



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
COM POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

GABRIELLE ALVES BEZERRA

Araras

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE CANA-DE-AÇÚCAR
COM POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

GABRIELLE ALVES BEZERRA

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

COORDINADORA: PROFA. DRA. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM PRODUÇÃO VEGETAL E BIOPROCESSOS ASSOCIADOS

Araras

2021

Alves Bezerra, Gabrielle

Isolamento e seleção de microrganismos de cana-de-açúcar com potencial de promoção de crescimento vegetal / Gabrielle Alves Bezerra -- 2021.
66f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Sandra Regina Ceccato Antonini
Banca Examinadora: Jerri Edson Zilli, Renato Nallin Montagnolli
Bibliografia

1. Produção vegetal. 2. Bioprospecção de microrganismos. 3. Cana-de-açúcar. I. Alves Bezerra, Gabrielle. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias

Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Gabrielle Alves Bezerra, realizada em 27/08/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri (UFSCar)

Prof. Dr. Jerri Édson Zilli (EMBRAPA)

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (UFSCar)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Pós-graduação em Produção Vegetal e Bioprocessos Associados, coordenação, corpo docente e secretárias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos (código de financiamento 001).

À Fundação de Apoio Institucional ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FAI), e ao Diretor da UFSCar - *Campus* Araras, Prof. Dr. Ricardo Toshio Fujihara pela bolsa de extensão.

Ao Centro de Citricultura Sylvio Moreira – Instituto Agrônomo de Campinas, Cordeirópolis – SP por ter cedido as sementes de *Arabidopsis thaliana*.

Ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), onde desenvolvi este trabalho, a todos os integrantes que compartilharam a vivência acadêmica comigo.

Às Profas. Dras. Márcia Maria Rosa Magri e Sandra Regina Ceccato Antonini por me orientarem neste trabalho com muitos ensinamentos, dedicação e paciência, e por todo suporte profissional e emocional.

Ao Prof. Dr. Christiann Davis Tosta do Instituto Federal de São Paulo – *Campus* de Matão pela confecção do gráfico de Análise de Componente Principal (PCA).

À Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias – *Campus* de Araras, em que fiz parte durante sete anos entre graduação e pós-graduação.

À minha família, por todo apoio e incentivo para que eu trilhasse essa caminhada.
Aos meus amigos que sempre torcem por mim.

E por último, mas não menos importante, agradeço a Deus por me sustentar dia após dia e me capacitar para ir em busca dos meus objetivos.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	03
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	04
3.1 Promoção de crescimento vegetal por micro-organismos.....	04
3.2 Microrganismos endofíticos.....	05
3.3 Microrganismos do solo e da rizosfera.....	06
3.4 Microrganismos na cana-de-açúcar.....	07
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
4.1 Isolamento de microrganismos da cana-de-açúcar.....	10
4.1.1 Coleta das amostras.....	10
4.1.2 Plaqueamento das amostras de solo.....	11
4.1.3 Plaqueamento do solo rizosférico.....	12
4.1.4 Plaqueamento de endofíticos de raízes.....	12
4.1.5 Isolamento das colônias em desenvolvimento das amostras plaqueadas.....	13
4.2 Avaliação dos microrganismos quanto ao controle biológico de fungos fitopatogênicos.....	13
4.3 Produção de ácido indolacético (AIA) por micro-organismos.....	15
4.4 Solubilização de fosfatos por micro-organismos.....	17
4.5 Análise de Componente Principal.....	17
4.6 Promoção de crescimento de <i>Arabidopsis thaliana in vitro</i>	17
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5.1 Isolamento de micro-organismos.....	19
5.2 Avaliação dos microrganismos quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos.....	21
5.3 Produção de ácido indolacético por micror-	

	ganismos.....	27
5.4	Solubilização de fosfato por microrganismos.....	31
5.5	Análise de Componente Principal dos isolados e mecanismos de promoção de crescimento vegetal.....	37
5.6	Avaliação do efeito de isolados de cana-de-açúcar na promoção de crescimento de <i>Arabidopsis thaliana in vitro</i>.....	39
6	CONCLUSÕES.....	43
7	LITERATURA CITADA.....	45

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Microrganismos endofíticos quanto ao controle do fitopatógeno..	21
Tabela 2. Microrganismos rizosféricos quanto ao controle de fitopatógenos.	23
Tabela 3. Microrganismos do solo quanto ao controle de fitopatógenos.....	25
Tabela 4. Microrganismos endofíticos quanto à produção de AIA.....	27
Tabela 5. Microrganismos rizosféricos quanto a produção de AIA.....	29
Tabela 6. Microrganismos do solo quanto a produção de AIA.....	30
Tabela 7. Solubilização de fosfato pelos isolados endofíticos.....	32
Tabela 8. Solubilização de fosfato pelos isolados da rizosfera.....	33
Tabela 9. Solubilização de fosfato pelos isolados de solo.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Imagem de satélite do CCA/UFSCar, campus de Araras. Coleta das amostras realizada na área em destaque em amarelo (Fonte: Google Earth)..	10
Figura 2. Foto de uma das plantas amostradas no trabalho.....	11
Figura 3. Ilustração do teste de antagonismo em placa com a inoculação de (A) - bactérias (círculo) e fungo patogênico (quadrado); inoculação de (B) - fungo filamentososo ou levedura (círculo) e o fungo fitopatogênico (quadrado)...	14
Figura 4. Exemplos da escala de controle atribuída. A: O patógeno cresce até o limite do isolado (+). B: O antagonista cresce por cima do patógeno (++) . C: Há formação de halo de inibição (+++).....	15
Figura 5. Representação da escala de produção de AIA. (+-) pouco, (+) médio e (++) muito.....	16
Figura 6. Distribuição dos isolados de acordo com o tipo microbiano e o local de origem. Azul – bactérias, laranja – fungos filamentosos, cinza – leveduras.	20
Figura 7. Antagonismo do isolado ENDO68 contra o fitopatógeno <i>F. verticillioides</i>	21
Figura 8. Teste de antagonismo dos isolados rizosféricos contra o fitopatógeno <i>F. verticillioides</i>	24
Figura 9. Teste de antagonismo dos isolados de solo contra o fitopatógeno <i>Fusarium verticillioides</i>	26
Figura 10. Isolados bacterianos endofíticos que tiveram alta produção de AIA.....	28
Figura 11. Isolados rizosféricos que apresentaram média produção de AIA.....	29
Figura 12. Isolado do solo com média produção de AIA.....	30
Figura 13. Isolados de endosfera com resultados positivos no teste de solubilização de fosfato.....	33
Figura 14. Isolados de rizosfera com resultados positivos no teste de solubilização de fosfato.....	34
Figura 15. Isolados do solo com resultados positivos no teste de solubilização de fosfato.....	36
Figura 16. Análise de Componente Principal dos isolados de solo (SOL, cor roxa), endosfera (ENDO, cor laranja) e rizosfera (RIZ, cor verde) e mecanismos de promoção de crescimento, indicados nos vetores. Os	

círculos indicam os agrupamentos de isolados com mais de um mecanismo de produção vegetal.....	38
Figura 17. Aspecto das placas (parte superior) e das células (parte inferior) da levedura SOL88, do fungo filamentoso RIZ85 e da bactéria ENDO26 em meio YEPD, BDA e Ágar Nutriente, respectivamente. As fotos das células ao microscópio foram tiradas no aumento de 400 X.....	40
Figura 18. Comprimento de raiz de mudas de <i>A. thaliana</i> inoculada com isolados de cana-de-açúcar <i>in vitro</i> . Os valores do eixo y foram calculados através da média de cinco plantas por placa, seguido da média das três placas.....	40
Figura 19. Cultivo de <i>A. thaliana</i> com os isolados de cana-de-açúcar. A: controle, B: fungo filamentoso RIZ85, C: bactéria ENDO26, e D: levedura SOL88.....	41

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS DE CANA-DE-AÇÚCAR COM POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL

Autora: GABRIELLE ALVES BEZERRA

Orientadora: Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Co-orientadora: Profa. Dra. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

RESUMO

Microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) são conhecidos por estabelecerem relações positivas com as plantas. Podem habitar o solo, a rizosfera e o interior dos tecidos vegetais, constituindo grande parte da microbiota da planta. Atuam no favorecimento da nutrição vegetal, com a fixação de nitrogênio e/ou solubilização de minerais, na produção de fitohormônios, no controle de agentes patogênicos, e/ou na promoção da tolerância da planta aos estresses abióticos. Estes microrganismos têm proporcionado resultados positivos em diversas culturas de importância econômica, podendo atuar como alternativa ao uso de insumos químicos, minimizando custos de produção e tornando as práticas agrícolas mais sustentáveis. Diante disso, este trabalho teve como objetivo isolar e analisar micro-organismos de solo, rizosfera e endosfera de raiz de cana-de-açúcar, para prospectar bactérias, fungos e leveduras com potencial para promoção de crescimento vegetal. As amostras foram plaqueadas em meio NA (bactérias), BDA (fungos filamentosos) e YEPD (leveduras). As colônias morfológicamente distintas foram isoladas em cultura pura e analisadas quanto a capacidade de produzir ácido indolacético (AIA), solubilizar fosfato e controlar o desenvolvimento do fitopatógeno *Fusarium verticillioides*. Foram obtidos 281 isolados no total, sendo 112 do solo, 96 de rizosfera e 73 de endosfera de raiz de cana-de-açúcar. Foi observado prevalência de bactérias (223 isolados), seguido de fungos filamentosos (60 isolados) e, por último, em menor número, as leveduras (9 isolados). Dentre os mecanismos avaliados, houve maior número de produtores de AIA isolados da endosfera, um maior número de solubilizadores de fosfato isolados do solo, e um maior número de antagonistas ao fitopatógeno isolados da rizosfera. As bactérias também se destacaram em todos os mecanismos avaliados, provavelmente devido a sua prevalência nos ambientes estudados. Foram poucos os isolados que apresentaram mais de um mecanismo de promoção de crescimento vegetal. A bactéria ENDO26, isolada da endosfera, foi a única que apresentou resultado positivo para os três mecanismos. Além da ENDO26, outros dois isolados foram selecionados: SOL88, uma levedura isolada de solo, que apresentou resultado positivo para solubilização de fosfato e produção de AIA e RIZ85, fungo isolado da rizosfera, que produziu AIA e apresentou antagonismo contra o fitopatógeno. Estes três isolados foram avaliados em placa com *Arabidopsis thaliana*, para verificar a capacidade de promover o desenvolvimento do vegetal, porém não houve promoção de crescimento da espécie *in vitro*. A identificação dos isolados e testes mais aprofundados com outras espécies vegetais são necessários para verificar o potencial de emprego dessas linhagens como promotoras de crescimento vegetal.

Palavras-chave: microbiota vegetal, agricultura sustentável, bioprospecção, promoção de crescimento, cana-de-açúcar

ISOLATION AND SELECTION OF SUGAR CANE MICROORGANISMS WITH POTENTIAL TO PROMOTE VEGETABLE GROWTH

Author: GABRIELLE ALVES BEZERRA

Adviser: Prof. Dr. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Co-adviser: Prof. Dr. MÁRCIA MARIA ROSA MAGRI

ABSTRACT

Plant growth promoting microorganisms (PGPM) are known to establish positive relationships with plants. They can inhabit the soil, the rhizosphere and the interior of plant tissues, making up a large part of the plant microbiota. They act in favor of plant nutrition, with nitrogen fixation and/or mineral solubilization, in the production of phytohormones, in the control of pathogens, and/or in the promotion of plant tolerance to abiotic stresses. These microorganisms have provided positive results in several economically important crops and can act as an alternative to the use of chemical inputs, minimizing production costs and making agricultural practices more sustainable. Therefore, this work aimed to isolate and analyze microorganisms from soil, rhizosphere and sugarcane root endosphere, to prospect bacteria, fungi and yeasts with potential to promote plant growth. The samples were plated on NA (bacteria), PDA (filamentous fungi) and YEPD (yeast) medium. Morphologically distinct colonies were isolated in pure culture and analyzed for their ability to produce indoleacetic acid (IAA), solubilize phosphate and control the development of phytopathogen *Fusarium verticillioides*. A total of 281 isolates were obtained, 112 from the soil, 96 from the rhizosphere and 73 from the sugarcane root endosphere. A prevalence of bacteria (223 isolates) was observed, followed by filamentous fungi (60 isolates) and, finally, in a smaller number, yeasts (9 isolates). Among the mechanisms evaluated, there was a greater number of AIA producers isolated from the endosphere, a greater number of phosphate solubilizers isolated from the soil, and a greater number of antagonists to the phytopathogen isolated from the rhizosphere. Bacteria also stood out in all evaluated mechanisms, probably due to their prevalence in the studied environments. Few isolates showed more than one plant growth promotion mechanism. The ENDO26 bacterium, isolated from the endosphere, was the only one that showed positive results for the three growth promotion mechanisms. In addition to ENDO26, two other isolates were selected: SOL88, a yeast isolated from soil, which showed positive results for phosphate solubilization and AIA production, and RIZ85, a fungus isolated from the rhizosphere, which produced AIA and presented antagonism against the phytopathogen. These three isolates were evaluated on a plate with *Arabidopsis thaliana*, to verify their ability to promote plant development, however, they did not promote the plant growth *in vitro*. The identification of isolates and more in-depth tests with other plant species are necessary to verify the potential for using these strains as plant growth promoters.

