácidos, proteínas e nos ácidos nucleicos (RNA e DNA), nas plantas está presente também na clorofila (NELSON;

DA VEIGA; TERMIGNOMI, 2014), tornando-se o segundo principal fator limitante no crescimento de plantas (NAG; SHRITI; DAS, 2020; TAIZ *et al.*, 2015^a). No entanto, grande parte do nitrogênio não está disponível para as plantas, mas sim na sua forma gasosa N_2 quimicamente inerte, característica advinda de sua tripla ligação química (cerca de 78% da composição do ar atmosférico é composto por nitrogênio) (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

O nitrogênio pode ser encontrado nos solos em sua forma orgânica (como componentes da matéria orgânica do solo) e inorgânica (como na forma de amônia (NH_4^+) nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e óxido nitroso (N_2O) (CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Apesar de muito abundante, o nitrogênio é comumente limitante para o crescimento vegetal pois as plantas são capazes de utilizar o nitrogênio somente na forma de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-) (CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992).

Dentre os diversos processos do ciclo do nitrogênio, destaca-se a fixação deste, a qual pode ser realizada por microrganismos na denominada fixação biológica de nitrogênio (FBN), pode também ser intitulada fixação não biológica (como no exemplo de descargas elétricas na atmosfera) ou pode ser realizada pela indústria, (como na produção de fertilizantes). Na natureza há microrganismos denominados diazotróficos (ou fixadores de nitrogênio) que reduzem o nitrogênio gasoso (N_2) em amônia (NH_3) ou íon amônio (NH_4^+) que se depositam no solo ou em solução. O complexo enzimático da nitrogenase, presente em bactérias diazotróficas, é responsável por catalisar essa reação (HOWARD; REES, 1996; EADY; POSTGATE, 1974). Os genes conhecidos coletivamente como genes *nif* codificam a síntese do aparato enzimático da nitrogenase (GUSSIN; RONSON; AUSUBEL, 1986).

Na agricultura, comumente são utilizados fertilizantes nitrogenados decorrente da escassez de nitrogênio disponível no solo. As principais formas básicas do nitrogênio nos fertilizantes são a amida, o amônio e o nitrato. Sendo os dois primeiros convertidos em nitrato pouco tempo depois de sua adição ao solo. No entanto, devido à estabilidade do N_2 , o investimento energético em sua transformação em insumos agrícolas é alto bem como o custo nos respectivos processos industriais (TAIZ *et al.*, 2015^b; CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Ademais, o uso de fertilizantes pode gerar problemas ambientais pela lixiviação do nitrato (o íon nitrato tende a permanecer em solução no solo, o qual fica propenso ao processo de lixiviação e consequente contaminação de águas subterrâneas), sublimação da amônia e pela grande quantidade de produção de CO_2 (gás de efeito estufa) na fabricação do fertilizante. Tais características indicam a necessidade de formas alternativas para produção de insumos nitrogenados (ZHANG, 2017).

A FBN representa uma significativa estratégia para diminuir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos, e é capaz de suprir parcialmente a demanda de nitrogênio das culturas, reduzindo o uso de tais produtos químicos e, dessa forma, contribuindo para a redução de custos e poluição ambiental (MOREIRA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2018).

2.4 Solubilização de fosfato inorgânico

O fósforo (P) é um macronutriente abundante nos solos tropicais e se faz presente em moléculas de DNA e RNA, bem como participa de reações metabólicas e de transferência de energia, além de ter importante papel estrutural (importante componente da bicamada lipídica). O P está presente nos solos em formas orgânicas e inorgânicas, e apesar de abundante ele não está disponível para as plantas, ou seja, encontra-se na forma insolúvel. No geral, os solos apresentam baixa disponibilidade de fósforo em consequência da tendência deste nutriente formar compostos estáveis de alta energia de ligação e baixa solubilidade com a fase mineral do solo. Em solos menos ácidos o P se complexa com o cálcio e é precipitado (P-Ca), já em solos que apresentam maior acidez o P encontra-se precipitado com ferro (P-Fe) e alumínio (P-Al). Ademais, uma proporção significativa do P orgânico é presente na forma de fosfatos de inositol e de outros ésteres de fosfatos (NELSON; DA VEIGA; TERMIGNOMI, 2014; REIS *et al.*, 2009; TISDALE, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

As plantas são capazes de absorver o fósforo presente no solo em solução nas formas de íons monobásicos (H_2PO_4^-) e dibásicos (HPO_4^{2-}). Esse nutriente é essencial para o desenvolvimento das plantas pois melhora seu sistema radicular e, conseqüentemente a parte aérea. Entretanto, estima-se que cerca de 95-99% do fosfato nos solos está presente na forma insolúvel, ou seja, indisponível para as plantas. Na tentativa de suprir a demanda de P no solo, fertilizantes fosfatados são utilizados rotineiramente em campos agrícolas. Todavia, as plantas absorvem pequena proporção dos fertilizantes que são rapidamente convertidos em sua forma insolúvel no solo (AHEMAD; KIBRET, 2014; GUPTA *et al.*, 2015; SOUCHIE; ABBOUD, 2009; TEYMOURI *et al.*, 2016; SOLANKI; KUNDU; NEHRA, 2018).

Atualmente, a estratégia de utilizar altas quantidades de fertilizantes de P é limitada ambiental e economicamente. Dessa forma, alguns microrganismos, como bactérias endofíticas, detêm a habilidade de solubilizar P a partir de componentes inorgânicos de P por meio da produção de ácidos orgânicos. O uso desses microrganismos como inoculantes como forma de aumentar a disponibilidade de P às plantas é uma alternativa viável para diminuir o uso de fertilizantes fosfatados, melhorando o aproveitamento do fósforo já existente no solo

(OLIVEIRA *et al.*, 2009; AWAIS *et al.*, 2017; LACAVA, MACHADO, DE ANDRADE, 2021; DE PAULA *et al.*, 2022).

2.5 Produção de ácido 3-indolacético

Os hormônios são moléculas químicas produzidas por células que modulam processos celulares em outras células. A maioria dos hormônios vegetais (fitormônios) é capaz de ativar respostas na célula alvo em baixas concentrações. Os principais fitormônios são: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, brassinosteroides, jasmonatos, ácido salicílico e estrigolactonas (TAIZ *et al.*, 2017; DUCA; GLICK, 2020).

O ácido 3-indolacético (AIA) é o principal hormônio vegetal do tipo auxina, esse grupo hormonal é responsável por induzir diversos efeitos nas plantas como diferenciação dos tecidos vasculares, indução de raízes adventícias em estacas (o que pode aumentar a absorção de nutrientes) e estimulação do desenvolvimento de frutos (RAVEN *et al.*, 2014). Das bactérias que se associam a plantas, 85% têm capacidade de produzir (AIA), dentre elas bactérias endofíticas como *Acetobacter diazotrophicus*, *Alcaligenes faecalis*, *Azospirillum* sp, *Enterobacter* sp. e *Klebsiella* sp. estimulando respostas rápidas (aumento no alongamento celular) e respostas a longo prazo (divisão e diferenciação celular) nas plantas (LACAVA; AZEVEDO, 2013).

Em consequência do estímulo do desenvolvimento de pelos radiculares e raízes laterais, além do aumento da superfície e comprimento radicular pela síntese de AIA por bactérias, a planta torna-se capaz de absorver mais água e nutrientes que resulta no seu crescimento e maior produção de exsudatos e atividade microbiana na rizosfera (DAVIES, 2004; VESSEY, 2003). No entanto, o excesso de AIA pode resultar na inibição alongação celular e, conseqüentemente, do desenvolvimento das raízes em algumas culturas (TAIZ *et al.*, 2017). A produção de AIA pela microbiota vegetal pode ocorrer por diversas vias e, em muitos casos, se dá a partir do aminoácido triptofano, sendo o L-triptofano o principal precursor (DUCA; GLICK, 2020).

2.6 Controle biológico e *Bipolaris* sp.

Fitopatógenos são responsáveis por uma perda substancial na qualidade e quantidade da produção agrícola em todo o mundo (SAVARY *et al.*, 2019). Segundo SAVARY *et al.* (2019), algumas culturas agrícolas podem chegar a 40% de perda, como o arroz. Para minimizar o efeito de fitopatógenos na agricultura, o crescente uso de agroquímicos tornou-se

realidade no Brasil (BRASIL, 2016). Entretanto, o uso desses agroquímicos pode trazer diversas consequências para a saúde humana e para o meio ambiente (RANI *et al.*, 2021).

O uso de agroquímicos para o controle de doenças de gramíneas forrageiras em áreas de pastagens é economicamente inviável, sendo essa prática limitada à aplicação em campos de produção de sementes (FERNANDES *et al.*, 2010). Assim, surgem alternativas ao controle de doenças de gramíneas forrageiras dentre elas o uso de microrganismos no controle biológico como uma alternativa de sistemas agrícolas econômica e ecologicamente sustentáveis (ANDRADE, 2019).

O gênero *Bipolaris* pertence ao filo *Ascomycota* e família *Pleosporaceae* e engloba um número expressivo de fitopatógenos distribuídos no mundo. Esses fitopatógenos são frequentemente associados a manchas foliares, podridões nas raízes, principalmente em culturas economicamente importantes na família Poaceae, como arroz, milho, trigo, *Paspalum* sp. e sorgo (MANAMGODA *et al.*, 2014; AL-SADI, 2021). Em uma conferência realizada no Brasil em 1990, *Bipolaris sorokiniana*, um patógeno comum de podridão radicular e mancha foliar do trigo e da cevada, foi declarado o patógeno foliar economicamente mais importante do trigo em regiões tropicais do mundo (DUVEILLER & GILCHRIST, 1994).

Com a expansão das pastagens cultivadas e intensificação da atividade pecuária, várias doenças relacionadas com forrageiras passaram a ter relevância, causando redução em produtividade e qualidade das pastagens (TAVANTI *et al.*, 2016). Manchas foliares causadas por fungos fitopatogênicos são as principais doenças encontradas em gramíneas forrageiras, como o *Paspalum* sp. (LENNÉ & TRUTMANN, 1994). Há relatos de manchas foliares causadas por *Bipolaris maydis* em *Paspalum atratum* e outras gramíneas como capim elefante (ANJOS *et al.*, 2004; CHARCHAR *et al.*, 2008). Assim, a busca por alternativas no combate do fitopatógeno *Bipolaris* sp. mostra-se necessária.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar bactérias endofíticas (raiz e folha) de *Paspalum vaginatum* quanto à capacidade de promoção de crescimento vegetal e antagonismo a fitopatógenos.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e purificar a comunidade bacteriana endofítica cultivável de raízes e folhas de *Paspalum vaginatum* (BGP 114) oriundos do BAG *Paspalum* da EMBRAPA;
- Criar um banco de culturas bacterianas isolados de *P. vaginatum* oriundo do BAG;

- Selecionar as bactérias endofíticas de *P. vaginatum* com potencial para promoção de crescimento vegetal direto por meio de experimentos *in vitro* de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de ácido 3-indolacético;
- Selecionar bactérias endofíticas de *P. vaginatum* com capacidade de promoção de crescimento vegetal indireto por meio de experimentos *in vitro* de antagonismo ao fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp.;
- Identificar por meio do sequenciamento do gene 16S as bactérias endofíticas que possuíram melhores performances para a promoção de crescimento vegetal *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

O material utilizado nesse estudo é o acesso BGP 114 (Figura 2), coletado em Laguna, SC (Nº de coleta vDBdSv10117). As amostras de raiz e folha de 10 indivíduos de *Paspalum vaginatum* (BGP 114) foram coletadas de forma aleatória (Figura 3) no dia 8 de dezembro de 2021 no período da manhã no Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* localizado na Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos, São Paulo, Brasil (21.9887° S, 47.8787° O).



Figura 2 - Acesso BGP 114 de *Paspalum vaginatum* no BAG da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Fonte: registrado pelo autor.



Figura 3 - Indivíduo de *Paspalum vaginatum* coletado aleatoriamente dentro da parcela do acesso BGP 114 no BAG *Paspalum*.

Fonte: registrado pelo autor.

As amostras foram armazenadas em sacos plásticos para o transporte imediato até o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas – LaMiB, Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Paulo.

4.2 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados bacterianos endofíticos

O isolamento das bactérias endofíticas foi realizado de acordo com Araújo *et al.* (2014) com modificações. As amostras de folha e raiz (Figura 4) (2,3 g cada) foram submetidas à desinfecção superficial, que consiste na imersão sucessiva das amostras em álcool 70% (2 minutos), seguido de hipoclorito de sódio 3% (3 minutos), álcool 70% (1 minuto), água destilada esterilizada (20 segundos), conforme a Figura 5. Logo depois, as folhas e raízes foram cortadas em pequenos fragmentos e incubadas em 10 mL de tampão PBS (NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; Na₂HPO₄ 1,44 g; KH₂PO₄ 0,24 g; 1000 mL de água destilada; pH 7,4), autoclavado previamente em Erlenmeyers, a 28° C sob agitação de 180 rpm por 1 hora.



Figura 4 - Amostras de raiz e folha de 10 indivíduos de *Paspalum vaginatum*.
Fonte: registrado pelo autor.

Foram realizadas diluições seriadas das suspensões obtidas em PBS, sendo as diluições 10^{-0} , 10^{-1} , 10^{-2} para suspensão de folha e 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} para suspensão de raiz. Em seguida, 100 μL de cada diluição foram adicionados e espalhadas com auxílio da alça de Drigalski, em triplicata, em placas contendo TSA (Tryptona Soja Ágar) suplementadas com benlate ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) para evitar contaminação fúngica. As placas foram incubadas a 28°C por até 7 dias.

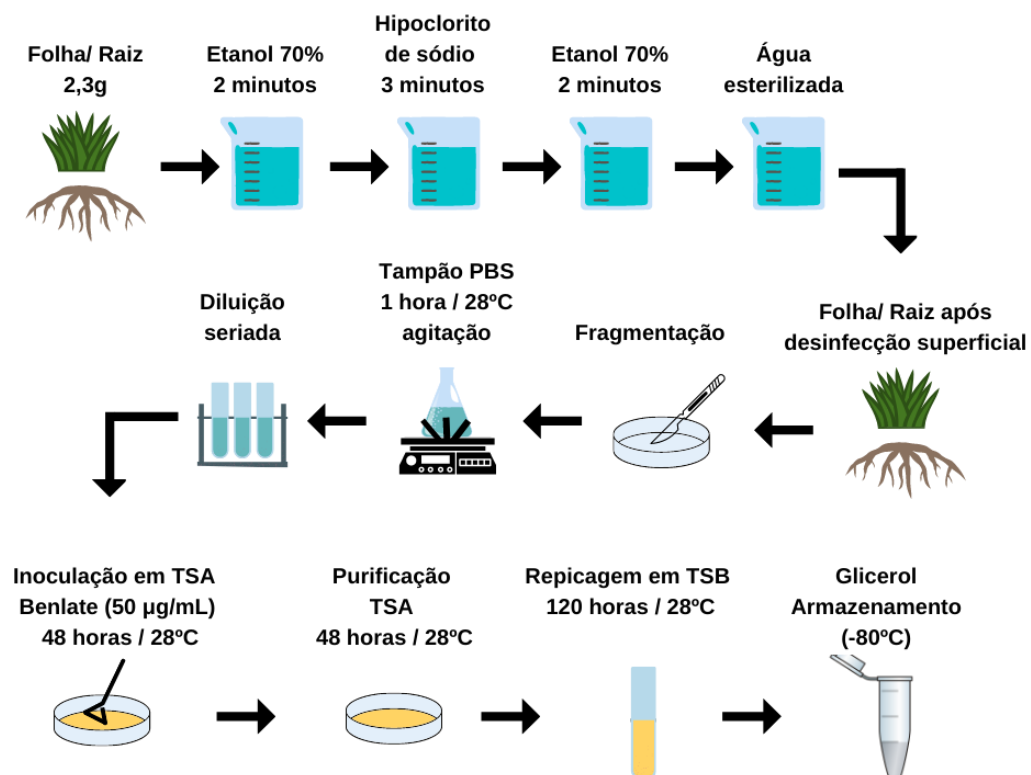


Figura 5 - Ilustração da desinfecção dos tecidos vegetais, obtenção, purificação e armazenamento de bactérias endofíticas de *Paspalum vaginatum*.
Fonte: elaborado pelo autor.

A purificação das colônias obtidas foi realizada por meio da seleção aleatória das colônias seguida de estria de esgotamento em placas de Petri contendo TSA, então incubadas por mais 24-48 horas.

Depois de confirmada a pureza das culturas, as linhagens bacterianas foram inoculadas em TSB (*Tryptic Soy Broth*) e incubadas a 28° C por 120 horas. As bactérias foram estocadas, em triplicata, em microtubos de 2 mL preenchido com 500 µl da suspensão bacteriana suplementada com 500 µl glicerol 50% e armazenados em dois freezers a - 80 °C. Para facilitar a apresentação dos dados, as linhagens obtidas receberam códigos.

4.3 Contagem e frequência de isolamento

A quantificação das bactérias cultiváveis isoladas foi realizada por contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) e cálculo da frequência de isolamento (FI) de acordo com Araújo *et al.* (2014).

4.4 Experimentos de promoção de crescimento vegetal *in vitro*

Realizou-se testes *in vitro* de solubilização de fosfato (SF), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido 3-indolacético (AIA) e antagonismo a *Bipolaris* sp. para examinar o potencial dos isolados bacterianos em promover o crescimento vegetal.

4.4.1 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

O potencial dos isolados em realizar a FBN foi avaliada qualitativamente *in vitro*. Utilizou-se tubos de ensaio contendo 5 mL de meio semissólido NFb (ácido málico, 5g.L⁻¹; K₂HPO₄, 0,5g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O, 0,2g.L⁻¹; NaCl, 0,1g.L⁻¹; CaCl₂.2H₂O, 0,02g.L⁻¹; KOH, 4,5g.L⁻¹; solução de micronutrientes, 2mL; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2mL; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4mL; e solução vitaminas, 1mL; pH 6,8), livre de nitrogênio, no qual as bactérias foram inoculadas, em triplicata, e incubadas a 28°C por 96 horas (DÖBEREINER; BALDANI; BALDINI, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2014).

Em seguida, foi verificada a formação de película de crescimento próximo à superfície dos tubos. Esse procedimento foi realizado mais uma vez, a partir das culturas crescidas em meio NFb semissólido. A reinoculação sucessiva das linhagens é realizada para confirmar se o crescimento não está ocorrendo à custa de reservas de nitrogênio das células, bem como para verificar a estabilidade dessa característica das linhagens (CATTELAN, 1999). O

resultado positivo para a fixação de N₂ foi determinado pela formação de halo horizontal de crescimento próximo à superfície dos tubos.

4.4.2 Solubilização de fosfato inorgânico (SFI)

Para a análise do potencial de solubilização de fosfato inorgânico, os isolados foram inoculados, em duplicata em meio de cultura sólido contendo fosfato inorgânico, o fosfato de cálcio bibásico (10 g.L⁻¹ de glicose; 5g.L⁻¹ de NH₄Cl; 1g.L⁻¹ de NaCl; 1g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,8 g.L⁻¹ de CaHP0₄; 15 g.L⁻¹ de ágar; pH 7,2). Em seguida, incubou-se a 28°C por 120 horas (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001).

A presença do halo incolor ao redor das colônias indicou a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico. Para fins semiquantitativos, as colônias das bactérias foram inoculadas em meio TSB por 72 horas e, posteriormente, eluidas na mesma densidade óptica (D.O), sendo 550nm = 0,1. Foram inoculados, em triplicata, 10µL dessa solução de cultura padronizada, em placas contendo o meio de cultura sólido específico, incubadas a 28°C por 120 horas.

Os diâmetros dos halos claros (Dh), bem como os diâmetro das colônias correspondentes (Dc), foram medidos para posterior cálculo do índice de solubilização de fosfato (ISF):

$$ISF = \frac{Dh}{Dc}$$

Dessa forma, linhagens que solubilizam mais fosfato, obtêm maiores razões e, portanto, apresentam maiores ISF (BERRAQUERO; BAYA; CORMENZANA, 1976). A solubilização pode ser classificada como baixa (ISF<2), média (2<ISF<3) e alta (ISF>3) (SILVA FILHO; VIDOR, 2000).

4.4.3 Produção de ácido 3-indolacético (AIA)

Para a quantificação da produção de ácido 3-indolacético, utilizou-se o método originalmente proposto por BRIC; BOSTOCK; SILVERSTONE, (1991) adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2003).

As colônias foram inoculadas em meio TSB por 72 horas e, posteriormente, eluidas na mesma densidade óptica (D.O), sendo 550nm = 0,1. Foram inoculados, em triplicata, 100 µL dessa solução de cultura padronizada em 3 mL de meio de cultura TSB 10% suplementado com L-triptofano (5 mM), e incubadas no escuro a 28°C por 72 horas sob agitação a 180 rpm. Posteriormente, coletou-se 2mL da suspensão bacteriana e centrifugou-se por 5 minutos a

10.000 g. 900µL do sobrenadante foi encubado, juntamente com 400µL do Reagente de Salkowski (2 mL de FeCl₃ (0,5mol.L⁻¹) e 98 mL de HClO₄ (35%)), por 30 minutos a 28°C em cubeta de 1,5 mL.

Por fim, a leitura das absorvâncias das amostras foi realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 520nm. Como controle negativo utilizou-se o meio de cultura TSB 10% com L-1 triptofano (5mM) acrescido do Reagente de Salkowski. As leituras foram normalizadas por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas seguintes concentrações: 1, 5, 25, 50, 75 e 100µg.mL⁻¹. A coloração rosa-avermelhada das amostras indicou a produção de auxinas.

4.4.4 Atividade antagonista a *Bipolaris* sp. e pareamento direto *in vitro*

O potencial antagônico das culturas bacterianas isoladas de *P. vaginatum* quanto ao fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp. foi analisado por meio de testes antagônicos. A cepa de *Bipolaris* sp. foi gentilmente cedida pela Dr^a Sônia Regina Nogueira Stephan da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Primeiramente, foi realizada uma triagem, na qual os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri contendo PDA (*Potato Dextrose Agar*) em quatro pontos equidistantes, em seguida discos (cortados de placas de Petri) de 0,5 cm de diâmetro contendo *Bipolaris* sp. previamente cultivado em meio PDA foram adicionados no centro de cada placa (Figura 6).

As placas foram incubadas a 28°C por 168 horas. Uma placa comportando apenas um disco com *Bipolaris* sp. no centro serviu como controle do experimento.

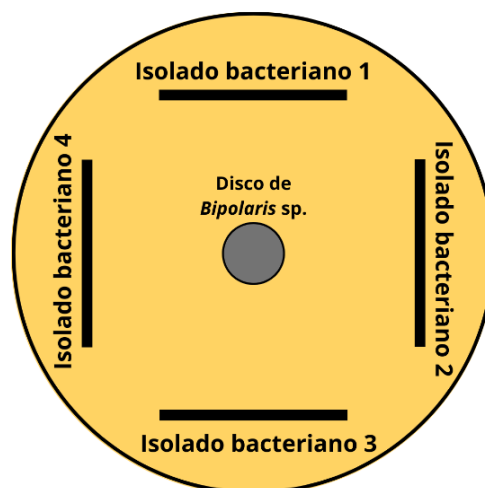


Figura 6 - Representação de uma placa de Petri com a metodologia para triagem de antagonismo *in vitro* de bactérias endofíticas associadas *Paspalum vaginatum*, em relação ao fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp.

Fonte: elaborado pelo autor.

A segunda etapa dos testes antagônicos, foi realizada por meio do método de pareamento direto. Os isolados selecionados pela triagem anterior foram estriados, com auxílio de um de um palito descartável autoclavado, em uma das extremidades da placa. Em seguida, discos (cortados de placas de Petri) de 0,5 cm de diâmetro contendo *Bipolaris* sp. previamente cultivado em meio PDA foram adicionados à outra extremidade das placas (MARIANO, 1993), conforme a Figura 7. O procedimento foi realizado em triplicata. Uma placa comportando apenas um disco com *Bipolaris* sp. no centro serviu como controle do experimento.

A presença de um halo de inibição no crescimento do fungo indica que o isolado apresenta atividade antagonista. A avaliação do experimento foi realizada quando a placa contendo apenas o disco fúngico (controle) apresentou o crescimento de uma extremidade a outra da placa de Petri. As placas foram incubadas por 14 dias a 28°C.



Figura 7 - Representação de uma placa de Petri com a técnica de pareamento direto *in vitro* para avaliação do potencial antagônico dos isolados endofíticos associados a *Paspalum vaginatum*, em relação ao fungo *Bipolaris* sp.

Fonte: elaborado pelo autor.

Para o cálculo da porcentagem de inibição, foi utilizada a metodologia de (QUIROGA; SAMPIETRO; VATTUONE, 2001) adaptado, no qual:

$$\%inibição = \frac{\text{Diâmetro micelial do controle} - \text{Diâmetro micelial do tratamento}}{\text{Diâmetro micelial do controle}} \times 100$$

As medições dos diâmetros miceliais do controle e tratamento nas placas são realizadas conforme a figura 8.