Key-words: plant microbiota, sustainable agriculture, bioprospecting, plant growth promotion, sugarcane

1. INTRODUÇÃO

As plantas são seres holobiontes, isto é, possuem microrganismos associados, dentro e fora dos seus tecidos, os quais constituem o microbioma vegetal. Esses microrganismos podem estabelecer relações mutualísticas, comensalistas e/ou parasitárias com as plantas (SCHLAEPPI; BULGARELLI, 2015). Aqueles que promovem interações positivas podem beneficiar as plantas controlando fitopatógenos e/ou promovendo seu crescimento através de diferentes mecanismos (OROZCO-MOSQUEDA *et al.*, 2018). Esse grupo é chamado de microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma cultura de grande importância econômica, utilizada na alimentação humana, animal e como matéria-prima na indústria, para a produção de combustíveis e energia (CONAB, 2019; 2020). Devido a demanda crescente por aumento de produtividade, essa cultura requer o uso de grande quantidade de fertilizantes, defensivos e outros insumos. O emprego desses produtos encarece a produção, além de causar possíveis danos à saúde humana e ao meio ambiente, por serem, muitas vezes, compostos por moléculas tóxicas, carcinogênicas e poluentes. Com isso, estudos utilizando a aplicação de MPVC têm sido realizados, por serem constituídos por organismos autóctones, que não causam prejuízo ao ambiente, ao produtor e ao consumidor. Além disso, estudos preliminares mostraram que o emprego de MPCV traz resultados promissores no incremento de produtividade da cana-de-açúcar, com o

aumento da massa seca de raiz e parte aérea, e proporciona o acúmulo de nitrogênio no solo, favorecendo a nutrição da cultura (SANTOS *et al.*, 2019).

O conhecimento sobre os MPVC tem levado à produção e comercialização de produtos constituídos por microrganismos (JOHNS *et al.*, 2016), como biofertilizantes, fitoestimulantes e biopesticidas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; BHARDWAJ *et al.*, 2014; PÉREZ-MONTAÑO *et al.*, 2014). A proposta desses produtos é melhorar a produtividade das culturas, reduzindo a utilização de fertilizantes e defensivos químicos, e aumentando a tolerância das plantas a estresses (DE-LA-PEÑA; LOYOLA-VARGAS, 2014). O emprego de tecnologias com base em microrganismos tem como principal alvo a agricultura mais sustentável, econômica e socialmente justa (SOUZA *et al.*, 2016).

Considerando o exposto, o objetivo do presente estudo foi realizar o isolamento e a seleção de microrganismos da endosfera, rizosfera e solo de cana-de-açúcar, para a prospecção de linhagens com potencial para serem empregadas como promotores de crescimento vegetal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Isolar e selecionar microrganismos cultiváveis do solo, rizosfera e endosfera de cana-de-açúcar, com potencial para promoção de crescimento vegetal

2.2. Objetivos específicos

- Isolar bactérias, leveduras e fungos filamentosos de solo, rizosfera e endosfera de cana-de-açúcar;
- Quantificar os isolados cultiváveis considerando os diferentes locais de origem (solo, rizosfera e endosfera);
- Avaliar os isolados quanto a presença de mecanismos relacionados à promoção de crescimento vegetal (produção de ácido indolacético, solubilização de fosfato e controle biológico de fitopatógeno) *in vitro*;
- Avaliar os isolados que se destacaram quanto ao estímulo do desenvolvimento radicular e de parte aérea de *Arabidopsis thaliana in vitro*.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Promoção de crescimento vegetal por microrganismos

As plantas são seres vivos que, por não se locomoverem, precisaram evoluir e adaptar-se ao meio em que vivem como forma de obtenção de nutrientes e proteção contra agentes agressores. Dentre essas adaptações há a interação com microrganismos que habitam o solo. Fotoassimilados secretados pelas raízes das plantas, chamados exsudatos, compostos por açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, proteínas, lipídios e metabólitos secundários (BADRI; VIVANCO, 2009; RASMANN; TURLINGS, 2016), trabalham como sinais para mediar as interações entre plantas e micro-organismos.

Uma grande diversidade microbiana é encontrada na filosfera, superfície da planta, principalmente das folhas (BARRERA; SARANGO-FLÓRES; MONTENEGRO-GÓMEZ, 2019), na endosfera, interior dos tecidos vegetais, e rizosfera, região adjacente às raízes (BARBOSA, *et al.*, 2015). Estes microrganismos podem exercer interações positivas (promover a tolerância dos vegetais a estresses e estimular seu crescimento) e/ou negativas (causar doenças) (NEWTON *et al.*, 2010). Os microrganismos que interagem de forma positiva ou benéfica são chamados de microrganismos promotores de crescimento vegetal (MPCV) (SCHALAEPPPI; BULGARELLI, 2015). Dentre os benefícios que esses microrganismos fornecem às plantas estão o aumento do suprimento de

nutrientes, produção de fitohormônios, controle de patógenos e pragas, além de promover maior tolerância da planta a estresses bióticos e abióticos (SHASTRI; KUMAR, 2019).

Os MPVC podem favorecer a nutrição das plantas através da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e/ou zinco, mobilização de potássio e acumulação de ferro através da produção de sideróforos (SHASTRI; KUMAR, 2019; VESSEY, 2003). Podem promover o crescimento das plantas, de forma mais direta, produzindo hormônios vegetais como auxina, que estimula o desenvolvimento das raízes aumentando a absorção de água e nutrientes, citocinina, que promove a divisão celular, e giberelina, que induz alongamento do caule e aumenta a absorção de nitrogênio (OLANREWAJU *et al.*, 2017). Outro mecanismo é o controle de fitopatógenos; as principais formas de controle são antibiose (AMPRAYN *et al.*, 2012), competição por nutrientes e indução de resistência sistêmica vegetal. Este último ocorre pelas sinalizações de hormônios como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno. Além disso há micro-organismos que produzem a enzima 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase), responsável por diminuir os níveis de etileno na planta (SHASTRI; KUMAR, 2019; SINGH *et al.*, 2019) tornando a planta menos susceptível a estresses, promovendo a manutenção da produção mesmo em variações de condições ambientais (alterações de temperatura, umidade, etc).

3.2. Microrganismos endofíticos

A endosfera é o ambiente no interior dos tecidos vegetais, e os microrganismos que o habitam são chamados de endofíticos, e é um ambiente protegido de interferências ambientais diretas (SENTHILKUMAR *et al.*, 2011). Bactérias, por exemplo, podem colonizar o interior das plantas e estabelecer uma relação mutualística. Esta relação é iniciada com o estímulo à colonização do vegetal por sinalizações radiculares (exsudatos); uma vez dentro dos tecidos da raiz, as bactérias podem colonizar as demais estruturas como caules e folhas. Além de colonizar as plantas pelas raízes, as bactérias podem adentrar os tecidos vegetais através das aberturas naturais, como os estômatos nas folhas, ou por ferimentos (AFZAIL *et al.*, 2019). Estruturas bacterianas como flagelos e fímbrias que facilitam a locomoção e fixação da célula nos tecidos vegetais, o genótipo da planta, fatores bióticos e abióticos, e disponibilidade de nutrientes e luz, são

importantes para o estabelecimento do microrganismo no hospedeiro (KUMAR *et al.*, 2020).

Há muitos microrganismos endofíticos promotores de crescimento vegetal (KANDEL *et al.*, 2017), como as bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* e *Azorhizobium* que colonizam as raízes de leguminosas formando nódulos, nos quais realiza a fixação biológica de nitrogênio (BARBOSA *et al.*, 2015; HUNGRIA *et al.*, 2001;). Outras bactérias endofíticas demonstraram eficácia no controle de fitopatógenos e produção de ácido indolacético (KANDEL *et al.*, 2017). Leveduras também estão entre os MPVC endofíticos, sendo capazes de produzir compostos voláteis inibidores de crescimento de fungo patogênico e AIA (NUTARATAT *et al.*, 2014).

A simbiose de fungos micorrízicos é outra associação benéfica, em que o fungo coloniza o córtex radicular e seu micélio externo serve como uma extensão da raiz, aumentando a área de absorção de nutrientes da planta. Essa associação acontece em solos com deficiência, principalmente de fósforo; o fungo auxilia a planta na absorção de diferentes nutrientes como fósforo, nitrogênio, cobre e zinco (FERROL; AZCÓN-AGUILAR; PÉREZ- TIENDA, 2019). Os fungos micorrízicos também podem atuar no controle de fitopatógenos de solo (RAVNSKOV; CABRAL; LARSEN, 2020). A contra partida da planta para o fungo micorrízico é o fornecimento de carboidratos derivados da fotossíntese (RASMANN; TURLINGS, 2016). Os benefícios proporcionados pelos fungos micorrízicos às plantas são de grande importância, considerando que favorece a nutrição vegetal, principalmente de fósforo; plantas bem nutridas tem maior tolerância a estresses (FERROL; AZCÓN-AGUILAR; PÉREZ- TIENDA, 2019), o que conseqüentemente, resulta em maior produtividade.

3.3. Microrganismos do solo e da rizosfera

O solo é um ambiente de grande diversidade e quantidade de microrganismos (VOGEL *et al.*, 2009). No solo, os diferentes grupos microbianos atuam nos ciclos biogeoquímicos, na mineralização da matéria orgânica, na formação de agregados, excretam proteínas e polissacarídeos, e são responsáveis pelo controle da diversidade vegetal (LAMBAIS *et al.*, 2005).

A rizosfera é a região do solo próxima às raízes. Sua comunidade microbiana é diferente comparada ao solo, sendo deste último mais reduzida (SUGIYAMA,

2019). Na rizosfera as interações entre as plantas e os micro-organismos são mediadas pelos exsudatos radiculares, os quais são específicos para cada espécie vegetal. Além disso, os exsudatos podem variar devido a fatores como atividade fotossintética, estágio de desenvolvimento da planta e tipo de solo (MOMMER *et al.*, 2016; SASSE *et al.*, 2017). A presença de determinadas espécies microbianas na rizosfera também pode estimular a produção de exsudatos radiculares, mostrando que a comunicação entre os vegetais e os micro-organismos rizosféricos é uma via dupla; exemplo disso é o estudo de Liu *et al.* (2016), mostrando que plantas de pepino cultivadas com *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 secretam maior quantidade de triptofano em seu exsudato, precursor para a síntese de AIA, aumentando assim a síntese do hormônio vegetal na rizosfera.

Bacillus velezensis XT1 foi capaz de promover aumento do peso fresco de culturas de tomate, abóbora, pimenta, pepino, e maior número de flores, folhas e frutos em tomate (TORRES *et al.*, 2019). Outras características como produção de antioxidantes e indução de resistência sistêmica foi relatada em *Bacillus subtilis* isolada de rizosfera (HASHEM; TABASSUM; ALLAH, 2019).

Leveduras *Aureobasidium pullulans* e *Rhodotorula mucilaginosa* (isoladas de solo) produzem AIA e inibem fungos fitopatogênicos como *Fusarium graminearum* e, *Phytophthora infestans in vitro* (IGNATOVA *et al.*, 2015). Mudanças de tomate inoculadas com *Torulaspora globosa* apresentaram maior comprimento e maior peso seco de raiz, devido a sua capacidade em produzir AIA e solubilizar fósforo (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

3.4. Microrganismos na cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) é uma cultura pertencente à família Poaceae, de grande importância por ser uma alternativa para biocombustível, devido a produção de etanol e também a produção de açúcar, sendo o Brasil o maior produtor mundial (CONAB, 2020).

Bactérias como *B. subtilis*, *Paenibacillus*, *B. methylotrophicus*, *Burkholderia* sp., *Herbaspirillum seropecicae*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Methylobacterium organophilum* entre outras endofíticas, foram isoladas de caules e folhas de cana-de-açúcar. Essas bactérias possuem relevância para agricultura, pois apresentam atividade de nitrogenase, solubilização de fosfato, produção de

hormônios, compostos antagonistas a patógenos, produção de ACC deaminase (ANTUNES *et al.*, 2017).

Diferentes isolados com características de promotores de crescimento foram obtidos da rizosfera e tecidos de cana-de-açúcar; a inoculação da bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* VI27 (isolada da rizosfera) em cana promoveu aumento de sólidos solúveis e rendimento do caldo (BENEDUZI *et al.*, 2013). As bactérias *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Herbaspirillum seropedicae* (isolada de raiz), *Nitrospirillum amazonense* (isolada de raiz) e *Paraburkholderia tropica* (isolada do nó) inoculadas em mudas de cana-de-açúcar proporcionaram melhor desenvolvimento vegetal, com aumento da massa seca das raízes e maior acúmulo de nitrogênio (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Estudos com o emprego dessas bactérias em mudas pré- brotadas mostraram que a inoculação promove a diminuição do tempo das mudas em casa- de-vegetação e a melhora na taxa de estabelecimento no campo (SANTOS *et al.*, 2018). Além do aumento da produtividade, *Ochrobactrum intermedium* e *Escherichia* sp. isolados da rizosfera da cana-de-açúcar podem controlar fitopatógenos como *Colletotrichum falcatum*, responsável pela doença podridão vermelha que afeta o caule da planta consumindo a sacarose, ambas também produziram AIA, solubilizaram fosfatos e fixaram nitrogênio (PATEL *et al.*, 2019).

Outras bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Stenotrophomonas* também estabelecem associação com cana-de-açúcar, e estudos demonstram que essas bactérias podem ser inoculadas individualmente ou co-inoculadas, podendo reduzir a fertilização de nitrogênio (LIRA *et al.*, 2020). No trabalho de Lira *et al.* (2020) foram testadas as bactérias *Burkholderia tropica*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum seropedicae* como inoculantes em cana-de-açúcar, e promoveram resultados positivos, aumentando os nutrientes nitrogênio, zinco e ferro.

Além das bactérias, leveduras também habitam a cultura da cana-de-açúcar, e podem apresentar mecanismos relacionados à promoção de crescimento vegetal. Diversas cepas de leveduras isoladas do filopiano de folhas de cana-de-açúcar na Tailândia, entre elas *Candida* sp., *Torulaspota* sp., *Kluyveromyces* sp., *Rhodosporidium* sp. e *Rhodotorula* sp., foram testados quanto a produção de ácido indolacético, e a espécie *Rhodosporidium fluviale* DMKU-RK253 foi a maior produtora (LIMTONG *et al.*, 2014).

A levedura *Torulaspora globosa* 5S55, isolada da rizosfera de cana-de-açúcar, apresentou resultados positivos quanto a produção de AIA, solubilização de fosfato, e controle de fitopatógenos (ROSA, 2009; ROSA *et al.*, 2010; ROSA-MAGRI *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2019). Quando inoculada em sementes e mudas de alface Crocanta, essa levedura proporcionou aumento de massa seca das raízes, aumento de massa fresca da parte aérea e maior número de folhas (CABRINI; SALA; ROSA-MAGRI, 2019). Em mudas de tomate, essa levedura também promoveu o crescimento, aumentando o comprimento e massa seca de raiz (OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Amostras de raízes, caules, folhas, brotos e solos de cana-de-açúcar foram coletados para avaliação da comunidade microbiana através de técnicas moleculares. As amostras de solo, rizosfera e endofítica de raiz tiveram a maior riqueza, entre os isolados, fungos das famílias *Sistotremataceae*, *Meruliaceae*, *Ceratocystidaceae*, *Chaetosphaeriaceae* e *Glomeraceae* foram identificados, em amostras de colmo, leveduras dos gêneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Meyerozyma*, *Wickerhamiella* e *Zygosaccharomyces* foram identificadas (SOUZA *et al.*, 2016). Fungos dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Epicoccum* foram isolados de raízes e rizosfera (ROMÃO-DUMARESQ *et al.*, 2016).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Isolamento de microrganismos da cana-de-açúcar

4.1.1. Coleta das amostras

As amostras de solo e raízes de cana-de-açúcar foram coletadas da área de cultivo do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São Carlos, campus de Araras/SP, como mostra na Figura 1. A amostragem foi realizada em junho de 2020.

Figura 1. Imagem de satélite do CCA/UFSCar, campus de Araras. Coleta das amostras realizada na área em destaque em amarelo (Fonte: Google Earth).



O município de Araras está localizado na região noroeste do estado de São Paulo, com uma área de 643,46 km², latitude 22°21'25" ao sul e longitude 47°23'03" a oeste do meridiano de Greenwich. Possui altitude de 611 metros, clima tropical com temperaturas médias variando de 8°C a 32°C. O solo amostrado é do tipo argiloso vermelho distrófico latossólico (YOSHIDA; STOLF, 2016).

Amostras de solo e raízes de cinco plantas de cana de açúcar foram coletadas. As plantas amostradas estavam em estágio inicial de desenvolvimento, com aproximadamente 50 cm de altura, de cana soca, com um corte anterior (Figura 2). As amostras foram coletadas utilizando pá e tesoura, e colocadas em sacos plásticos estéreis identificados. Em seguida as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), do campus de Araras/SP da Universidade Federal de São Carlos, onde as análises foram realizadas. Até o momento da análise, as amostras foram armazenadas em temperatura de geladeira (8°C).

Figura 2. Uma das plantas amostradas no trabalho.



4.1.2. *Plaqueamento das amostras de solo*

Para o isolamento dos microrganismos das amostras de solo, 10 g de cada amostra foram distribuídos em Erlenmeyers de 125 ml com 90 ml de solução salina de NaCl 0,85%, e agitados em shaker a 160 rpm por 30 minutos. Em

seguida foi realizada a diluição seriada decimal da suspensão até 10^{-5} em tubos de ensaio com 9 ml de solução salina de NaCl 0,85%.

O meio de cultura utilizado para o crescimento de bactérias das amostras foi o Nutriente Agar (NA) (Kasvi®), preparado conforme instruções do fabricante, com adição de 2 ml/L do antifúngico nistatina. Para leveduras foi utilizado o meio de cultura *Yeast Extract Peptone Dextrose* (YEPD) (20g/L de glicose, 20g/L de peptona, 10g/L de extrato de levedura, 17g/L de ágar) com a adição de 1 ml/L do antibiótico de amplo espectro cloranfenicol. O meio Batata Dextrose Ágar (BDA) (Kasvi®) foi utilizado para fungos filamentosos, o qual também recebeu a adição de cloranfenicol.

Foi pipetado 0,1 mL de cada diluição na superfície dos meios citados acima, seguido do espalhamento da amostra com alça de Drigalski. Após o plaqueamento, as placas permaneceram incubadas em estufa a 30°C. A avaliação do crescimento das colônias nas placas foi acompanhada diariamente.

4.1.3. *Plaqueamento do solo rizosférico*

Para o isolamento dos microrganismos rizosféricos, foi realizada a coleta do solo aderido na superfície das raízes de cana-de-açúcar. Amostras de 1 g de solo rizosférico foram adicionados em tubos Falcons contendo 9 ml de solução salina de NaCl 0,85%. Os tubos foram agitados em shaker a 160 rpm por 30 minutos. Em seguida, fez-se a diluição seriada e o plaqueamento utilizando os meios de cultura descritos no item 4.1.2. As placas foram incubadas em estufa a 30°C, e a observação do desenvolvimento das colônias ocorreu diariamente.

4.1.4. *Plaqueamento de endofíticos de raízes*

Para o isolamento de micro-organismos endofíticos, 0,62 g de raízes de cana-de-açúcar foram lavadas em água corrente e a superfície foi desinfetada com a imersão destas em solução de álcool 70% por 1 minuto, hipoclorito 2% por 3 minutos, e novamente álcool 70% por 30 segundos. Logo em seguida as raízes foram enxaguadas 3 vezes com água destilada estéril. A amostra de raiz foi macerada durante 3 minutos em almofariz com solução salina de NaCl 0,85% (KUSS *et al.*, 2007; MENDES *et al.*, 2007). Posteriormente fez-se a diluição seriada e o plaqueamento das amostras como descrito no item 4.1.2. A água do enxágue da assepsia das raízes também foi plaqueada em todos os meios de cultura

utilizados, para verificar se o processo de assepsia garantiu a eliminação dos micro-organismos da superfície da raiz.

4.1.5. *Isolamento das colônias em desenvolvimento das amostras plaqueadas*

A seleção das colônias das diferentes placas para isolamento em cultura pura foi realizada através de análise visual das características dessas colônias. Colônias morfológicamente diferentes foram selecionadas, considerando, principalmente os seguintes aspectos: cor, textura (brilhosa, fosca, rugosa, lisa) e borda (regular ou irregular). Para cada isolado foi definido um código numérico, sendo este definido na ordem de isolamento. Antecedendo o código foi colocada a sigla ENDO para microrganismos endofíticos, RIZ para rizosféricos, e SOL para isolados oriundos do solo.

Para o isolamento das colônias em cultura pura, foi utilizado o mesmo meio de origem da colônia (NA, YEPD ou BDA). Para o isolamento de bactérias e leveduras foi utilizada a técnica de esgotamento em placa, com o emprego de alça de platina. Para os fungos filamentosos, foi realizado o corte do meio com retirada de parte do micélio, e transferência deste para placa nova. As placas foram incubadas em estufa a 30°C até o crescimento da colônia.

O processo de purificação das culturas foi realizado até que as colônias apresentassem estar livres de contaminantes. Após o isolamento, foi realizada a avaliação microscópica dos isolados para garantir que não havia contaminação. Em seguida os isolados foram cultivados em tubo de ensaio com meio de cultura inclinado, e, após o desenvolvimento do micro-organismo no meio, este foi coberto com óleo mineral. Foram produzidos três tubos para cada isolado, os quais foram mantidos em geladeira até o início das análises.

4.2. **Avaliação dos microrganismos quanto ao controle biológico de *Fusarium verticillioides***

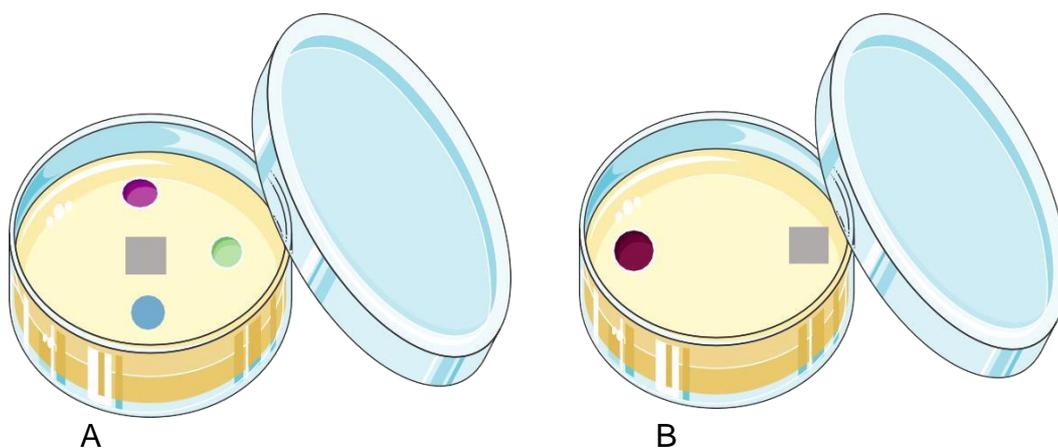
Os micro-organismos isolados de cana-de-açúcar foram avaliados quanto ao controle biológico do fungo fitopatogênico *Fusarium verticillioides*, causador de podridão de raiz e do sistema vascular das plantas. A cepa foi isolada de sintomas em plantas de milho e foi disponibilizada pelo Laboratório de Cultura de Tecidos e

Fisiologia Vegetal, da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, campus Araras, sob responsabilidade do Prof. Dr. Jean Carlos Cardoso.

Para o teste foi utilizado o cultivo pareado em placa de Petri. Para as bactérias foi utilizado o teste com três bactérias por placa, inoculadas nas extremidades, distantes umas das outras e o patógeno no centro (Figura 3-A).