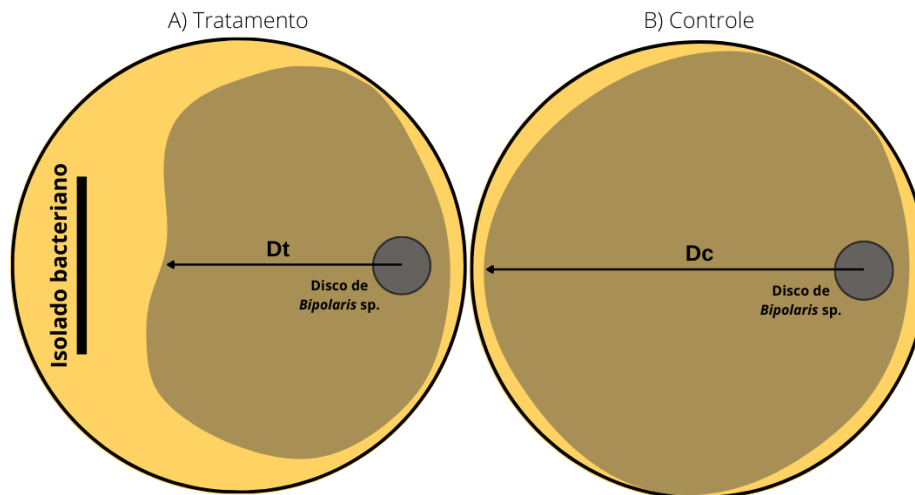


Figura 8 – Representação esquemática do ensaio de pareamento direto *in vitro* utilizando duas placas de Petri, com os diâmetros utilizados para determinação da %inibição dos isolados endofíticos associados a *Paspalum vaginatum*, em relação ao fungo *Bipolaris sp.* A) Placa do tratamento em que Dt= Diâmetro micelial no Tratamento; B) Placa do controle em que Dc= Diâmetro micelial no Controle.

Fonte: elaborado pelo autor.

4.5 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos

4.5.1 Extração de DNA bacteriano

Os isolados bacterianos que demonstraram maior potencial nos testes de promoção de crescimento vegetal foram cultivados em tubos com TSB a 28°C por 48 horas sob agitação constante a 150 rpm. Após a centrifugação das culturas por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet encaminhado para a Embrapa Pecuária Sudeste para extração de DNA. Os DNAs dos isolados foram extraídos com o uso do *Bacteria DNA Preparation Kit* (Cellco Biotec do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), conforme as especificações do fabricante.

4.5.2 Amplificação parcial do gene 16S do DNA ribossomal

A amplificação da região entre V3 e V6 do gene 16S do DNA ribossomal foi realizada por PCR (Reação em cadeia da polimerase) em termociclador programado para desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de 5 minutos a 72°C finalizado com 4°C para conservação do DNA.

O volume final da reação foi 25 µL (200µM de cada dNTP, 10ng de DNA molde, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Cellco), 2,5µL de tampão de Taq DNA polimerase (10x) e 0,4µM de cada primer V3F(5'CCAGACTCCTACGGGAGGCAG-3') e V6R(5'ACATTTCAACACGAGCTGACGA-3')) (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007).

Após a reação de PCR, a confirmação da amplificação do fragmento foi analisada por meio da eletroforese em gel 1,5% de agarose corado com azul de bromofenol e comparação com o marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder RTU (KASVI).

4.5.3 Purificação do DNA amplificado, sequenciamento, edição e análise das sequências

O DNA amplificado foi submetido à purificação com o uso do QIA quick PCR purification kit (QIAGEN), conforme as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras foram analisadas novamente por meio da eletroforese em gel 1,5% de agarose e encaminhadas para sequenciamento no LMseq (Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica) na UNESP Jaboticabal.

As sequências forward e reverse, obtidas a partir do gene 16S, de cada amostra foram editadas utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.2.5) (HALL, 1999) para eliminação das regiões com baixa qualidade de sequenciamento. Posteriormente as sequências forward e reverse foram alinhadas e obtidas as sequências consenso no software AliView (versão 1.8) (LARSSON, 2014). Para identificação do gênero dos isolados bacterianos, as sequências consenso foram submetidas a comparação com sequências depositadas no banco GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) por meio da ferramenta BLASTn (ZHANG *et al.*, 2000; MORGULIS *et al.*, 2008). As sequências consenso também foram submetidas ao banco de dados 16S-Based ID da plataforma EzBioCloud (YOON *et al.*, 2017) para fins de comparação com o resultado obtido a partir do BLASTn, pois se trata de um banco específico de 16S.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Abundância bacteriana e frequência de isolamento

Após o isolamento, a abundância bacteriana de folha e raiz foi estimada por meio da contagem de células viáveis expressas em Unidade Formadora de Colônia por grama de tecido vegetal (UFC.g⁻¹), conforme a tabela 1.

Tecido vegetal	UFC.g ⁻¹ de tecido
Folha	0,051x10 ⁴
Raiz	1,9x10 ⁴

Tabela 1 - Abundância bacteriana de folha e raiz de *Paspalum vaginatum*.

Fonte: Desenvolvido pelo autor.

A partir das bactérias isoladas, foram selecionadas e purificadas 33 de folha e 39 de raiz, totalizando 72 bactérias (Gráfico 1).

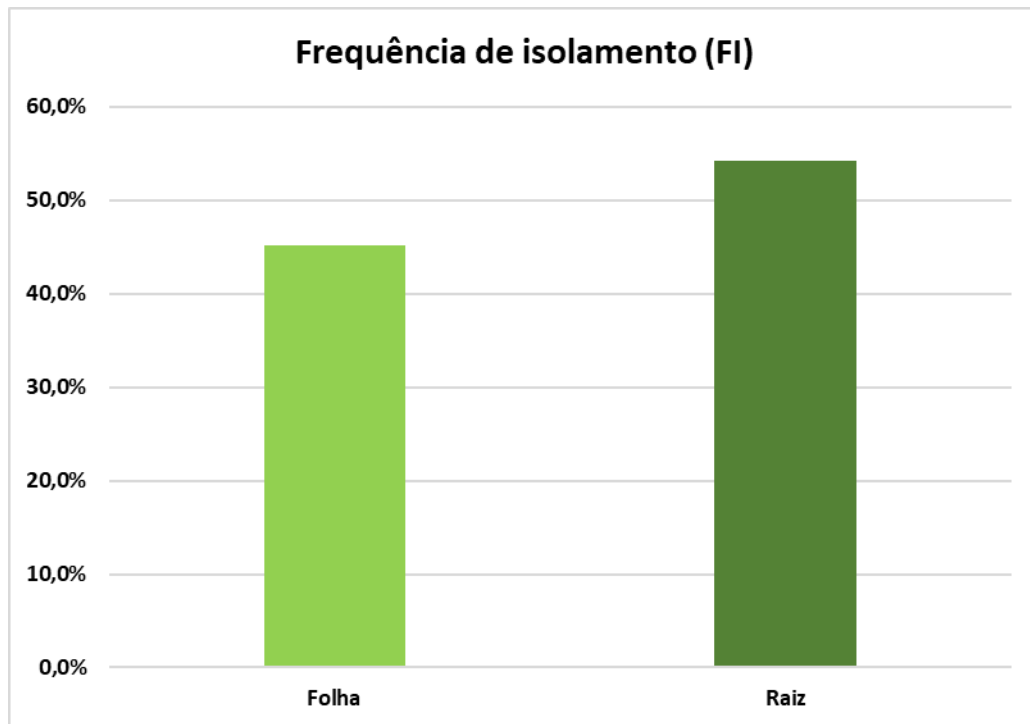


Gráfico 1 - Frequência de isolamento de bactérias endofíticas associadas a folha e raiz de *Paspalum vaginatum*.
Fonte: elaborado pelo autor.

Os dados encontrados no presente trabalho sugerem maior abundância bacteriana nas raízes quando comparado com as folhas, o que corrobora com os trabalhos de De Paula (2019) e De Moraes (2021) que identificaram maior UFC e frequência de isolamento de bactérias associadas à raiz de diversas espécies de *Paspalum*, em relação à folha.

5.2 Identificação taxonômica dos isolados bacterianos

Foram selecionados 24 isolados bacterianos para identificação taxonômica por meio do sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal. Foram utilizados três parâmetros para escolha dos isolados:

- a) Isolados que apresentaram $ISF > 2$ e resultado positivo simultâneo para os testes de FBN, produção de AIA (isolados FO1T3, FO6T2, FO6T3, FO1I3, FO2I1, FO6I1, FO6I2, RA3T1', RA1I2);
- b) seis isolados com maiores valores para produção de AIA (isolados FO1T3, FO8T1, FO8T2, FO2I1, FO8I1, FO9I2);

- c) isolados que, na triagem, apresentaram potencial para ação antagonista ao fungo *Bipolaris* sp. (isolados FO1T2, FO6T2, FO1I1, RA1T5, RA4T2, RA7T1, RA1I1, RA5I2, RA7I1, RA10I1, RA10I3, RA10I5).

A amplificação do fragmento de 752pb do gene 16S rDNA foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%, conforme a Figura 9.

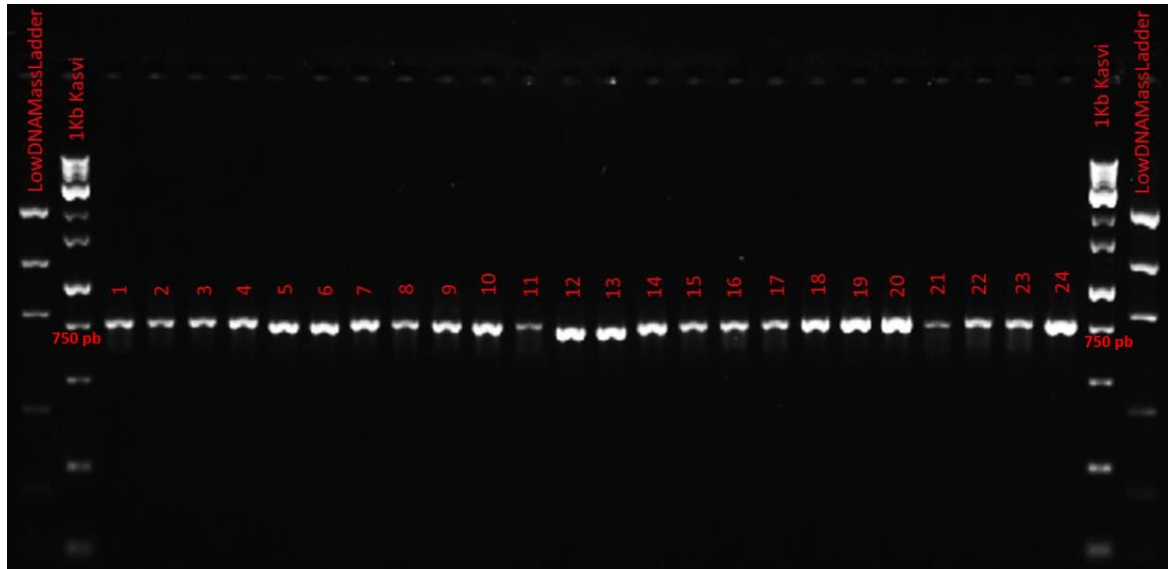


Figura 9 - Gel de 1,5% de agarose para confirmação da amplificação dos fragmentos de 752pb do gene 16S rDNA. Os números das amostras e os padrões de peso molecular estão indicados em vermelho.

Fonte: Registrado pelo autor.

A maioria dos isolados foram identificados ao nível de gênero. No entanto, foi possível identificar ao nível de espécie de pelo menos dois isolados, FO1I3 (*Pantoea ananatis*) e RA3T1' (*Pantoea eucrina*). Além disso, não foi possível identificar o gênero exato de dois isolados (RA1T5 e RA1I1), ambos apresentaram as mesmas duas possibilidades de gênero nos bancos de dados do NCBI e EzBioCloud, sendo eles *Pseudomonas* ou *Stenotrophomonas*. Em 1943, bactérias do gênero *Stenotrophomonas* foram isoladas e nomeadas como *Pseudomonas*. Posteriormente, estudos de hibridização de DNA-rRNA e sequenciamento e mapeamento de genes resultaram na reclassificação para *Stenotrophomonas* (BROOKE, 2012). Dessa forma, a região amplificada e sequenciada no presente trabalho não foi capaz de distinguir os isolados RA1T5 e RA1I1 entre os gêneros *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*, devido à similaridade dos dois gêneros.

Na Tabela 2 são apresentadas as linhagens bacterianas endofíticas e suas respectivas identificações.

Código do gel de confirmação	Código de isolamento	Identificação	Similaridade
1	FO1T2	<i>Bacillus</i> sp.	100%
2	FO1T3	<i>Pantoea</i> sp.	100%
3	FO6T2	<i>Pantoea</i> sp.	100%
4	FO6T3	<i>Enterobacter</i> sp.	98%
5	FO8T1	<i>Agrobacterium</i> sp.	100%
6	FO8T2	<i>Agrobacterium</i> sp.	100%
7	FO1I1	<i>Bacillus</i> sp.	100%
8	FO1I3	<i>Pantoea</i> sp.	100%
9	FO2I1	<i>Pantoea</i> sp.	100%
10	FO6I1	<i>Enterobacter</i> sp.	100%
11	FO6I2	<i>Enterobacter</i> sp.	100%
12	FO8I1	<i>Agrobacterium</i> sp.	100%
13	FO9I2	<i>Agrobacterium</i> sp.	100%
14	RA1T5	<i>Pseudomonas</i> sp.*	100%
15	RA3T1'	<i>Pantoea</i> sp.	100%
16	RA4T2	<i>Staphylococcus</i> sp.	100%
17	RA7T1	<i>Bacillus</i> sp.	100%
18	RA1I1	<i>Pseudomonas</i> sp.*	100%
19	RA1I2	<i>Enterobacter</i> sp.	100%
20	RA5I2	<i>Bacillus</i> sp.	100%
21	RA7I1	<i>Streptomyces</i> sp.	100%
22	RA10I1	<i>Bacillus</i> sp.	100%
23	RA10I3	<i>Bacillus</i> sp.	100%
24	RA10I5	<i>Bacillus</i> sp.	100%

Tabela 2 - Identificação dos isolados bacterianos endofíticos associados a *Paspalum vaginatum*.

*O isolado também apresentou similaridade ao gênero *Stenotrophomonas* sp.

Fonte: elaborado pelo autor.

Os isolados que exibiram resultados positivos, simultaneamente, para os testes de FBN, AIA e ISF>2 pertencem aos gêneros *Enterobacter* e *Pantoea*. Já os isolados que produziram maiores quantidades de AIA pertencem aos gêneros *Pantoea* e *Agrobacterium*. Por fim, os isolados que apresentaram atividade antagonista pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pantoea*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* ou *Stenotrophomonas*.

Dentre os doze isolados selecionados para sequenciamento devido sua ação antagonística, sete pertencem ao gênero *Bacillus*. Para analisar se há similaridade entre as sequências de DNA dos isolados do gênero *Bacillus*, foi realizado um alinhamento múltiplo das sequências pelo programa Clustal Omega (SIEVERS *et al.*, 2011) e identificou-se que os isolados FO1I1,

RA7T1, RA5I2, RA10I1, RA10I3, RA10I5 têm 100% de similaridade para o gene 16S e provavelmente pertence a mesma espécie, além de diferir consideravelmente do isolado FO1T2, que provavelmente pertence a uma segunda espécie.

5.3 Potencial de promoção de crescimento vegetal *in vitro*

Os 72 isolados foram avaliados quanto a capacidade de solubilização de fosfato (SF), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido 3-indolacético (AIA), e antagonismo a *Bipolaris* sp.. Destes, 42 fixaram nitrogênio (58,3%), 28 solubilizam fosfato inorgânico (38,9%), 70 produziram AIA (97,2%), mesmo que em baixa quantidade, e 12 apresentaram potencial antagônico contra *Bipolaris* sp. (16,7%), conforme tabela 3.

Tecido	Código de Isolamento	Gênero bacteriano	FBN	ISF	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Triagem antagonismo
Folha	FO1T1	NI	+	1,28	1,42	-
Folha	FO1T2	<i>Bacillus</i> sp.	+	1,58	1,45	+
Folha	FO1T3	<i>Pantoea</i> sp.	+	2,69	59,94	-
Folha	FO2T1	NI	+	-	4,07	-
Folha	FO3T1	NI	+	-	49,67	-
Folha	FO3T3	NI	-	-	56,60	-
Folha	FO3T4	NI	+	1,59	1,62	-
Folha	FO4T1	NI	-	-	2,59	-
Folha	FO4T2	NI	+	-	1,32	-
Folha	FO5T1	NI	-	-	3,17	-
Folha	FO6T1	NI	-	-	2,52	-
Folha	FO6T2	<i>Pantoea</i> sp.	+	3,01	21,25	+
Folha	FO6T3	<i>Enterobacter</i> sp.	+	3,13	25,07	-
Folha	FO7T2	NI	+	-	0,11	-
Folha	FO7T3	NI	-	-	4,58	-
Folha	FO8T1	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	-	59,66	-
Folha	FO8T2	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	-	59,09	-
Folha	FO9T1	NI	-	-	54,78	-
Folha	FO10T2	NI	-	-	4,24	-
Folha	FO10T3	NI	-	-	10,93	-
Folha	FO10T4	NI	+	1,26	3,95	-
Folha	FO10T5	NI	+	-	4,46	-
Folha	FO1I1	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	3,32	+
Folha	FO1I2	NI	-	-	24,95	-
Folha	FO1I3	<i>Pantoea</i> sp.	+	3,00	30,28	-

Tecido	Código de Isolamento	Gênero bacteriano	FBN	ISF	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Triagem antagonismo
Folha	FO2I1	<i>Pantoea</i> sp.	+	3,02	62,25	-
Folha	FO3I1	NI	+	1,17	1,93	-
Folha	FO5I1	NI	+	1,30	12,15	-
Folha	FO6I1	<i>Enterobacter</i> sp.	+	4,00	22,73	-
Folha	FO6I2	<i>Enterobacter</i> sp.	+	4,46	19,86	-
Folha	FO8I1	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	-	79,23	-
Folha	FO9I1	NI	+	1,30	6,53	-
Folha	FO9I2	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	-	82,15	-
Raiz	RA1T1	NI	+	-	0,20	-
Raiz	RA1T2	NI	-	-	0,62	-
Raiz	RA1T3	NI	-	-	0	-
Raiz	RA1T4	NI	-	1,22	16,38	-
Raiz	RA1T5	<i>Pseudomonas</i> sp.*	+	-	4,95	+
Raiz	RA2T1	NI	+	-	5,22	-
Raiz	RA2T2	NI	+	-	3,98	-
Raiz	RA2T3	NI	-	-	0,28	-
Raiz	RA2T4	NI	+	-	3,88	-
Raiz	RA3T1'	<i>Pantoea</i> sp.	+	3,89	29,06	-
Raiz	RA3T1''	NI	+	1,06	3,49	-
Raiz	RA3T2	NI	-	-	0,86	-
Raiz	RA4T1	NI	-	-	1,40	-
Raiz	RA4T2	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	3,12	+
Raiz	RA5T1	NI	-	1,61	5,75	-
Raiz	RA5T2	NI	+	1,28	8,96	-
Raiz	RA7T1	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	3,03	+
Raiz	RA8T1	NI	+	1,21	6,36	-
Raiz	RA8T2	NI	-	-	3,15	-
Raiz	RA8T3	NI	+	1,39	5,85	-
Raiz	RA10T1	NI	-	-	3,76	-
Raiz	RA10T2	NI	+	-	5,27	-
Raiz	RA1I1	<i>Pseudomonas</i> sp.*	+	-	6,19	+
Raiz	RA1I2	<i>Enterobacter</i> sp.	+	2,07	29,26	-
Raiz	RA1I3	NI	+	-	12,73	-
Raiz	RA1I4	NI	+	-	3,71	-
Raiz	RA1I5	NI	-	2,01	26,34	-
Raiz	RA2I1	NI	-	-	0	-
Raiz	RA3I1	NI	+	1,33	5,75	-
Raiz	RA5I1	NI	-	-	4,41	-

Tecido	Código de Isolamento	Gênero bacteriano	FBN	ISF	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Triagem antagonismo
Raiz	RA5I2	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	4,36	+
Raiz	RA6I1	NI	+	-	3,95	-
Raiz	RA7I1	<i>Streptomyces</i> sp.	-	1,24	1,10	+
Raiz	RA8I1	NI	+	1,36	5,75	-
Raiz	RA10I1	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	4,41	+
Raiz	RA10I3	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	5,27	+
Raiz	RA10I4	NI	+	1,50	12,27	-
Raiz	RA10I5	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	5,70	+
Raiz	RA10I6	NI	+	1,29	6,17	-

Tabela 3 - Resultados referentes aos testes de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, produção de AIA e antagonismo ao fungo *Bipolaris* sp. para os isolados endofíticos associados a *Paspalum vaginatum* (“+” = positivo, “-” = negativo; NI = não identificado).

*O isolado também apresentou similaridade ao gênero *Stenotrophomonas* sp.

Fonte: elaborado pelo autor.

Ao comparar as bactérias endofíticas isoladas de *P. vaginatum* quanto aos testes de NFB, SFI e produção de AIA observamos que, entre os 72 isolados bacterianos, 24 bactérias apresentaram resultado positivo para ambos três testes e duas bactérias testaram negativo para ambos três testes. Além disso, 23 isolados produziram apenas AIA, quatro isolados produziram AIA e solubilizaram fosfato inorgânico e 19 isolados produziram AIA e fixaram nitrogênio. Assim, nenhuma bactéria apenas solubilizou fosfato inorgânico ou apenas fixou nitrogênio (Figura 10).

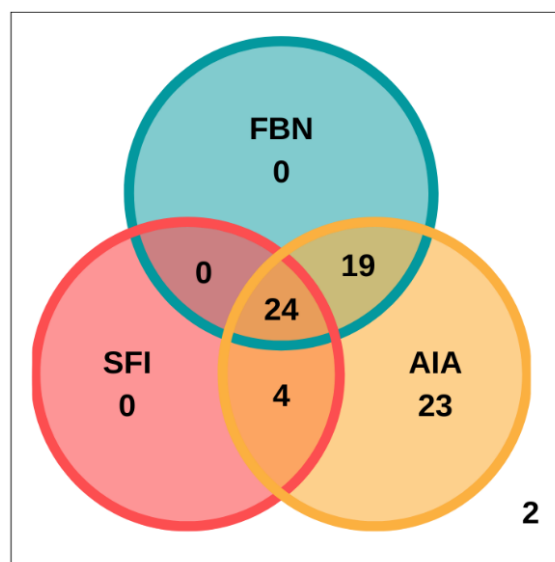


Figura 10 - Diagrama de Venn agrupando bactérias endofíticas isoladas de *P. vaginatum* com resultado positivo para os testes de Fixação Biológica de Nitrogênio (azul), Solubilização de Fosfato Inorgânico (vermelho) e produção de ácido 3-indolacético (amarelo).

Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.1 Fixação biológica de nitrogênio

Dentre os 72 isolados bacterianos endofíticos de *Paspalum vaginatum*, 42 fixaram nitrogênio (58,3%). Destes, 19 isolados de folha (46,5%) e 23 de raiz (53,5%), conforme o gráfico 2.

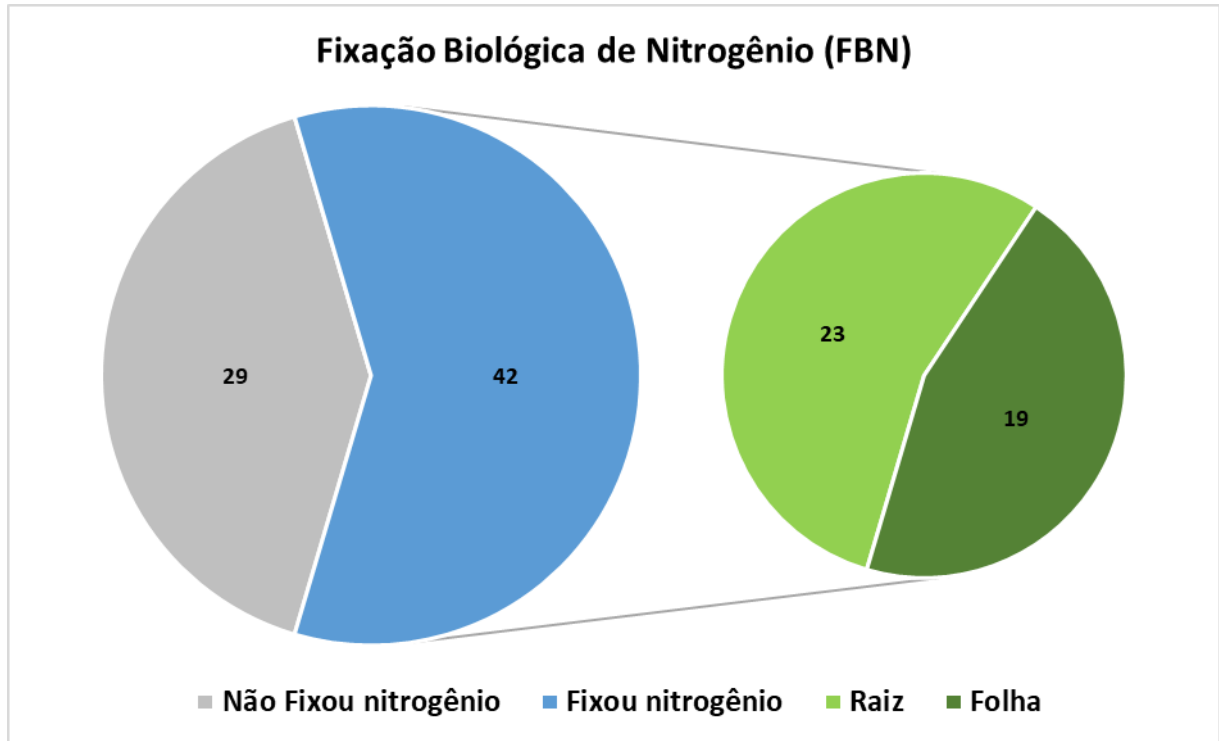


Gráfico 2 - Fixação biológica de nitrogênio de bactérias isoladas de folha e raiz de *Paspalum vaginatum*.
Fonte: elaborado pelo autor.