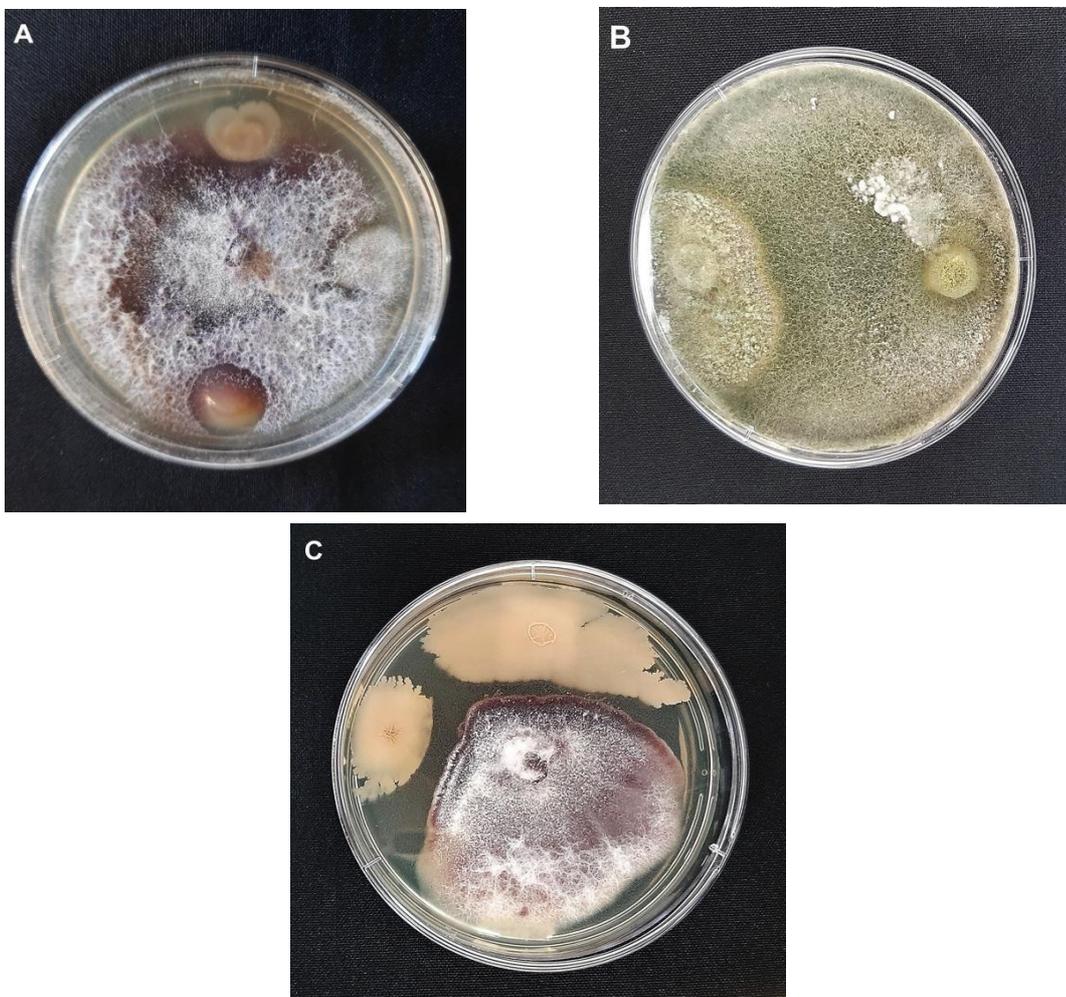
Para avaliação dos fungos filamentosos e da levedura, foi avaliado um isolado por placa, com a inoculação em paralelo, com o fitopatógeno em uma extremidade, e o potencial controle na outra extremidade da placa (Figura 3-B).

Figura 3. Ilustração do teste de antagonismo em placa com a inoculação de (A) - bactérias (círculo) e fungo patogênico (quadrado); inoculação de (B) - fungo filamentoso ou levedura (círculo) e o fungo fitopatogênico (quadrado).



As placas foram incubadas em estufa a 30°C, com acompanhamento diário. Foi criada uma escala para a classificação dos isolados quanto ao controle biológico, sendo, (+) o fungo fitopatogênico cresce até o limite da colônia antagonista, (++) o isolado cresce por cima do patógeno, (+++) há formação de halo de inibição (Figura 4).

Figura 4. Exemplos da escala de controle atribuída. A: O patógeno cresce até o limite do isolado (+). B: O antagonista cresce por cima do patógeno (++). C: Há formação de halo de inibição (+++).



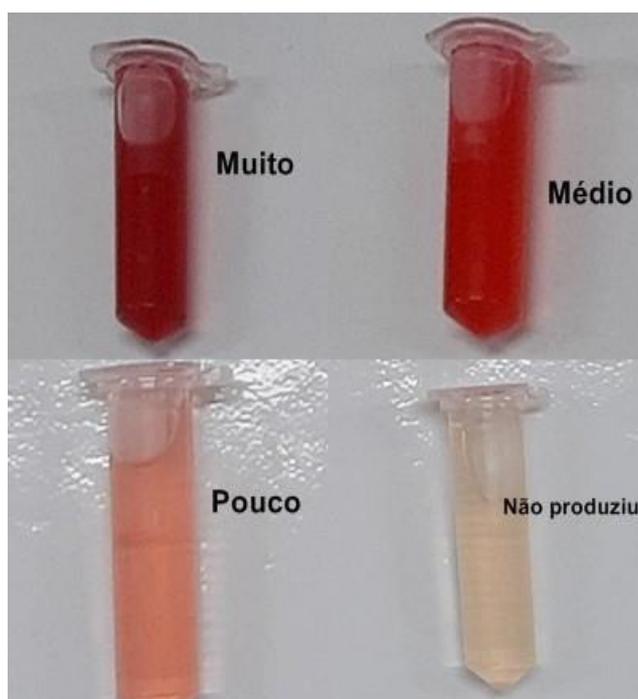
4.3. Produção de ácido indolacético (AIA) por microrganismos

Para o teste qualitativo de produção de AIA pelos isolados foram utilizados tubos falcons de 50 ml contendo 10 ml de meio de cultura líquido, com adição de triptofano (0,54 g/mL) precursor da produção de AIA para a maioria dos microrganismos.

Para as bactérias foi utilizado o meio caldo nutritivo (1 g/L de extrato de carne, 2 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 5 g/L de cloreto de sódio), para os fungos foi utilizado o meio caldo BD (Kasvi®) e para as leveduras o meio YEPD líquido. Para a inoculação dos tubos foi utilizado uma alçada da colônia de bactéria e levedura, para fungo filamentoso foi inoculado um fragmento de meio de cultura com micélio em crescimento ativo. Os tubos foram incubados em agitador a 160 rpm e

30°C. As bactérias foram incubadas por 24 horas, os fungos e leveduras foram incubados por 48 horas. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm durante 3 minutos. Uma amostra de 1 mL do sobrenadante foi transferido para microtubo, e recebeu a adição de 1 mL do reagente de Salkowski (125 mL de ácido perclórico e 0,675 g de cloreto de ferro dissolvido em 5 mL de água destilada), seguindo o método de Gordon & Weber (1951). Os microtubos foram levemente movimentados para que o reagente se misturasse ao meio, e aguardou 30 minutos para avaliação da reação, em temperatura ambiente. A mudança de cor do meio para rosa indicou a presença de AIA no meio. Foi produzida uma escala para caracterizar a produção de AIA pelos micro-organismos. Considerando que quanto mais intensa a cor rosa da reação maior a produção de AIA pelo microrganismo: (+-) produziu pouco, (+) produziu médio e (++) produziu muito (Figura 5).

Figura 5. Representação da escala de produção de AIA. (+-) pouco, (+) médio e (++) muito.



4.4. Solubilização de fosfatos por microrganismos

Para a avaliação dos isolados endofíticos quanto a capacidade de solubilizar fosfato, foi utilizado o método de solubilização em meio sólido, em placa de Petri, com meio de cultura BDYA. Ao meio de cultura BDA foi adicionado 5 g/L de extrato de levedura; após autoclavado, antes de ser vertido nas placas de Petri, o meio recebe a adição de uma solução de K_2HPO_4 10% (50 ml/L) e outra solução de $CaCl_2$ 10% (10 ml/L), ambas esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 μm .

Após a solidificação do meio, os microrganismos foram inoculados pontualmente no centro da placa e incubados em estufa a 30°C. Após uma semana foi possível observar a formação de um halo translúcido ao redor da colônia do micro-organismo capaz de solubilizar o fosfato insolúvel do meio. A caracterização do grau de solubilização foi determinada com a medida da colônia e do halo de solubilização, e o cálculo do índice de solubilização pela fórmula: $IS = \text{diâmetro da colônia com halo} / \text{diâmetro da colônia sem halo}$ (BHARUCHA; PATEL; TRIVEDI, 2013), seguido da escala: baixa solubilização ($IS < 2$), média solubilização ($2 \leq IS < 3$) e alta solubilização ($IS > 3$) (SILVA *et al.*, 2014).

4.5. Análise de Componente Principal

A Análise de Componente Principal (PCA – *Principal Component Analysis*) foi aplicada aos resultados de produção de AIA, solubilização de fosfato e controle biológico dos isolados de solo, endosfera e rizosfera. Foi considerada uma matriz binária de dados na qual as linhas continham as linhagens e as colunas apresentaram os dados das escalas utilizadas para representação dos resultados para cada característica analisada, conforme especificado nos itens 4.2, 4.3 e 4.4. Para solubilização de fosfato, adotou-se somente presença de halo ou ausência de halo, ou seja, solubilização positiva ou negativa, respectivamente. Assim, a classificações baixa, média e alta foram consideradas como positivas. Foi utilizado o coeficiente de Pearson-n na ferramenta XLSTAT 2021.2.2 (BEHBAHANI *et al.*, 2017).

4.6. Promoção de crescimento de *Arabidopsis thaliana* in vitro

Para o teste de promoção de crescimento foram utilizadas sementes de *Arabidopsis thaliana* do ecótipo Col-0, cedidas pelo Centro de Citricultura Sylvio

Moreira – Instituto Agronômico de Campinas, Cordeirópolis – SP. Foram testadas três linhagens: ENDO26 (isolada do interior da raiz, bactéria), SOL88 (isolada de solo, levedura) e RIZ85 (isolado da rizosfera, fungo filamentosos) ambas devido aos resultados obtidos nos experimentos de mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

As sementes foram desinfetadas em álcool 70% por 2 minutos, hipoclorito de sódio 1% por 15 minutos, em seguida lavadas cinco vezes em água destilada estéril (BHATTACHARYYA; GARLADINNE; LEE, 2015). Posteriormente as sementes foram germinadas em placas de Petri contendo meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com adição de 0,75% de sacarose, 1% de ágar e pH 7,0, incubadas verticalmente em incubadora com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, e temperatura de 22°C por quatro dias (GONZÁLEZ-PÉREZ *et al.*, 2018). Após este período, os microrganismos selecionados foram inoculados em placa a uma distância de 4 cm da raiz das plantas. Para a inoculação da bactéria e da levedura, foi feito um risco horizontal com a alça de inoculação. Para o fungo filamentosos, foi utilizado um fragmento circular do meio de cultura com o micélio do fungo em crescimento ativo. O experimento foi realizado com três placas de Petri por microrganismo avaliado e o controle (sem micro-organismo). As placas permaneceram incubadas por mais sete dias nas mesmas condições anteriores.

Após o período de incubação, avaliou-se o comprimento da raiz da planta e a observação se houve ou não a formação de pelos radiculares.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

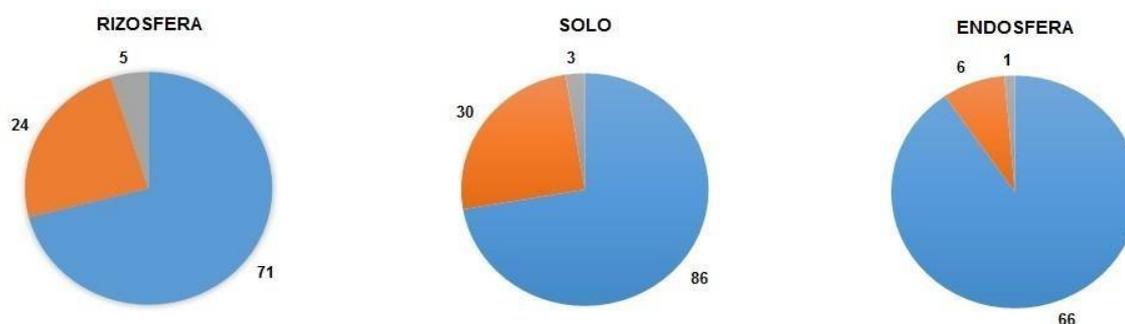
5.1. Isolamento de microrganismos

Foram isolados um total de 292 microrganismos das amostras de cana-de-açúcar, sendo 73 endofíticos de raízes, 100 da rizosfera e 119 do solo. As bactérias se destacaram com maior número de isolados em todas as amostras, sendo os fungos filamentosos em segundo lugar, e as leveduras foram isolados em menor quantidade (Figura 6).

A composição do microbioma das plantas depende de diferentes fatores, como tipo de solo, genótipo da planta, composição de exsudatos radiculares, práticas agrícolas, clima, competitividade entre os micro-organismos (BUSBY *et al.*, 2017). A literatura indica que plantas controlam a composição dos exsudatos radiculares, liberando diversos compostos no solo, como aminoácidos, carboidratos e ácidos orgânicos, o que altera a química do solo; os exsudatos são utilizados como nutriente pelos microrganismos da rizosfera, sendo assim este se caracteriza como um local com abundância de microrganismos (LAREEN; BURTON; SCÄFER, 2016). Em contrapartida, na rizosfera encontra-se menor diversidade microbiana, uma vez que o próprio exsudato radicular seleciona determinados grupos que se adaptam às suas características (SUGIYAMA, 2019). Os exsudatos radiculares e o sistema imune das plantas também selecionam os

microrganismos endofíticos, que podem ser benéficos ou prejudiciais, o que promove uma maior seleção das espécies (LAREEN; BURTON; SCÄFER, 2016). Além disso, endofíticos precisam apresentar mecanismos que modulam a resposta de defesa da planta, sendo assim, a endosfera é o ambiente com menor diversidade, comparado à rizosfera e ao solo (OUKALA; AISSAT; PASTOR, 2021).