Duas inoculações sucessivas de um isolado bacteriano em meio semi-sólido livre de nitrogênio em que se observa a capacidade do isolado de crescer e formar película em ambas inoculações, sugere a fixação biológica de nitrogênio pelo isolado em questão (Figura 11). A película é formada na localização em que uma menor tensão de oxigênio auxilia na atividade da nitrogenase, complexo enzimático sensível a altas concentrações de oxigênio (PELZER *et al.*, 2011).

Em trabalho desenvolvido por De Paula (2019) 61 isolados bacterianos (28,6% do total), associados a *Paspalum atratum* e *Paspalum notatum*, apresentam resultado positivo para fixação biológica de nitrogênio, sendo que 22 pertencem ao gênero *Enterobacter*, dez ao gênero *Pantoea* e quatro ao gênero *Bacillus*.

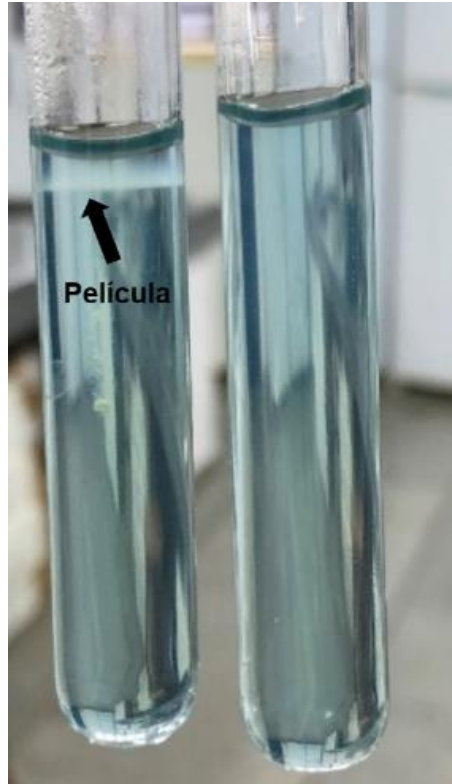


Figura 11 - À esquerda, fixação de nitrogênio observada pela formação da película em meio livre de nitrogênio semi-sólido. À direita, controle em que não há inoculação de algum isolado.
Fonte: registrado pelo autor.

Bactérias endofíticas diazotróficas têm sido isoladas e estudadas a partir de diversos tipos vegetais, como mandioca (LEITE *et al.*, 2018), *Brachiaria* (OLIVEIRA *et al.*, 2021), cana de açúcar (ANTUNES *et al.*, 2022), soja (ZHAO; XU; LAI, 2018) e café (ANDRADE, 2019). Liu *et al.* (2021) avaliaram 78 bactérias endofíticas diazotróficas associadas ao *Paspalum vaginatum* e, assim como no presente estudo, foram identificadas bactérias diazotróficas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Stenotrophomonas*. Szilagyi-Zecchin *et al.* (2014) avaliaram sete isolados bacterianos endofíticos de milho, em que todos apresentaram resultado positivo para o teste de fixação biológica de nitrogênio, pertencentes aos gêneros *Enterobacter* e *Bacillus*. O gênero *Pantoea* também tem sido estudado como fixador de nitrogênio, como no trabalho realizado por Loreit *et al.* (2004) que estuda uma bactéria endofítica do gênero *Pantoea* associada a cana de açúcar.

O plano nacional de fertilizantes 2050 destaca a fixação biológica de nitrogênio e a necessidade de expansão dessa tecnologia. Além disso, o plano coloca como meta aumentar a contribuição de FBN, principalmente em grandes culturas (como milho, soja e culturas forrageiras) em pelo menos 35% até 2030 e 50% até 2040 sobre a demanda de nitrogênio na agricultura brasileira, quando comparado com o ano de 2020 (BRASIL, 2021).

5.3.2 Solubilização de fosfato inorgânico

Dentre os 28 isolados bacterianos que solubilizaram fosfato inorgânico (38,9%) em meio contendo CaHPO_4 (fosfato de cálcio bibásico), indicado pela formação do halo em torno da colônia (Figura 12), 14 foram provenientes de folha (50%) e 14 de raiz (50%). A solubilização de fosfato pode ser classificada, a partir do índice de Solubilização de Fosfato (ISF), como baixa ($\text{ISF} < 2$), média ($2 < \text{ISF} < 3$) e alta ($\text{ISF} > 3$) (SILVA FILHO; VIDOR, 2000). Dessa forma, o ISF dos 28 isolados variou de 1,06 a 4,46, sendo que sete bactérias apresentaram $\text{ISF} > 3$ e três apresentaram $2 < \text{ISF} < 3$, conforme gráfico 3.

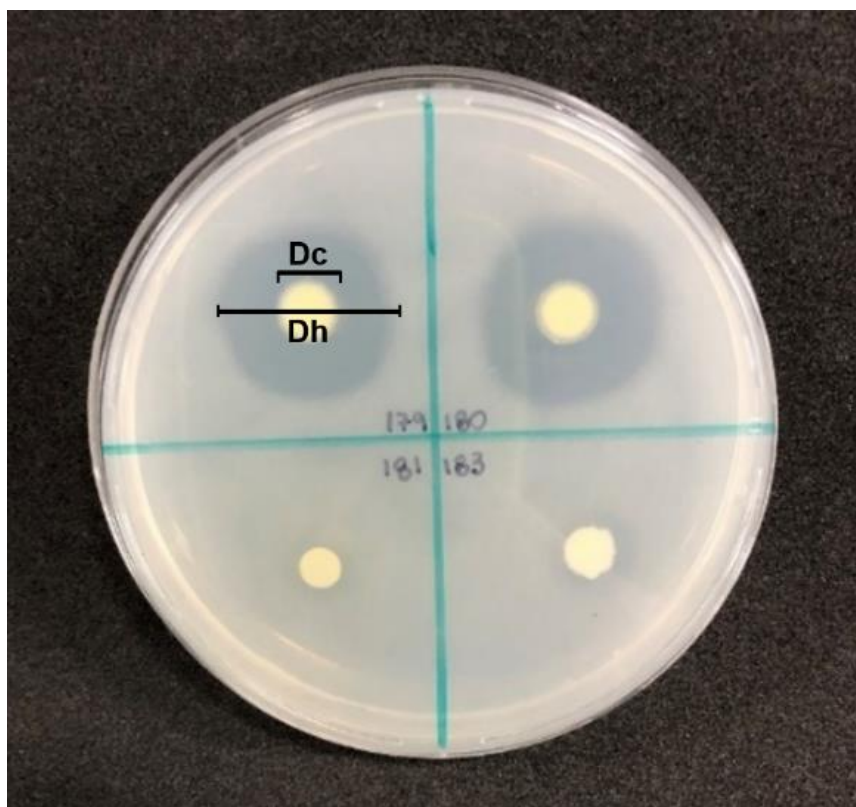


Figura 12 - Placa de petri contendo fosfato de cálcio insolúvel, na qual foram inoculadas quatro bactérias. Os halos indicadores de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc) são representados na parte superior da placa e formados por isolado bacteriano positivo. Na parte inferior da placa, é representado resultado negativo pela ausência da formação de halo.

Fonte: registrado pelo autor.

O fósforo (P) é um dos principais nutrientes limitantes para o crescimento das plantas e, apesar de presente no solo, não é disponível para os vegetais significativamente, uma vez que estes absorvem o fósforo na forma de íons (HOLFORD, 1997; GYANESHWAR *et al.*, 2002). Microrganismos endofíticos apresentam potencial para a formulação de inoculantes podendo solubilizar fosfato por diversos mecanismos e, conseqüentemente, disponibilizar o P para as plantas, aumentar a eficiência da adubação fosfatada e minimizar o uso excessivo de

fertilizantes fosfatados (AZEVEDO *et al.*, 2018; LACAVA, MACHADO, DE ANDRADE, 2021).

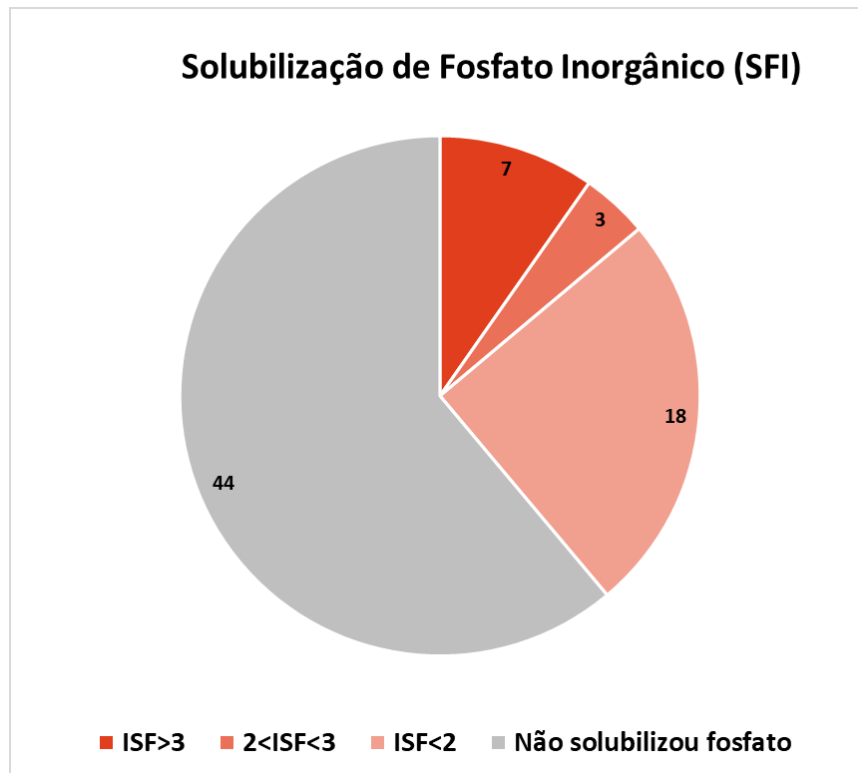


Gráfico 3 – Quantidade de bactérias isoladas de *Paspalum vaginatum* que fazem solubilização de fosfato inorgânico.

Fonte: elaborado pelo autor

De Moraes (2021) avaliou linhagens bacterianas endofíticas, isoladas de diversas espécies de *Paspalum*, pertencentes ao gênero *Enterobacter* que demonstraram alto índice de solubilização de fosfato, bem como apresentaram resultado positivo para os testes de AIA e NFB. Em trabalho realizado por Chen *et al.* (2014), dentre cinco isolados endofíticos associados a mandioca, uma cepa do gênero *Pantoea* se destacou na solubilização de fosfato, além de ter desencadeado a atividade microbiana natural do solo vermelho ácido (deficiente em fósforo). O isolado FO6I2, que pertence ao gênero *Enterobacter*, se destacou com o maior índice de solubilização (ISF=4,46) no presente trabalho. Da mesma forma, nos trabalhos de Mendoza-Arroyo *et al.* (2020) e Kim *et al.* (2002) foram detectadas bactérias pertencentes ao gênero *Enterobacter* com alta habilidade para solubilização de fosfato e potencial para uso como inoculante. Ao estudar bactérias isoladas de *Paspalum notatum* com promoção de crescimento vegetal, os três isolados com maiores índices de solubilização (3,61; 3,58; 3,56) pertencem ao gênero *Enterobacter* (DE PAULA *et al.*, 2022). Tais trabalhos corroboram com os gêneros encontrados no presente estudo.

A solubilização do fosfato ocorre principalmente através da secreção de ácidos orgânicos. Eles são responsáveis por solubilizar fosfatos insolúveis em ortofosfato solúvel (H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-}). Para solubilização de fosfato, a bactéria deve estar próxima da fonte de fósforo (TAURIAN *et al.*, 2010). Embora as rizobactérias apresentem maior potencial para uso comercial, bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato também são descritas na literatura. Oteino *et al.* (2015) demonstraram que a inoculação de endófitos na rizosfera aumentou o crescimento em plantas que sofrem de oferta limitada de fosfato.

5.3.3 Produção de ácido 3-indolacético

Dentre as 70 bactérias endofíticas associadas a *Paspalum vaginatum* que produziram ácido 3-indolacético (AIA), a quantidade variou de 0,11 a 82,15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 13). Essa auxina atua no estímulo do desenvolvimento de pelos radiculares e raízes laterais devido sua ação na expansão e no alongamento celular (DAVIES, 2004; VANDE BROEK *et al.*, 1999). No entanto, altos níveis de AIA podem causar efeitos nocivos, como a inibição do crescimento das raízes primárias (DUCA *et al.*, 2014). Portanto, para uso como inoculante, é fundamental conhecer o nível ótimo de AIA na planta alvo para seleção apropriada da bactéria.

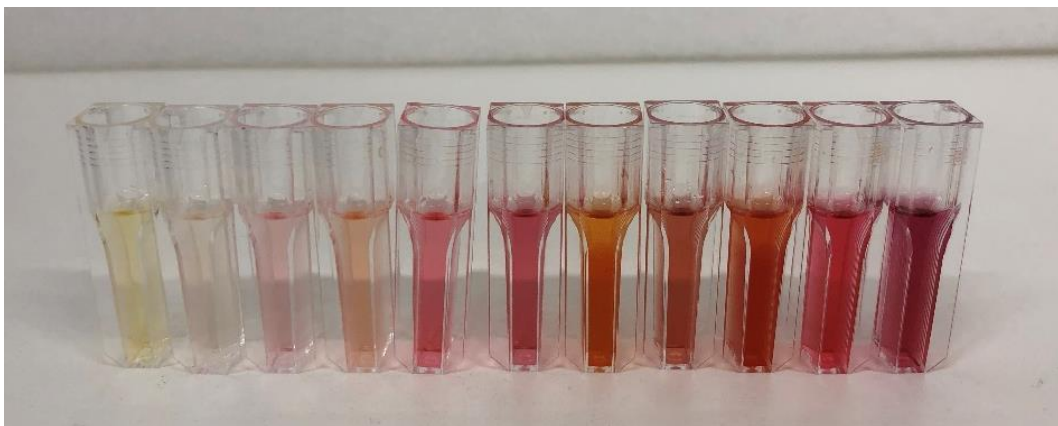


Figura 13 - Quantificação de AIA, após a adição do reagente de *Salkowski*. A exibição das colorações mais intensas reflete a maior concentração de AIA, enquanto colorações mais transparentes exibem concentrações mais baixas. A primeira cubeta é referente ao controle, ou seja, não há produção de AIA.

Fonte: registrado pelo autor.

O AIA, na presença de FeCl_3 , converte-se para a cor rosa, este comportamento é utilizado na determinação do AIA. Dessa forma, diferentes ácidos minerais como ácido clorídrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido nítrico e ácido sulfúrico podem ser combinados com FeCl_3 para desenvolver a coloração rosa. No entanto, a combinação de FeCl_3

com reagente HClO_4 (ácido perclórico), formando o reagente de *Salkowski* é o mais sensível e apresenta menor interferência por outros compostos (PATEL *et al.*, 2012).

A produção de AIA por bactérias endofíticas e epifíticas consiste em um dos principais mecanismos associados à promoção de crescimento vegetal, com prevalência dos gêneros *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Xanthomonas* (PATTEN; GLICK, 1996; TSAVKELOVA *et al.*, 2006).

O isolado FO9I2 se destacou pela maior síntese de AIA, apresentando quantidades de $82,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguido dos isolados, FO8I1, FO2I1, FO1T3, FO8T1, FO8T2, que produziram respectivamente, $79,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $62,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $59,94 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $59,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $59,09 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Dentre eles, duas pertencem ao gênero *Pantoea* e quatro ao gênero *Agrobacterium*. De Moraes (2019), ao estudar isolados endofíticos e rizosféricos de *Paspalum* sp., identificou duas bactérias do gênero *Agrobacterium* e uma do gênero *Pantoea* com alta produção de AIA, $230,76 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $55,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $99,17 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Em artigo publicado por De Paula *et al.* (2022), 43 bactérias isoladas *Paspalum atratum* (37% do total) produziram AIA, apresentaram resultado positivo para FBN e $\text{ISF} > 2$ e, destes 43, a produção de AIA variou entre 12.85 a $431.41 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, o maior produtor de AIA no estudo pertence ao gênero *Pantoea*.

Na China, Li *et al.* (2008) isolaram bactérias endofíticas de soja e relataram cepas de *Pantoea* sp. e *Burkholderia* sp. como maiores produtoras de AIA. Já Egamberdieva *et al.* (2021) relataram cepas de *Agrobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. como maiores produtores de AIA em isolados bacterianos endofíticos de espinafre. Em estudo realizado por Wang *et al.* (2016), a síntese de AIA por bactérias endofíticas de *Kobresia capillifolia* variou de 3.31 a $146.93 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que a maioria dos isolados apresentaram baixa produção de AIA, como também observado no presente trabalho (Gráfico 4). No estudo realizado por Machado (2015) com bactérias endofíticas associadas a pinhão-mansão, a produção de AIA variou entre $0,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $84,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Tais trabalhos corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

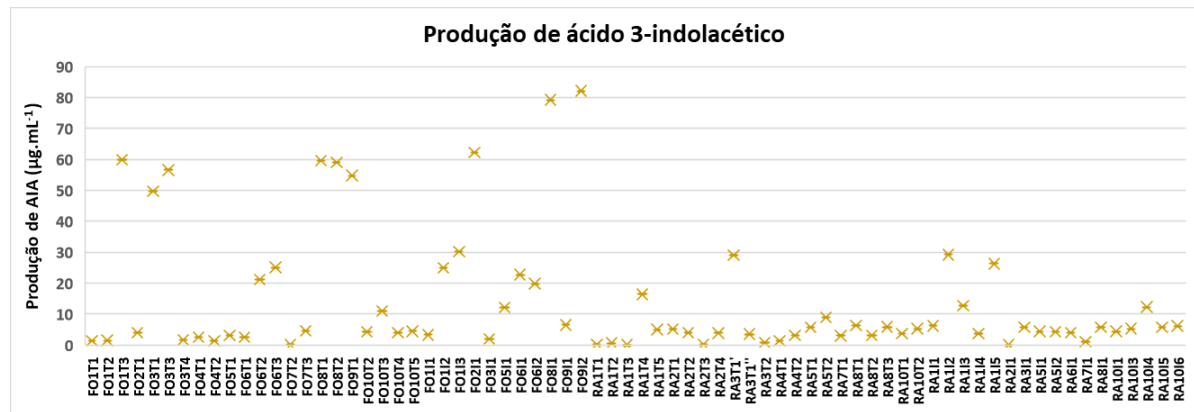


Gráfico 4 - Dispersão dos isolados endofíticos associados a *Paspalum vaginatum* em relação à produção de AIA. Fonte: elaborado pelo autor.

5.3.4 Atividade antagonista a *Bipolaris* sp.

Os doze isolados que apresentaram potencial antagonista ao fungo *Bipolaris* sp. na triagem inicial foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptomyces*. A partir desses doze isolados, foi realizado pareamento direto entre o fungo e cada isolado. Nesse critério, os isolados RA4T2 e RA10I3, pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus*, respectivamente, exibiram resultado negativo para atividade antagonista. Possivelmente, houve uma interferência no resultado da triagem para os isolados RA4T2 e RA10I3, por outros isolados presentes concomitantemente nas placas.

Os fungos compõem o maior e o mais diverso grupo de microrganismos fitopatogênicos, eles são responsáveis por uma perda substancial na qualidade e quantidade da produção agrícola em todo o mundo. Dessa forma, no Brasil, o modelo da agricultura convencional que visa o retorno econômico imediato trata de tais problemas quase que exclusivamente pela aplicação continuada e em larga escala de agroquímicos (MORANDI *et al.*, 2009; SAVARY *et al.*, 2019). Entretanto, o uso desses agroquímicos pode trazer diversas consequências ambientais e para a saúde humana (RANI *et al.*, 2021). Assim, surgem alternativas de manejo para o uso de agroquímicos, como o controle biológico de doenças de plantas, que pode ser definido como o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo (MORANDI *et al.*, 2009).

No presente estudo, a porcentagem de inibição (%i) calculada a partir do experimento de pareamento direto entre as bactérias endofíticas isoladas de *Paspalum vaginatum* e o fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp. (Figura 14) variou de 12 a 77%, sendo que isolado FO1T2 (*Bacillus* sp.) exibiu a maior porcentagem de inibição (tabela 4).

Código de isolamento	Gênero bacteriano	% inibição
FO1T2	<i>Bacillus</i> sp.	77%
FO6T2	<i>Pantoea</i> sp.	27%
FO1I1	<i>Bacillus</i> sp.	22%
RA1T5	<i>Pseudomonas</i> sp.*	27%
RA7T1	<i>Bacillus</i> sp.	34%
RA1I1	<i>Pseudomonas</i> sp.*	17%
RA5I2	<i>Bacillus</i> sp.	34%
RA7I1	<i>Streptomyces</i> sp.	28%
RA10I1	<i>Bacillus</i> sp.	12%
RA10I5	<i>Bacillus</i> sp.	46%

Tabela 4 - Porcentagem de inibição dos isolados bacterianos endofíticos de *P. vaginatum* referente ao fitopatógeno *Bipolaris* sp.

*O isolado também apresentou similaridade ao gênero *Stenotrophomonas* sp.

Fonte: elaborado pelo autor.

Em artigo publicado por Da Silveira *et al* (2019), sete isolados bacterianos endofíticos associados a cana de açúcar apresentaram ação antagonista contra *Bipolaris sacchari*, sendo três pertencentes ao gênero *Pantoea* e um ao gênero *Pseudomonas*. Ao estudar a bactéria endofítica pertencente ao gênero *Bacillus subtilis* isolado de *Eucommia ulmoides*, uma planta com propriedades medicinais, Ding *et al* (2017) relatou inibição de 61,7% contra o fitopatógeno *Bipolaris maydis*. Já Villa-Rodriguez *et al.* (2019), ao estudar 195 bactérias endofíticas associadas ao trigo, relatou 14 endófitos bacterianos com atividade antagonista contra o fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana*, sendo oito cepas pertencentes ao gênero *Bacillus*, duas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e uma pertencente ao gênero *Stenotrophomonas*. Em trabalho realizado por Assari *et al.* (2016) com isolados bacterianos endofíticos da raiz de *Schima wallichii*, uma planta comumente usada pelas tribos locais, na Índia, para curar as feridas causadas por insetos como aranha e escorpião, sete isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces* apresentaram atividade de inibição significativa contra a maioria dos fitopatógenos selecionados. Tais trabalhos corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

O gênero *Pseudomonas* é conhecido por sua versatilidade metabólica e plasticidade genética, englobando tanto patógenos quanto antagonistas (ZENGERER *et al.*, 2018). De Moraes (2019), em pesquisa realizada com isolados endofíticos e rizosféricos de diversas espécies de *Paspalum* identificou uma cepa de *Pseudomonas* com potencial antagonista contra os fungos *Claviceps purpurea* e *Fusarium oxysporum*.

Devido à sua capacidade de formar esporos, os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, possuem vantagem em relação aos outros gêneros. Essas estruturas são tolerantes condições inóspitas, como calor, frio, variação de pH, agroquímicos, fertilizantes e tempo de estocagem, o que facilita o uso desses gêneros de microrganismos na formulação de produtos mais estáveis e viáveis, além da sua aplicação no tratamento de folhas na forma de sprays (RECHCIGL, 2018; BARRATT *et al.*, 2018).