Figura 6. Distribuição dos isolados de acordo com o tipo microbiano e o local de origem. Azul – bactérias, laranja – fungos filamentosos, cinza – leveduras.



Leveduras endofíticas foram isoladas de folhas de arroz, milho e cana-de-açúcar, sendo 123 cepas obtidas de amostras de cana-de-açúcar (KHUNNAMWONG; JINDAMORAKOT; LIMTONG, 2018); os mesmos autores, porém, no isolamento de endofíticos de raiz de cana-de-açúcar, obtiveram apenas um isolado de levedura. O mesmo resultado também encontrado neste trabalho. A endosfera da raiz apresentou o menor número de microrganismos provavelmente porque para invadir o tecido radicular os microrganismos rizosféricos precisam encontrar ferimentos na raiz e, além disso, como relatado anteriormente, a planta possui um sistema de resistência, que promove a produção de compostos antimicrobianos, os quais controlam a presença de microrganismos no interior do tecido vegetal (BURBANO-FIGUEROA, 2020).

5.2 Avaliação dos microrganismos quanto ao antagonismo a fungos fitopatogênicos

Dentre os micro-organismos endofíticos, apenas 15 isolados (22,7%) apresentaram resultado positivo no controle do fitopatógeno, sendo 10 isolados de bactérias e 5 de fungos filamentosos (Tabela 1). Não foi observado controle do fitopatógeno pela levedura endofítica. Considerando a escala de antagonismo, 14 isolados proporcionaram pouco controle do fitopatógeno, sendo que este cresceu até o limite da colônia antagonista. Apenas o isolado ENDO68, um fungo filamentoso, cresceu por cima do fitopatógeno, apresentando crescimento mais rápido na placa de Petri (Figura 7).

Tabela 1. Microrganismos endofíticos quanto ao controle do fitopatógeno.

Tipo microbiano	Isolado	Antagonismo
Bactéria	ENDO2	+
	ENDO7	+
	ENDO17	+
	ENDO26	+
	ENDO33	+
	ENDO36	+
	ENDO44	+
	ENDO45	+
	ENDO62	+
	ENDO64	+
Fungo filamentoso	ENDO68	++
	ENDO70	+
	ENDO71	+
	ENDO72	+
	ENDO73	+

Patógeno cresceu até o limite da colônia do isolado (+), o isolado cresceu por cima do patógeno (++), houve formação de halo de inibição pelo isolado (+++).

Figura 7. Antagonismo do isolado ENDO68 contra o fitopatógeno *F. verticillioides*.



Ao contrário do observado nestes resultados, a bactéria endofítica *Streptomyces hygroscopicus* inibe o crescimento dos fungos *Ralstonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, entre outros. Outras bactérias endofíticas emitem compostos voláteis com atividade antibacteriana de amplo espectro contra fungos, bactérias e nematoides, além de impedir o *quorum sensing*, que promove a comunicação entre as células (OUKALA; AISSAT; PASTOR, 2021).

O fungo filamentoso *Trichoderma* sp., encontrado na rizosfera e endosfera das raízes, foi estudado no controle biológico de fitopatógenos, mostrando-se eficaz no controle de doenças em folhas e frutos causados por diferentes patógenos em diferentes culturas (HARMAN, 2000). Os mecanismos observados em *Trichoderma* sp. são a produção de compostos voláteis e antibióticos, a capacidade de parasitar outros fungos, a competição por nutrientes, e a indução de resistência vegetal pela produção de metabólitos secundários, além disso, fungos desse gênero podem produzir auxina e solubilizar fosfatos, atuando como promotores de crescimento vegetal (CONTRERAS-CORNEJO *et al.*, 2016). Fungos endofíticos podem proporcionar outros benefícios para as plantas, como indução de resistência sistêmica, aumento da nutrição por fósforo e proteção contra herbivoria (GAUTAM; AVASTHI, 2019).

Segundo Rana *et al.* (2020), as bactérias endofíticas *Burkholderia* sp. e *Pseudomonas fluorescens*, isoladas de cana-de-açúcar, se mostraram potenciais agentes de biocontrole para os fitopatógenos *Ustilado scitaminea*, *Fusarium* spp. e *Colletotrichum falcatum*. *Burkholderia* sp., produz um antifúngico chamado pirrolnitrina. *Bacillus* spp. é capaz de sintetizar substâncias antimicrobianas, competir por espaço e nutriente, induzir resistência sistêmica nas plantas, e no trabalho realizado por Chen *et al.* (2020) controlou o fitopatógeno *Geotrichum candidum*. Leveduras também podem produzir compostos voláteis inibidores de fungo fitopatogênicos (NUTARATAT *et al.*, 2014).

Considerando os isolados oriundos da rizosfera, 32 (45%) apresentaram algum tipo de controle, sendo 10 bactérias e 22 fungos filamentosos. Os isolados

bacterianos RIZ2, RIZ4, RIZ34, RIZ35 e RIZ40 apresentaram halo de inibição, caracterizando alto controle do fitopatógeno (Tabela 2, Figura 8). Os isolados fúngicos RIZ73, RIZ84, RIZ84, RIZ 90, RIZ94 e RIZ96 também formaram halo de inibição, e o RIZ 89 cresceu por cima do fitopatógeno.

Tabela 2. Microrganismos rizosféricos quanto ao controle de fitopatógenos.

Tipo microbiano	Isolado	Antagonismo	Tipo microbiano	Isolado	Antagonismo
Bactéria	RIZ2	+++	Fungo filamentoso	RIZ79	+
	RIZ4	+++		RIZ81	+
	RIZ8	+		RIZ82	+
	RIZ34	+++		RIZ83	+++
	RIZ35	+++		RIZ84	+++
	RIZ38	+		RIZ85	+
	RIZ39	+		RIZ86	+
	RIZ40	+++		RIZ87	+
	RIZ44	+		RIZ88	+
	RIZ54	+		RIZ89	++
Fungo filamentoso	RIZ73	+++	RIZ90	+++	
	RIZ74	+	RIZ92	+	
	RIZ75	+	RIZ93	+	
	RIZ76	+	RIZ94	+++	
	RIZ77	+	RIZ95	+	
	RIZ78	+	RIZ96	+++	

Patógeno cresceu até o limite da colônia do isolado (+), o isolado cresceu por cima do patógeno (++), houve formação de halo de inibição pelo isolado(+++).

A rizosfera é um ambiente rico em nutrientes, sendo um local competitivo com grande quantidade de micro-organismos que precisam disputar os nutrientes e espaço. Para isso precisam apresentar capacidade de competição (crescer de forma rápida e ser menos exigente nutricionalmente), ou matar seus competidores para conseguirem se estabelecer. Assim, produzem metabólitos secundários como antibióticos, toxinas, enzimas, sideróforos, e outros compostos que podem alterar a exsudação radicular de acordo com o nutriente que mais favorecer o micro-organismo (LAREEN; BURTON; SCÄFER, 2016).

Dos isolados do solo, 29 (33,7%) apresentaram algum tipo de controle do fitopatógeno, sendo 9 bactérias e 20 fungos filamentosos. Seis isolados bacterianos (SOL9, SOL44, SOL58, SOL59, SOL69 e SOL73) foram capazes de controlar o patógeno com a formação de halo de inibição (Tabela 3, Figura 9). Dentre os fungos de solo, dois isolados (SOL91 e SOL112) formaram halo de

inibição, e 7 isolados (SOL95, SOL96, SOL99, SOL101, SOL102, SOL106 e SOL108) cresceram por cima da colônia fitopatogênica.

Figura 8. Teste de antagonismo dos isolados rizosféricos contra o fitopatógeno *F. verticillioides*.

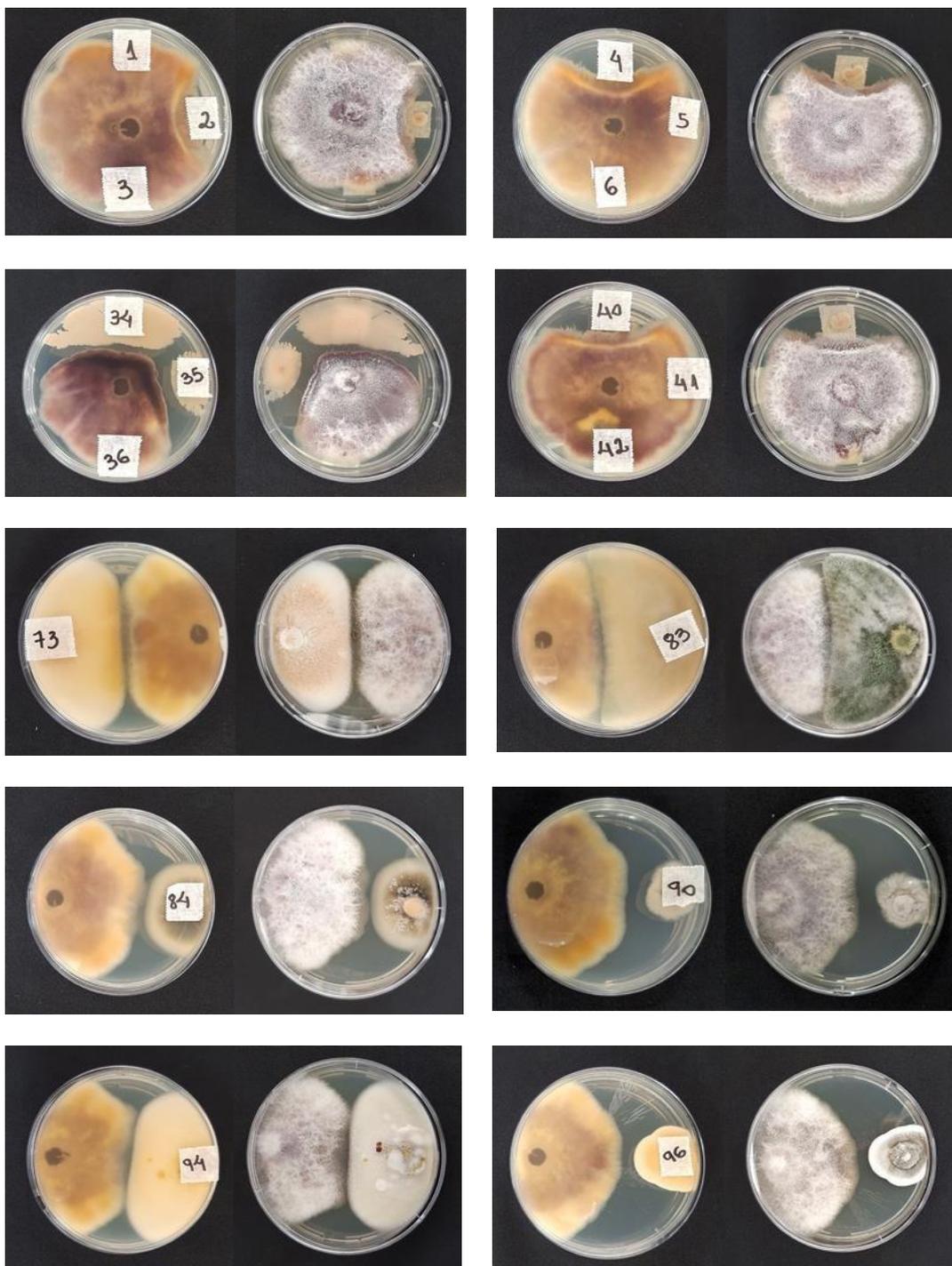


Tabela 3. Microrganismos do solo quanto ao controle de fitopatógenos.

Tipo microbiano	Isolado	Antagonismo	Tipo microbiano	Isolado	Antagonismo
bactéria	SOL09	+++	fungo filamentoso	SOL96	++
	SOL42	+		SOL97	+
	SOL44	+++		SOL98	+
	SOL58	+++		SOL99	++
	SOL59	+++		SOL100	+
	SOL63	+		SOL101	++
	SOL69	+++		SOL102	++
	SOL73	+++		SOL104	+
SOL77	+	SOL105		+	
fungo filamentoso	SOL90	+		SOL106	++
	SOL91	+++		SOL107	+
	SOL92	+		SOL108	++
	SOL93	+	SOL110	+	
	SOL94	+	SOL112	+++	
	SOL95	++			

Patógeno cresceu até o limite da colônia do isolado (+), o isolado cresceu por cima do patógeno (++), houve formação de halo de inibição pelo isolado (+++).