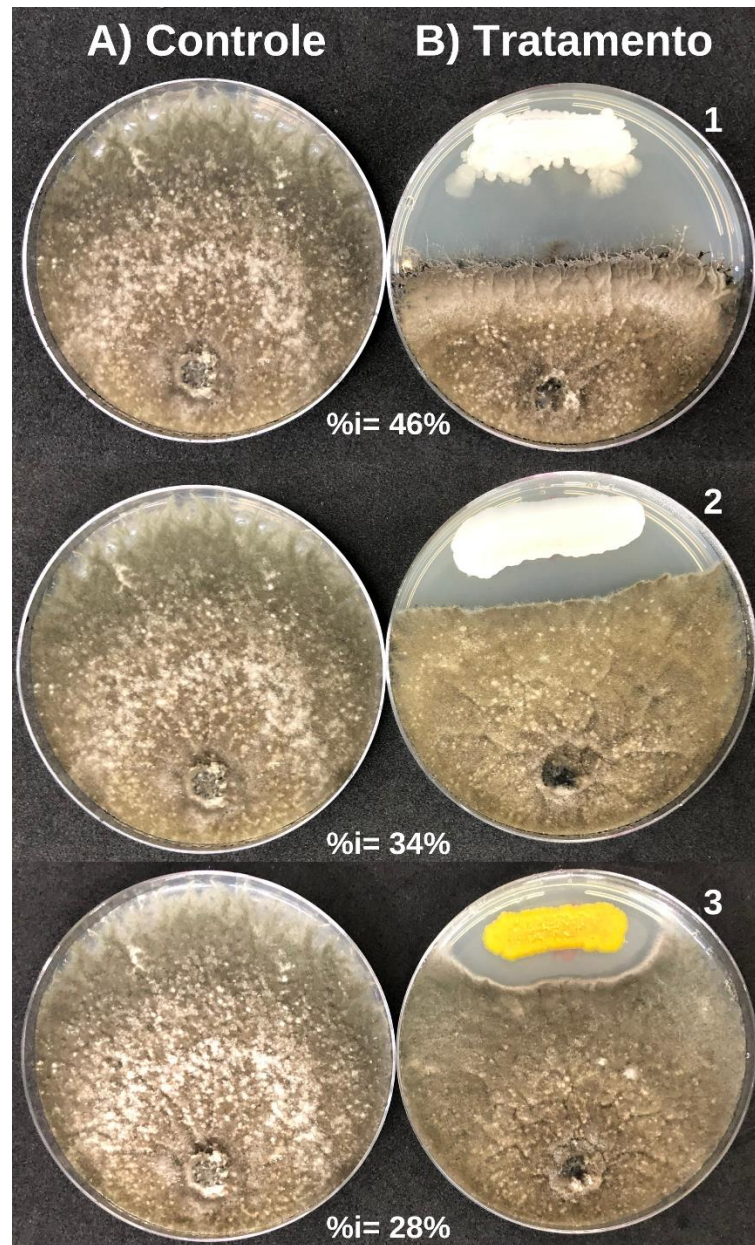


Figura 14 – Exemplos dos resultados dos ensaios de antagonismo *in vitro* entre o fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp. e bactérias endofíticas isoladas de *Paspalum vaginatum*. A) Controle – fungo fitopatogênico crescendo na ausência de bactérias e B) Tratamento – pareamento direto em que o fungo fitopatogênico cresce na presença das bactérias endofíticas. 1) *Bacillus* sp.; 2) *Bacillus* sp.; 3) *Streptomyces* sp.
Fonte: registrado pelo autor.

6 CONCLUSÃO

Raízes de *Paspalum vaginatum* apresentaram uma maior frequência de isolamento bacteriano endofítico quando comparado com as folhas;

Dentre os 72 isolados endofíticos avaliados para fatores de promoção de crescimento vegetal *in vitro*, 42 fixaram nitrogênio atmosférico (58,3%), 28 solubilizam fosfato inorgânico (38,9%), 70 produziram AIA (97,2%) e 10 apresentaram atividade antagonica a *Bipolaris* sp. (13,9%);

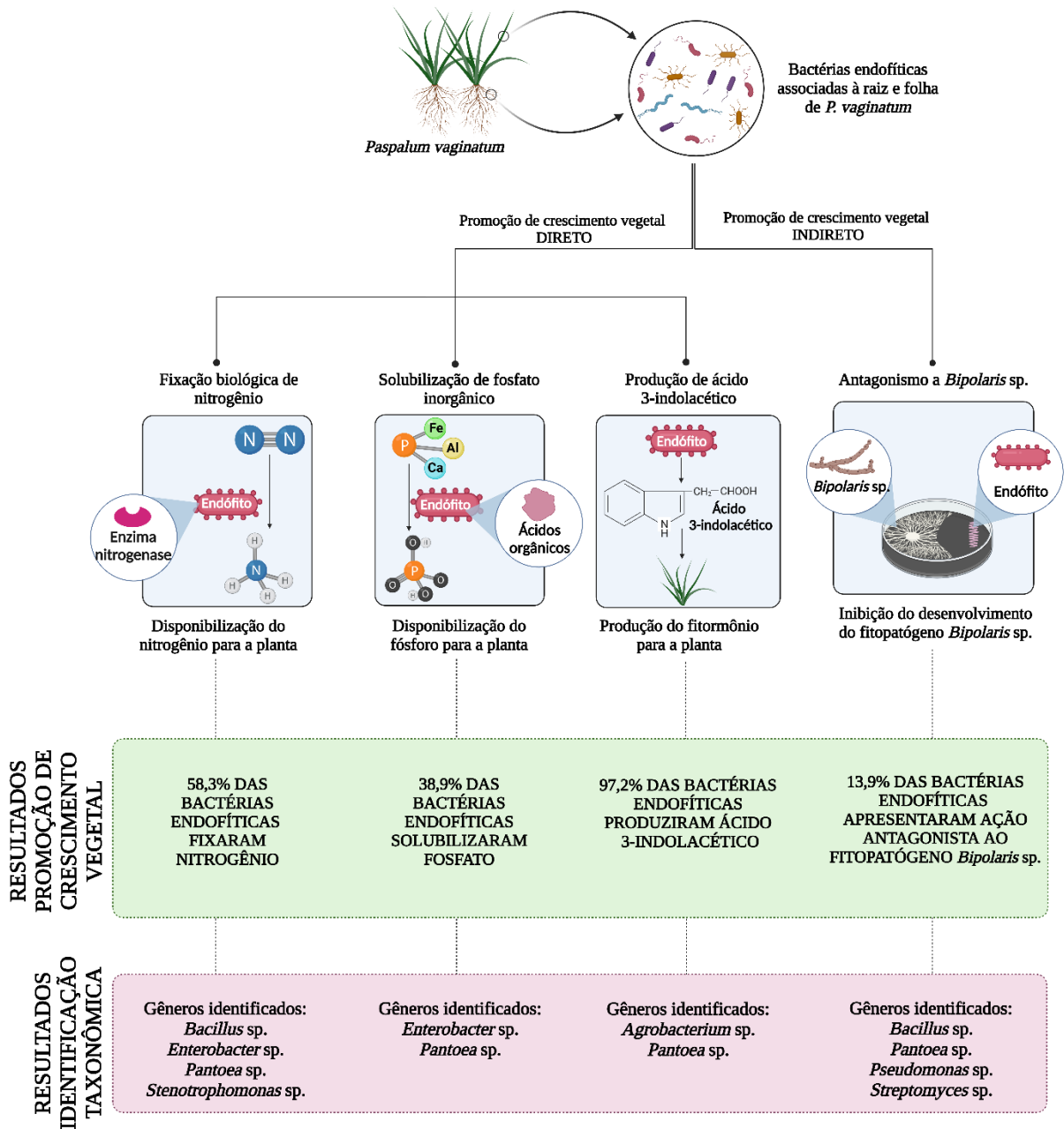
Nove isolados bacterianos endofíticos foram capazes de solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e produzir AIA simultaneamente;

De acordo com o sequenciamento do gene 16S rDNA, os isolados endofíticos selecionados pertencem aos gêneros *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. (ou *Stenotrophomonas* sp.), *Staphylococcus* sp. e *Streptomyces* sp..

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Diversos isolados bacterianos apresentaram potencial para promoção de crescimento vegetal e biocontrole e são potenciais candidatos para testes *in planta* para análise do efeito no desenvolvimento de plântulas de *Paspalum* e controle de *Bipolaris* sp..

RESUMO GRÁFICO



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFZAL, I. *et al.* Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological research**, v. 221, p. 36–49, 2019.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 2014.
- AGUIAR, A. R. **Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas em *Paspalum notatum* Flügge**. 2014. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.
- AL-SADI, A. M. *Bipolaris sorokiniana*-Induced Black Point, Common Root Rot, and Spot Blotch Diseases of Wheat: A Review. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 584899, 2021.
- ANDRADE, P. H. M. **Análise da diversidade genética e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana associada a *Coffea arabica* L. de cultivo convencional e orgânico**. Tese (Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.
- ANJOS, J. *et al.* Occurrence of *Bipolaris maydis* causing leaf spot in *Paspalum atratum* cv. ojuca in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 6, p. 656-658, 2004.
- ANTUNES, J. E. L. *et al.* Isolation and Characterization of Plant Growth-Promotion Diazotrophic Endophytic Bacteria Associated to Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Grown in Paraíba, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 65, 2022.
- AQUINO, J. P. A. DE *et al.* Plant growth-promoting endophytic bacteria on maize and sorghum1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, 2019.
- ARAÚJO, W. L. *et al.* **Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização**. 1. ed. Santarém: Universidade Federal do Oeste do Pará. 2014.
- ASSARI, A. K. *et al.* Distribution and Identification of Endophytic Species from as Potential Biocontrol Agents against Fungal Plant Pathogens. **Polish Journal of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 319-329, 2016.
- AWAIS, M. *et al.* Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 312–321, 2017.
- AZEVEDO, J. L. DE *et al.* **Biotecnologia microbiana ambiental**. Maringá: Eduem, 2018. 331 p. ISBN 978-85-7628-734-6.
- BARRATT, B. I. P. *et al.* The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. **BioControl**, v. 63, n. 1, p. 155–167, 2018.
- BATISTELA, J. C.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI JUNIOR, R. Influência da inoculação com bactérias endofíticas no desenvolvimento de plantas de milho. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 2, p. 11–18, 2018.
- BEGAM, Mst. M. *et al.* Native salt-tolerant grass species for habitat restoration, their acclimation and contribution to improving edaphic conditions: a study from a degraded mangrove in the Indian Sundarbans. **Hydrobiologia**, v. 803, n. 1, p. 373–387, 2017.
- BERRAQUERO, F. R.; BAYA, A. M.; CORMENZANA, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v. 17, n. 4, p. 399–406, 1976.
- BIANCHI, V. *et al.* Phytoremediation of contaminated sediments: evaluation of agronomic properties and risk assessment. **Chemistry and Ecology**, v. 27, sup1, p. 1–11, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. **Agrotóxicos na Ótica do Sistema Único de Saúde: relatório nacional de vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília: MS, 2016. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_agrotoxicos.pdf >. Acesso em 04 jul. 2022.
- BRASIL. Secretaria especial de assuntos estratégicos. **Plano nacional de fertilizantes 2050: Uma estratégia para os Fertilizantes no Brasil**. Brasília, 2021. Disponível em: < <https://static.poder360.com.br/2022/03/plano-nacional-de-fertilizantes-brasil-2050.pdf> >. Acesso em 04 jul. 2022.

- 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.
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 2016. 221 p. ISBN 978-85-86481-56-7.
- CARDOSO, E.J.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p. ISBN: 978-85-86481-56-7
- CATTELAN, A. J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36p. (Embrapa Soja. Documentos, 139).
- CHARCHAR, M. J. *et al.* Mancha foliar em capim-elefante no Cerrado do Brasil Central causada por *Bipolaris maydi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, p. 1637-1639, 2008.
- CHASE, A. **The North American species of Paspalum**. In: *Systematic plant studies*. Contributions from the United States National Herbarium. Washington, DC: Government Printing Office. p. 1–310, 1929.
- CHATURVEDI, H.; SINGH, V. Potential of Bacterial Endophytes as Plant Growth Promoting Factors. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 7, n. 9, 2016.
- CHEN, Y. *et al.* The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. **Applied Soil Ecology**, v. 84, p. 235–244, 2014.
- COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.
- DA SILVEIRA, A.P.D. *et al.* Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. **Antonie van Leeuwenhoek** 112, 283–295, 2019.
- DAVIES, P. J. **Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!** 3. ed. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic, 2004. xii, CP16, 750 p. ISBN 1402026854.
- DE MORAES, A. C. P. **Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas e rizosféricas de *Paspalum* spp. e nanopartículas de sílica para promoção de crescimento vegetal**. 2021.Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2021.
- DE PAULA, A. F. **Identificação taxonômica, potencial agrícola e biotecnológico de bactérias endofíticas e rizosféricas associadas a *Paspalum atratum* e *P. notatum***. 2019. Tese (Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.
- DE PAULA, A. F. *et al.* Endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and its potential for plant growth promotion with different phosphate sources. **Frontiers in plant science**, v. 13, p. 884716, 2022.
- DING, T. *et al.* An endophytic bacterial strain isolated from *Eucommia ulmoides* inhibits southern corn leaf blight. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 903, 2017.
- DING, T.; MELCHER, U. Influences of Plant Species, Season and Location on Leaf Endophytic Bacterial Communities of Non-Cultivated Plants. **PloS one**, v. 11, n. 3, e0150895, 2016.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDINI, J. I. **Como Isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI/Itaguaí, 1995.
- DUCA, D. R.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 104, n. 20, p. 8607–8619, 2020.
- DUCA, D. *et al.* Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 85–125, 2014.
- DUNCAN, R. R.; CARROW, R. N. **Seashore Paspalum: The environmental turfgrass**. Chelsea Mich.: Ann Arbor Press. xiv, 281. ISBN 978-1-575-04141-4. 2000.

- DUVEILLER, E.; GILCHRIST, L.I. Production constraints due to *Bipolaris sorokiniana* in wheat: current situation and future prospects. In: **Wheat in Warm Area, Rice-Wheat Farming Systems. Dinajpur (Bangladesh). 13-15 Feb 1993.** 1994.
- EADY, R. R.; POSTGATE, J. R. Nitrogenase. **Nature**, v. 249, n. 460, p. 805–810, 1974.
- EGAMBERDIEVA, D. *et al.* Diversity and Plant Growth-Promoting Ability of Endophytic, Halotolerant Bacteria Associated with *Tetragonia tetragonioides* (Pall.) Kuntze. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 1, 2021.
- 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, C. D. *et al.* Doenças das plantas forrageiras tropicais- mais um desafio para a agropecuária. In: XLIII Congresso Brasileiro de Fitopatologia. 2010. Disponível em: <<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/874082/1/FERNANDESETAL.DoencasdasPlantasForrageira sTropicais.pdf>>. Acesso em 20 set. 2022.
- GUPTA, G. *et al.* Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 02, 2015.
- GURGEL, R. G. A. Principais espécies e variedades de grama. In: SIMPÓSIO SOBRE GRAMADOS, 1., 2003. Botucatu: UNESP. Disponível em: <<http://infograma.com.br/wp-content/uploads/2015/10/PRINCIPAIS-ESP%C3%89CIAS-E-VARIEDADES-DE-GRAMAS.pdf>>. Acesso em 04 jul. 2022.
- GUSSIN, G. N.; RONSON, C. W.; AUSUBEL, F. M. Regulation of nitrogen fixation genes. **Annual review of genetics**, v. 20, p. 567–591, 1986.
- GYANESHWAR, P. *et al.* Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, n. 1, p. 83–93, 2002.
- HALL, T. A. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98. 1999.
- HALLMANN, J. *et al.* Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 10, p. 895–914, 1997.
- HALLMANN, J.; BERG, G. Spectrum and Population Dynamics of Bacterial Root Endophytes. In: SCHULZ, B. J. E.; BOYLE, C. J. C.; SIEBER, T. N. (Org.). **Microbial Root Endophytes**, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Soil Biology. ISBN 978-3-540-33525-2, p. 15–31, 2006.
- HOLFORD, I. C. R. Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. **Soil Research**, v. 35, n. 2, p. 227, 1997.
- HOWARD, J. B.; REES, D. C. Structural Basis of Biological Nitrogen Fixation. **Chemical reviews**, v. 96, n. 7, p. 2965–2982, 1996.
- HUE, N. V. *et al.* Reducing salinity and organic contaminants in the Pearl Harbor dredged material using soil amendments and plants. **Remediation Journal**, v. 12, n. 4, p. 45–63, 2002.
- 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, 2003.
- JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. **Microbiological research**, v. 169, n. 1, p. 83–98, 2014.
- KIM, K. Y. *et al.* Organic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter* intermedium 60-2G. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 35, n. 1, p. 59-67, 2002.
- LACAVAL, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic Bacteria: A Biotechnological Potential in Agrobiological System. In: MAHESHWARI, D. K.; SARAF, M.; AERON, A. (Org.). **Bacteria in Agrobiological System: Crop Productivity**, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN 978-3-642-37240-7, p. 1–44, 2013.
- LACAVAL, P.T.; MACHADO, P.C.; DE ANDRADE, P.H.M. **Phosphate Solubilization by Endophytes from the Tropical Plants.** In: Maheshwari D.K.; Dheeman S.. (Org.). Sustainable Development and Biodiversity. 26ed. Springer Nature Switzerland AG: Springer International Publishing, v. 3, p. 207-226, 2021.
- LARSSON, A. **AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets.** *Bioinformatics*30(22): 3276-3278. 2014.

- LEITE, M. C. de B. S. *et al.* Bioprospection and genetic diversity of endophytic bacteria associated with cassava plant. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 2, p. 315–325, 2018.
- LENNÉ, J. M. & TRUTMANN, P. (Eds.) Diseases of Tropical Pasture Plants. Wallingford: CAB International. p.404, 1994.
- LI, J. H. *et al.* Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 238–246, 2008.
- LI, S. *et al.* Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 2, e201209017, 2012.
- LIU, T. *et al.* Genetic diversity and promotion plant growth of culturable endophytic diazotrophs associated with seashore *Paspalum* cultivars. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, v. 49, n. 2-3, p. 243-257, 2021.
- LOCEY, K. J.; LENNON, J. T. Scaling laws predict global microbial diversity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 21, p. 5970–5975, 2016.
- LOIRET, F. G. *et al.* A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. **Journal of applied microbiology**, v. 97, n. 3, p. 504–511, 2004.
- LONARD, R. I.; JUDD, F. W.; STALTER, R. Biological Flora of Coastal Dunes and Wetlands: *Paspalum vaginatum* Sw. **Journal of Coastal Research**, v. 31, n. 1, p. 213, 2015.
- MACHADO, P. C. **Identificação molecular e caracterização bioquímica de bactérias endofíticas associadas à cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) Com potencial biotecnológico.** 2015. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.
- MANAMGODA, D. S. *et al.* The genus *Bipolaris*. **Studies in mycology**, v. 79, p. 221–288, 2014.
- 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.
- MARIANO, R. L. R. Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. **Revisão Anual de patologia de Plantas**, v. 1, p. 369-409, 1993.
- MENDOZA-ARROYO, G. E. *et al.* Inorganic Phosphate Solubilization by a Novel Isolated Bacterial Strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and Its Application Potential as Biofertilizer. **Agriculture**, v. 10, n. 9, p. 383, 2020.
- MORANDI, M. A. B., PAULA JÚNIOR, T. J., BETTIOL, W., & TEIXEIRA, H. Controle biológico de pragas, doenças e plantas invasoras. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 30, n. 251, p. 73-82. 2009.
- MOREIRA, F. M. de S., *et al.* Diazotrophic associative bacteria: diversity, ecology and potential applications. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74–99, 2010.
- MORGULIS A., COULOURIS G., RAYTSELIS Y., MADDEN T.L., AGARWALA R., & SCHÄFFER A.A. "Database indexing for production MegaBLAST searches." *Bioinformatics* 15:1757-1764. 2008.
- MUANGTHONG, A.; YOUNG, S.; RERKASEM, B. Isolation and Characterisation of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane. **Tropical life sciences research**, v. 26, n. 1, p. 41–51, 2015.
- NAG, P.; SHRITI, S.; DAS, S. Microbiological strategies for enhancing biological nitrogen fixation in nonlegumes. **Journal of applied microbiology**, v. 129, n. 2, p. 186–198, 2020.
- NELSON, D. L.; DA VEIGA, A. B. G.; TERMIGNONI, C. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p. ISBN 9788582710722.
- NTOULAS, N.; VARSAMOS, I. Performance of Two Seashore *Paspalum* (*Paspalum vaginatum* Sw.) Varieties Growing in Shallow Green Roof Substrate Depths and Irrigated with Seawater. **Agronomy**, v. 11, n. 2, p. 250, 2021.
- OLIVEIRA, C. A. *et al.* Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1782–1787, 2009.

- OLIVEIRA, J. T. C. *et al.* Plant growth-promoting mechanisms and genetic diversity of bacteria strains isolated from *Brachiaria humidicola* and *Brachiaria decumbens*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, n. 4, e20191123, 2021.
- OTEINO, N. *et al.* Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 745, 2015.
- PATEL, H. A. *et al.* Isolation and Characterization of Bacterial Endophytes from *Lycopersicon esculentum* Plant and their Plant Growth Promoting Characteristics. **Nepal Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 37–52, 2012.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207–220, 1996.
- PELZER, G. Q. *et al.* Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias. **Tropical Plant Pathology**, v. 36, n. 2, p. 95–103, 2011.
- PEÑUELAS, J. *et al.* Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest. **Plant biology**, v. 14, n. 4, p. 565–575, 2012.
- PRAYOGO, F. A. *et al.* Metagenomic applications in exploration and development of novel enzymes from nature: a review. **Journal, genetic engineering & biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 39, 2020.
- QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, n. 1, p. 89–96, 2001.
- RANI, L. *et al.* An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of Cleaner Production**, v. 283, p. 124657, 2021.
- RAVEN, P. H. *et al.* **Raven: Biologia vegetal**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 856 p. ISBN 9788527723626.
- RECHCIGL, J. E. **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**: CRC Press, 2018. ISBN 978-1-315-89272-6.
- REIS, M. R. *et al.* Impacto do glyphosate associado a inseticida e fungicida na atividade microbiana e no potencial de solubilização de fosfato em solo cultivado com soja Roundup Ready. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 729–737, 2009.
- RODRIGUES, A. A. *et al.* Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 2, p. 149–158, 2016.
- SAVARY, S. *et al.* The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature ecology & evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019.
- SHAH, D. *et al.* Molecular and Biochemical Characterization, Antimicrobial Activity, Stress Tolerance, and Plant Growth-Promoting Effect of Endophytic Bacteria Isolated from Wheat Varieties. **Microorganisms**, v. 10, n. 1, 2021.
- SICILIANO, S. D. *et al.* Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2469–2475, 2001.
- SIEVERS F. *et al.* **Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega**. *Mol. Syst. Biol.* 7:539. (2011).
- 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, p. 311–319, 2000.
- SILVA, C. de F. *et al.* Soil microbiological activity and productivity of maize fodder with legumes and manure doses. **Revista Caatinga**, v. 31, n. 4, p. 882–890, 2018.
- SIMÕES, W. L. *et al.* Efficient inoculation of diazotrophic bacteria into sugarcane by the drip irrigation system. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 54, 2019.
- SOLANKI, M.; KUNDU, B. S.; NEHRA, K. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. **Annals of Agrarian Science**, v. 16, n. 4, p. 458–463, 2018.
- SOUCHIE, E. L.; ABOUD, A. C. de S. Solubilização de fosfato por microrganismos rizosféricos de genótipos de Guandu cultivados em diferentes classes de solo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 11, 2009.

- SZILAGYI-ZECCHIN, V. J. *et al.* Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**, v. 4, p. 26, 2014.
- TAIZ, L. *et al.* **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. 858 p. ISBN 978-8582713662.
- TAIZ, L. *et al.* **Plant physiology and development**. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2015a. 761 p. ISBN 1605352551.
- TAIZ, L., *et al.* **Plant physiology and development**. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates Inc. Publishers, 2015b. 761 p. ISBN 9781605352558.
- TAURIAN, T. *et al.* Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. **Plant and Soil**, v. 329, 1-2, p. 421–431, 2010.
- TAVANTI, T. R. *et al.* Ocorrência de mancha foliar de *Bipolaris maydis* em capim tanzânia na região norte do Mato Grosso. 2016.
- TEYMOURI, M. *et al.* Assessment of phosphate solubilization activity of Rhizobacteria in mangrove forest. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 168–172, 2016.
- TISDALE, S. L. **Soil fertility and fertilizers**. 5. ed. Upper Saddle River N.J.: Prentice Hall, 1993. 648 p. ISBN 978-0024208354.
- TSAVKELOVA, E. A. *et al.* Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 117–126, 2006.
- UNGARATTI, A.; GOMES, R.; VIEIRA, J. Enzimas de interesse comercial isoladas de bactérias endofíticas da erva-daninha *Tridax procumbens* (L.) (erva-de-touro). **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 34, 2020.
- VANDE BROEK, A. *et al.* Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1338–1342, 1999.
- VANDENKOORNHUYSE, P. *et al.* The importance of the microbiome of the plant holobiont. **The New phytologist**, v. 206, n. 4, p. 1196–1206, 2015.
- VERMA, S. K. *et al.* Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. **Journal of applied microbiology**, v. 122, n. 6, p. 1680–1691, 2017.
- 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, 2-3, p. 127–141, 2001.
- VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.
- VILLA-RODRIGUEZ, E. *et al.* *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). **Biological control**, v. 132, p. 135-143, 2019.
- WAHYUDI, A. T. *et al.* 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, p. 34–40, 2011.
- WANG, Y. *et al.* The diversity and potential function of endophytic bacteria isolated from *Kobresia capillifolia* at alpine grasslands on the Tibetan Plateau, China. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 9, p. 2153–2162, 2016.
- YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H. and CHUN, J. **Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies**. *Int J Syst Evol Microbiol.* 67:1613-1617. 2017.
- ZENGERER, V. *et al.* *Pseudomonas orientalis* F9: A Potent Antagonist against Phytopathogens with Phytotoxic Effect in the Apple Flower. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 145, 2018.
- ZHANG, X. Biogeochemistry: A plan for efficient use of nitrogen fertilizers. **Nature**, v. 543, n. 7645, p. 322–323, 2017.
- ZHANG Z., SCHWARTZ S., WAGNER L., & MILLER W. "A greedy algorithm for aligning DNA sequences" *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14. 2000.

ZHAO, L.; XU, Y.; LAI, X. 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.

ZICCA, S. *et al.* Antagonistic activity of olive endophytic bacteria and of *Bacillus* spp. strains against *Xylella fastidiosa*. **Microbiological research**, v. 236, p. 126467, 2020.

ZIHONG, S. *et al.* Studies on the population and dynamic analysis of peanut endophytes. **Acta Phytophylacica Sinica**, v. 236, p. 309–314, 1999.

ZULOAGA, F. & MORRONE, O. **Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur Austral** (Argentina, Bolivia, sur de Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). v. 102, p. 1-297, 2005.