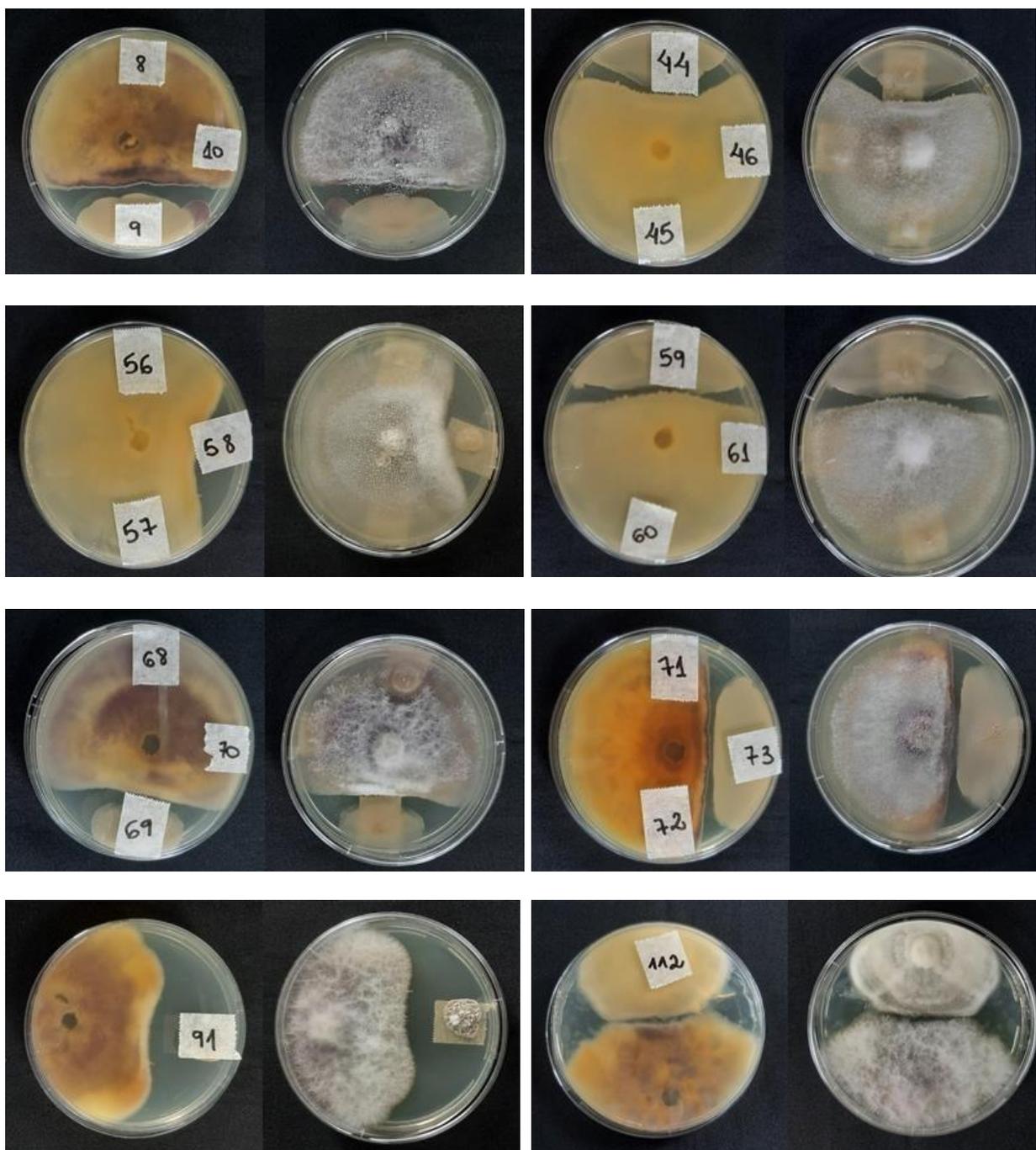
A rizosfera é o ambiente de origem do maior número de isolados capazes de controlar o desenvolvimento do fitopatógeno em placa de Petri. Foi da rizosfera, também, a origem do maior número de isolados (11) capazes de promover um controle mais significativo, com a formação de halo de inibição. O solo fica em segundo lugar, sendo que 8 isolados, destes, 6 bactérias, se destacaram com o maior grau de controle biológico.

O solo é considerado um ambiente oligotrófico comparado a rizosfera, isto é, muito pobre em nutrientes. Para sobreviver no solo, os microrganismos precisam possuir a capacidade de competir com outros microrganismos, para que assim consigam se estabelecer. Competir por nutrientes (crescendo de forma mais rápida, por exemplo), ou produzir compostos antimicrobianos, para eliminar seus inimigos e conseguir utilizar os recursos escassos que estão disponíveis (LAREEN; BURTON; SCÄFER, 2016). Por isso o solo e a rizosfera são considerados ótimos locais para o isolamento de potenciais antagonistas de patógenos, sendo a rizosfera a primeira barreira de defesa das plantas contra fitopatógenos (DINI-ANDREOTE, 2020).

Nenhuma das leveduras isoladas, em nenhuma das amostras, foi capaz de controlar o fungo *F. verticillioides*. As leveduras são estudadas como um grupo com grande potencial para o controle biológico de fitopatógenos (ROSA *et al.*, 2010).

Esse grupo microbiano, porém, é encontrado no solo e na rizosfera em número bastante inferior ao de bactérias e fungos filamentosos como observado nos resultados deste trabalho, e também na literatura (BOTHA, 2011). A pouca representatividade (baixo número de isolados) provavelmente é a responsável pelos resultados obtidos.

Figura 9. Teste de antagonismo dos isolados de solo contra o fitopatógeno *Fusarium verticillioides*.



5.3 Produção de ácido indolacético por microrganismos

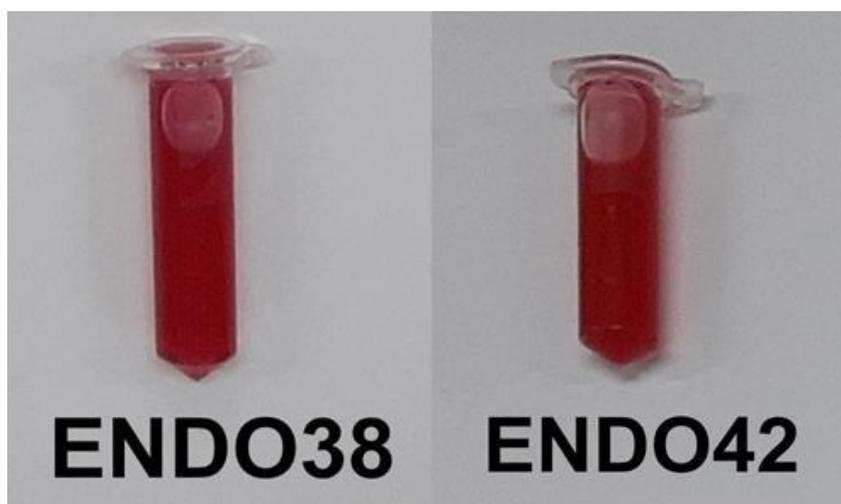
Do total dos isolados endofíticos de raízes de cana-de-açúcar, 29 (43,9%) foram capazes de produzir AIA. As bactérias ENDO38 e ENDO42 foram as que produziram maior quantidade (Tabela 4, Figura 10), seguido das bactérias ENDO10, ENDO23, ENDO30, ENDO36, ENDO41 E ENDO53 que produziram uma quantidade média. Nenhuma levedura endofítica apresentou produção de AIA.

Tabela 4. Microrganismos endofíticos quanto à produção de AIA.

Tipo microbiano	Isolado	Produção de AIA
Bactéria	ENDO1	+-
	ENDO2	+-
	ENDO3	+-
	ENDO5	+-
	ENDO8	+-
	ENDO10	+-
	ENDO11	+-
	ENDO12	+-
	ENDO20	+-
	ENDO26	+-
	ENDO27	+-
	ENDO28	+-
	ENDO33	+-
	ENDO36	+
	ENDO38	++
	ENDO42	++
	ENDO44	+-
	ENDO48	+-
	ENDO52	+-
	ENDO58	+-
ENDO60	+-	
ENDO61	+-	
ENDO64	+-	
ENDO65	+-	
Fungo filamentoso	ENDO73	+-

Alta produção (++), média produção (+) e baixa produção (+-)

Figura 10. Isolados bacterianos endofíticos que tiveram alta produção de AIA.



Beneduzi *et al.* (2013) isolaram bactérias de rizosfera e endosfera de raiz e caule de cana-de-açúcar de 6 regiões diferentes do sul do Brasil, e também testaram o potencial de produção de AIA; *Agrobacterium tumefaciens*, *Burkholderia tropica* e *Stenotrophomonas maltophilia* foram abundantemente encontradas como endofíticas de raiz. De todos os isolados, 98 bactérias endofíticas produziram entre 0,1-0,50 µg/ml de AIA e 16 produziram de 51-100 µg/ml.

Rodrigues *et al.* (2016) também isolaram bactérias de raízes de cana-de-açúcar e 25 apresentaram resultado positivo para produção de AIA; a bactéria endofítica de raiz identificada como *Klebsiella* sp. foi escolhida para inoculação em milho, resultando em maior área foliar, maior comprimento de caule e maior peso seco do caule, quando comparada com o controle; apesar disso, os resultados *in vitro* mostraram que a produção de AIA pela bactéria não era muito intensa.

Dentre os 6 fungos filamentosos endofíticos avaliados, apenas um produziu AIA, e em baixa concentração (ENDO73). Resultados diferentes foram observados na análise dos fungos *Aspergillus awamori* e *Fusarium oxysporum*, endofíticos isolados de folhas de *Withania somnifera*. Esses fungos foram identificados como produtores de AIA, e além disso, foi constatado que a colonização do milho por esses fungos é dependente do fitohormônio (MEHMOOD *et al.*, 2018; MEHMOOD *et al.*, 2018). Em outro trabalho, dezesseis fungos endofíticos foram isolados de arroz, sendo três isolados das raízes. Todos os isolados foram capazes de produzir

AIA *in vitro*, com produções que variaram entre 2,651 mg/l e 0,635 mg/l (SYMSIA *et al.*, 2015).

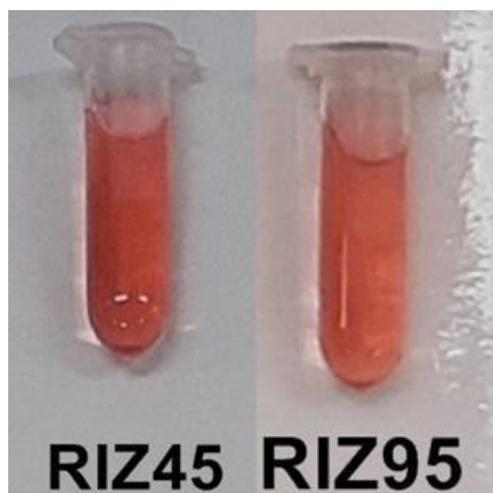
Dos isolados rizosféricos, 21,1% apresentaram resultado positivo para a produção de AIA em algum nível. Nenhum, porém, produziu alta quantidade de AIA. A bactéria RIZ45 e o fungo RIZ95 tiveram média produção (Tabela 5, Figura 11), e os demais 13 micro-organismos produziram baixa quantidade. Nenhuma levedura rizosférica produziu AIA.

Tabela 5. Microrganismos rizosféricos quanto a produção de AIA.

Tipo microbiano	Isolado	Produção de AIA
bactéria	RIZ04	+--
	RIZ14	+--
	RIZ16	+--
	RIZ20	+--
	RIZ25	+--
	RIZ26	+--
	RIZ32	+--
	RIZ34	+--
	RIZ37	+--
	RIZ40	+--
	RIZ45	+
	RIZ47	+--
	fungo filamentoso	RIZ84
RIZ85		+--
RIZ95		+

Alta produção (++), média produção (+) e baixa produção (+--)

Figura 11. Isolados rizosféricos que apresentaram média produção de AIA.



Na avaliação dos isolados de solo, apenas 18,6% apresentaram resultado positivo para produção de AIA (Tabela 6). Apenas a bactéria SOL68 apresentou produção média de AIA (Figura 12). Doze isolados bacterianos e 3 isolados de leveduras apresentaram baixa produção. Nenhum fungo filamentoso isolado do solo apresentou resultado positivo para produção de AIA.

Tabela 6. Microrganismos do solo quanto a produção de AIA.

Tipo microbiano	Isolado	Produção de AIA
Bactéria	SOL1	+-
	SOL3	+-
	SOL12	+-
	SOL13	+-
	SOL18	+-
	SOL21	+-
	SOL32	+-
	SOL35	+-
	SOL41	+-
	SOL60	+-
	SOL66	+-
	SOL68	+
	SOL83	+-
Levedura	SOL87	+-
	SOL88	+-
	SOL89	+-

Alta produção (++) , média produção (+) e baixa produção (+-).

Figura 12. Isolado do solo com média produção de AIA.



O AIA é o principal representante das auxinas, um hormônio vegetal responsável pelo alongamento celular, de células que são recém-formadas nos meristemas (MARCHIORO, 2005). A inoculação de rizobactérias produtoras desse hormônio em plantas promove a inibição do crescimento da raiz primária e estimula a formação de raízes laterais e pelos radiculares (VERBON; LIBERMAN, 2016).

Os resultados obtidos no nosso trabalho mostram predominância dos endofíticos como produtores de AIA. Além disso, foi observado, de acordo com a escala de produção, que apenas os endofíticos produziram alta concentração de AIA, caracterizado pela cor intensa da reação do meio com o reagente de Salkowski. *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Klebsiella* spp, são exemplos de bactérias endofíticas produtoras de AIA (OUKALA; AISSAT; PASTOR, 2021).

O maior número de isolados produtores de AIA, e os que apresentaram produção mais destacada, na endosfera, pode ter relação com o fato da planta abrigar esses micro-organismo em seus tecidos, e em contrapartida, estes favorecerem o seu desenvolvimento (FONTANA *et al.*, 2021). Como relatado anteriormente, é conhecido na literatura diversos exemplos da aplicação de endofíticos como inoculantes em plantas, resultando em incremento no desenvolvimento vegetal (BARBOSA *et al.*, 2015; HUNGRIA *et al.*, 2001). A produção de AIA é regularmente apontada como um dos mecanismos utilizados pelo micro-organismo para promover o desenvolvimento das plantas (OLANREWAJU *et al.*, 2017).

5.4 Solubilização de fosfato por microrganismos

Do total de isolados endofíticos de raiz de cana-de-açúcar, 9 isolados apresentaram resultado positivo, caracterizado pela formação de halo translúcido ao redor da colônia (Figura 13). Apesar do resultado indicando a capacidade de solubilização, o cálculo do índice de solubilização mostra que todas as linhagens apresentam baixa capacidade (Tabela 7). Dentre os endofíticos solubilizadores, apenas se apresentaram bactérias.

Tabela 7. Solubilização de fosfato pelos isolados endofíticos.

Tipo microbiano	Isolado	Índice de Solubilização	Classificação
	ENDO4	1,5	baixa
	ENDO5	4,2	baixa
	ENDO6	1,4	baixa
	ENDO19	1,6	baixa
Bactéria	ENDO26	1,8	baixa
	ENDO31	1,9	baixa
	ENDO34	1,3	baixa
	ENDO50	1,4	baixa
	ENDO53	1,6	baixa

Ao contrário destes resultados, fungos endofíticos são relatados na literatura como solubilizadores de fosfato, e promotores de crescimento vegetal. Syamsia (2015) isolou fungos endofíticos de arroz, e encontrou 16 isolados capazes de solubilizar fosfato *in vitro*.

Em um trabalho com bactérias endofíticas isoladas de videira, menos de 50% das cepas isoladas foram capazes de solubilizar fosfato (BALDAN *et al.*, 2015). Entre bactérias isoladas da rizosfera de plantas invasoras 51,2% solubilizaram fosfato (FANG; WANG; ZHANG, 2019). Outras bactérias endofíticas dos gêneros *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp, *Burkholderia* spp., encontradas em cana-de-açúcar, soja e milho, também solubilizaram fosfato (RANA *et al.*, 2020).

Quando analisados os isolados de rizosfera, quanto a solubilização de fosfato, foi possível observar que apenas bactérias se apresentaram como solubilizadoras. De todos os 7 isolados solubilizadores, 6 apresentaram alto índice e um isolado apresentou índice médio (Tabela 8 e Figura 14).

Figura 13. Isolados de endosfera com resultados positivos no teste de solubilização de fosfato.

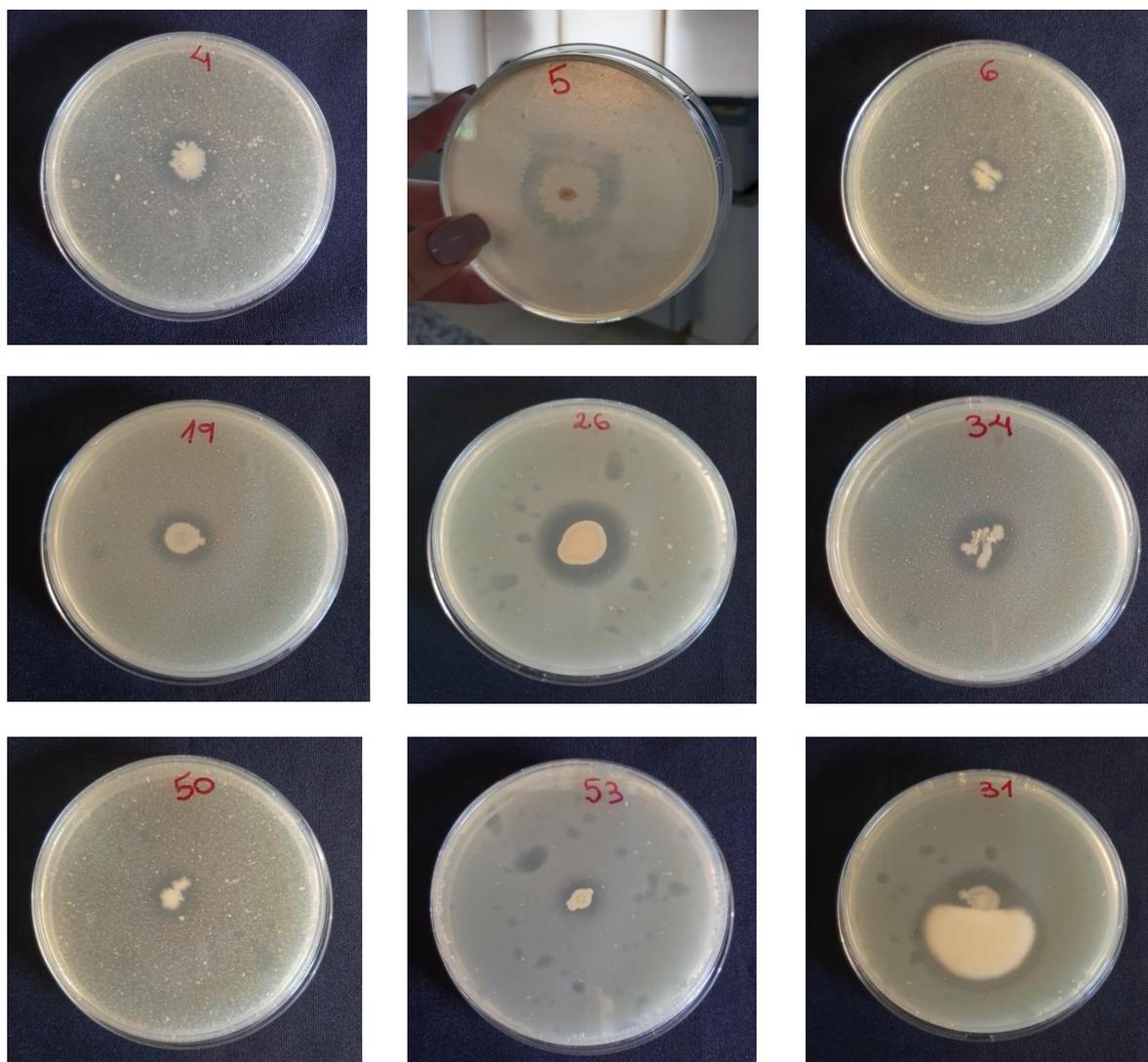
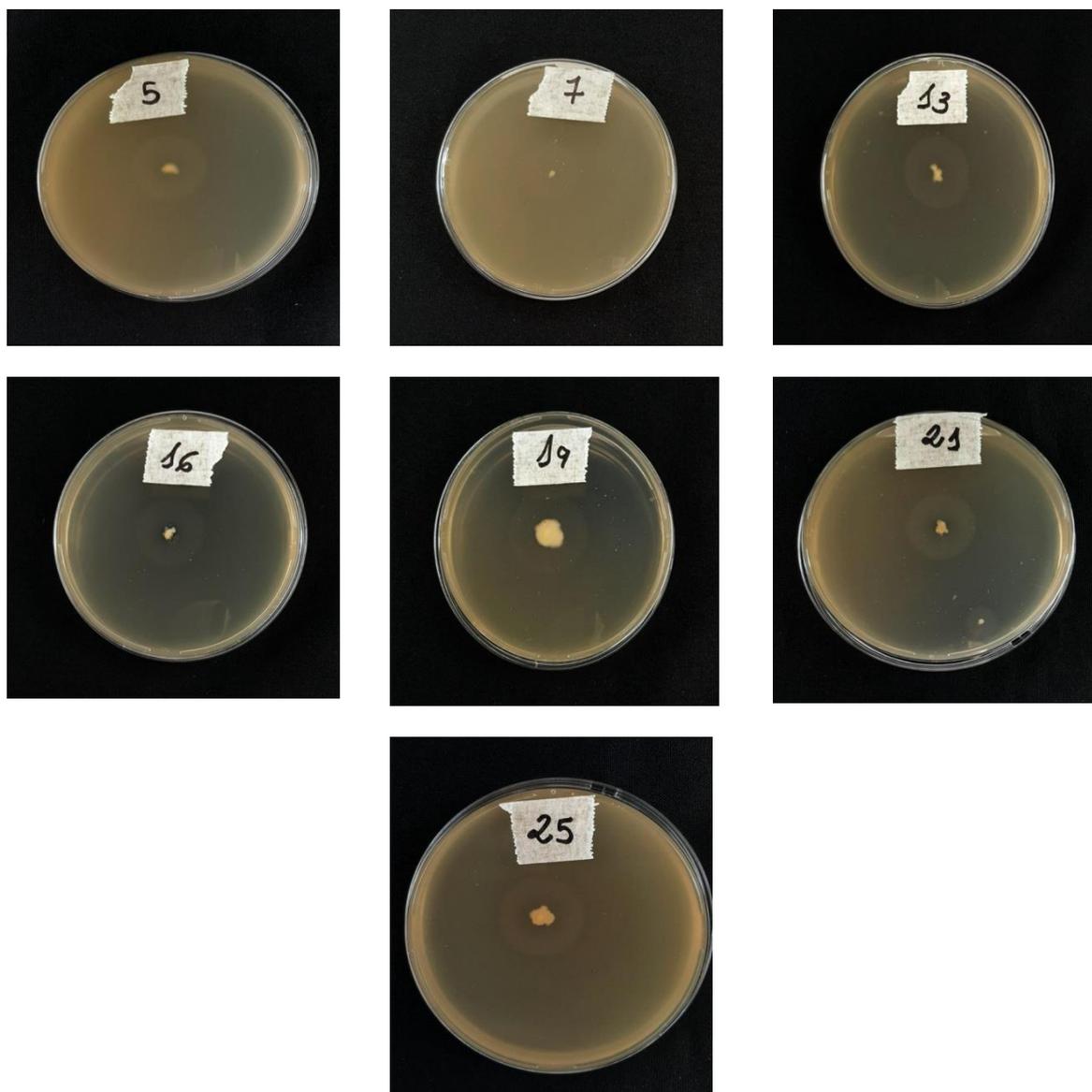


Tabela 8. Solubilização de fosfato pelos isolados da rizosfera.

Tipo microbiano	Isolado	Índice de solubilização	Classificação
Bactéria	RIZ5	3,3	alta
	RIZ7	6,6	alta
	RIZ13	3,5	alta
	RIZ16	5	alta
	RIZ19	3	média
	RIZ21	4	alta
	RIZ25	3,5	alta

Figura 14. Isolados de rizosfera com resultados positivos no teste de solubilização de fosfato.



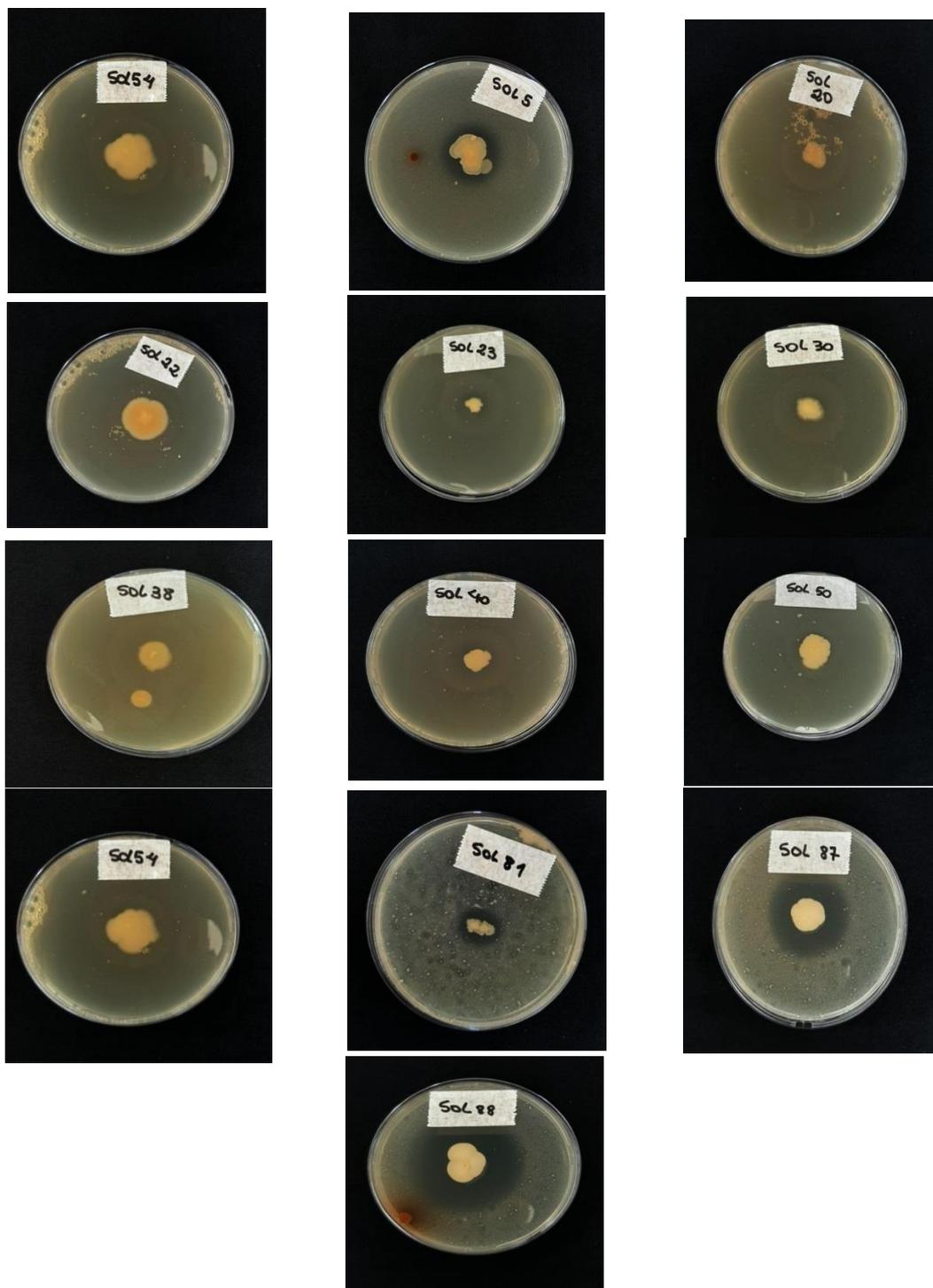
Os resultados de solubilização para os isolados de solo estão apresentados na Tabela 9 e Figura 15. Duas bactérias de solo apresentaram alto índice de solubilização, 5 com índice médio e 4 com índice baixo. Das leveduras isoladas de solo, 2 apresentaram resultado positivo para solubilização, sendo a SOL87 com índice médio e SOL88 com índice alto. Nenhum fungo filamentososo, isolado de solo, foi capaz de solubilizar fosfato.

Tabela 9. Solubilização de fosfato pelos isolados de solo.

Tipo microbiano	Isolado	Índice de solubilização	Classificação
Bactéria	SOL5	1,1	baixa
	SOL20	2,9	média
	SOL21	2,2	média
	SOL22	1,6	baixa
	SOL23	4,7	alta
	SOL30	2,6	média
	SOL38	3	média
	SOL40	2,9	média
	SOL50	1,9	baixa
	SOL51	5	alta
	SOL54	1,6	baixa
Levedura	SOL87	2,5	média
	SOL88	3,6	alta

Foi observada maior quantidade de microrganismos solubilizadores na rizosfera e solo, se comparado à endosfera. Bactérias solubilizadoras têm sido isoladas de solo e rizosfera de diferentes culturas, pois é no solo que se encontra fósforo acumulado, devido a aplicação de fertilizantes (AHMAD *et al.*, 2018; PARAKASH; ARORA, 2018). Apenas 0,1% de fósforo está presente de forma solúvel no solo, as formas inorgânicas se tornam solúveis por micro-organismos que produzem ácidos orgânicos (RANA *et al.*, 2020). Dentre esses micro-organismos estão os do gênero *Bacillus* sp., que além de apresentarem o mecanismo de solubilização, produzem AIA e sideróforos (PARAKASH; ARORA, 2018).

Figura 15. Isolados do solo com resultados positivos no teste de solubilização de fosfato.



5.5 Análise de Componente Principal dos isolados e mecanismos de promoção de crescimento vegetal

Os mecanismos de promoção de crescimento vegetal (produção de AIA, solubilização de fosfato e controle biológico) foram analisados em conjunto a fim de agrupar os isolados por meio de análise multivariada. Utilizando-se a Análise de Componente Principal para o conjunto dos mecanismos e seus subníveis, obteve-se um gráfico *biplot* (Figura 16). Os componentes F1 e F2 explicaram 72,2% da variabilidade total dos dados. O gráfico mostra um agrupamento de 21 isolados que tem somente o mecanismo de solubilização de fosfato, sendo 5 de rizosfera, 7 de endosfera e 9 de solo. Unicamente para controle biológico, verifica-se um agrupamento de 19 isolados, sendo nenhum isolado de endosfera, 8 de rizosfera e 11 de solo, na maior escala de controle, ou seja, quando há formação de halo de inibição entre o fitopatógeno (*F. verticillioides*) e o isolado. A mais alta produção de AIA foi apresentada por dois isolados de endosfera, com somente esse mecanismo.

O grande número de isolados concentrados no ponto 0;0 do *biplot* refere-se àqueles que não apresentaram nenhum mecanismo de promoção de crescimento vegetal dentre os três avaliados, o que representa 48% do total de isolados (Figura 16). No gráfico destacam-se também os isolados que apresentam mais de um mecanismo de promoção de crescimento vegetal (com círculo). Os três agrupamentos no quadrante superior, dois à direita e um à esquerda na parte superior apresentam isolados com produção de AIA e controle biológico, mas diferem quanto à intensidade de produção e controle. Nesses agrupamentos não há isolados de solo. Sobre o eixo central à esquerda há dois agrupamentos, sendo um deles constituído de isolados com produção de AIA e solubilização de fosfato e um único isolado (ENDO26) que apresenta os três mecanismos.

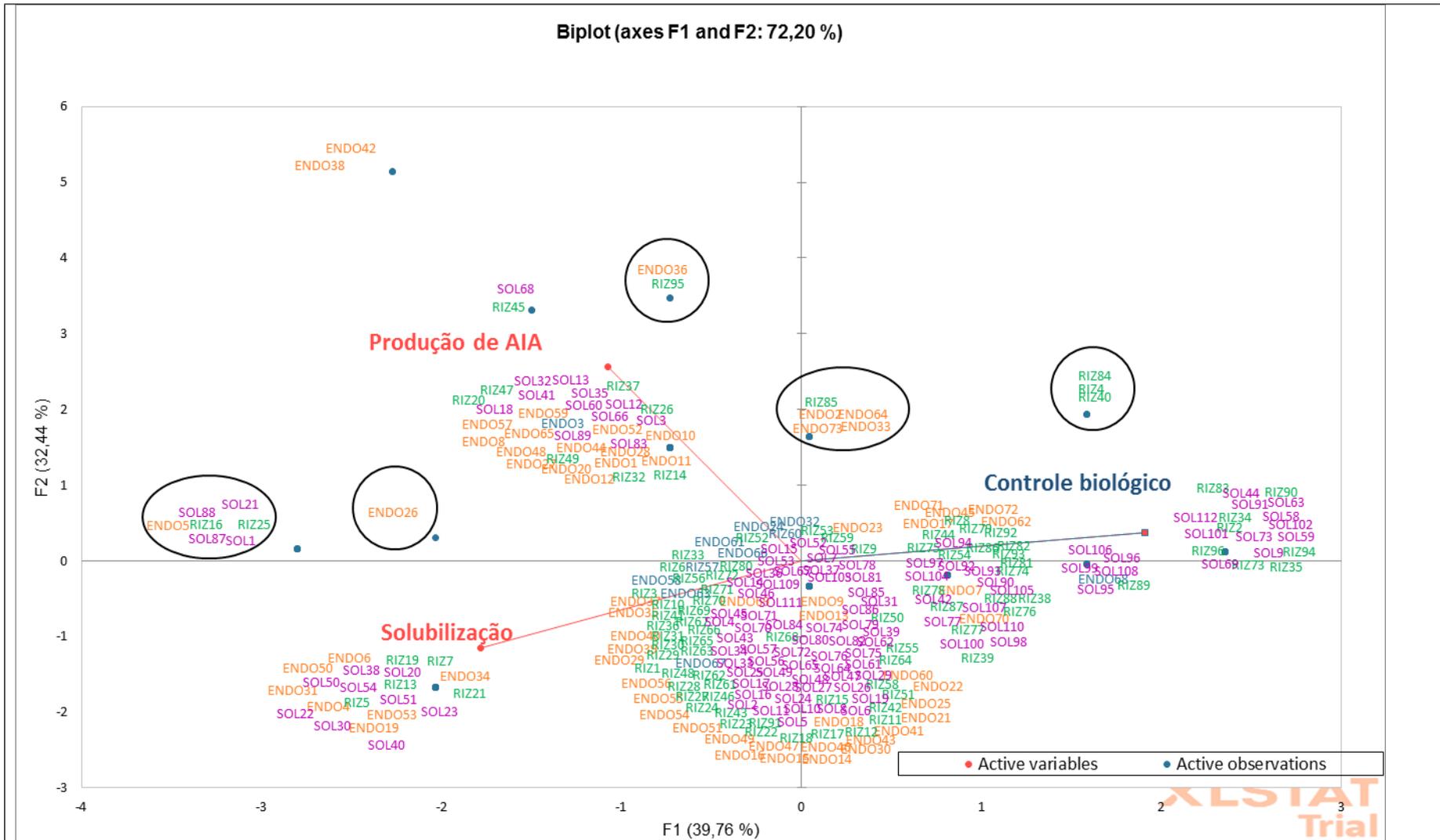


Figura 16. Análise de Componente Principal dos isolados de solo (SOL, cor roxa), endosfera (ENDO, cor laranja) e rizosfera (RIZ, cor verde) e mecanismos de promoção de crescimento, indicados nos vetores. Os círculos indicam os agrupamentos de isolados com mais de um mecanismo de produção vegetal.

O número de isolados com mais de um mecanismo constituíram 6,4% do total de isolados. Outros trabalhos relatam micro-organismos com mais mecanismos, vinte e uma bactérias isoladas da rizosfera de plantas de alfafa apresentaram mais de um mecanismo de promoção de crescimento vegetal como produção de sideróforos, ácido indolacético, solubilização de fosfato, ácido orgânico, produção de amônia (BARUCHA; PATEL; TRIVEDI, 2013). Bactérias endofíticas *Pigmentiphaga litoralis*, *Caballeronia sordidicola*, *Pseudomonas* spp. apresentaram ambos mecanismos atividade catalase, produção de amônia e produção de sideróforos (PURI; PADDA; CHANWAY, 2020). As leveduras *Aureobasidium pullulans* e *Rhodotorula mucilaginosa* isoladas de solo de leguminosa se mostraram ser produtoras de AIA e ter atividade antifúngica contra mais de um fitopatógeno (IGNATOVA *et al.*, 2015). *Torulaspota globosa* isolada de rizosfera de cana-de-açúcar também apresenta mais de um mecanismo como produção de AIA, solubilização de fosfato e controle de fitopatógenos (ROSA, 2009; ROSA *et al.*, 2010; ROSA-MAGRI *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

5.6 Avaliação do efeito de isolados de cana-de-açúcar na promoção de crescimento de *Arabidopsis thaliana* in vitro

Para avaliação da promoção do crescimento vegetal em *A. thaliana* foram selecionados três microrganismos isolados, a bactéria ENDO26 que apresentou os mecanismos de produção de AIA, solubilização de fosfato e controle biológico de *F. verticillioides*; a levedura SOL88 que produziu AIA e solubilizou fosfato; e fungo RIZ85 que produziu AIA e controlou o fitopatógeno (Figura 17).

A levedura inibiu o desenvolvimento das raízes comparado aos demais isolados e ao controle (ausência de micro-organismo). Entre os três isolados, a bactéria foi a que manteve o crescimento radicular, sendo semelhante ao controle (Figura 18).

Até o momento avaliado, em nenhum tratamento foi observada a formação de pelos radiculares e nem de raízes laterais, como mostra a Figura 19.

Figura 17. Aspecto das placas (parte superior) e das células (parte inferior) da levedura SOL88, do fungo filamentososo RIZ85 e da bactéria ENDO26 em meio YEPD, BDA e Ágar Nutriente, respectivamente. As fotos das células em microscopia óptica foram tiradas no aumento de 400 X.

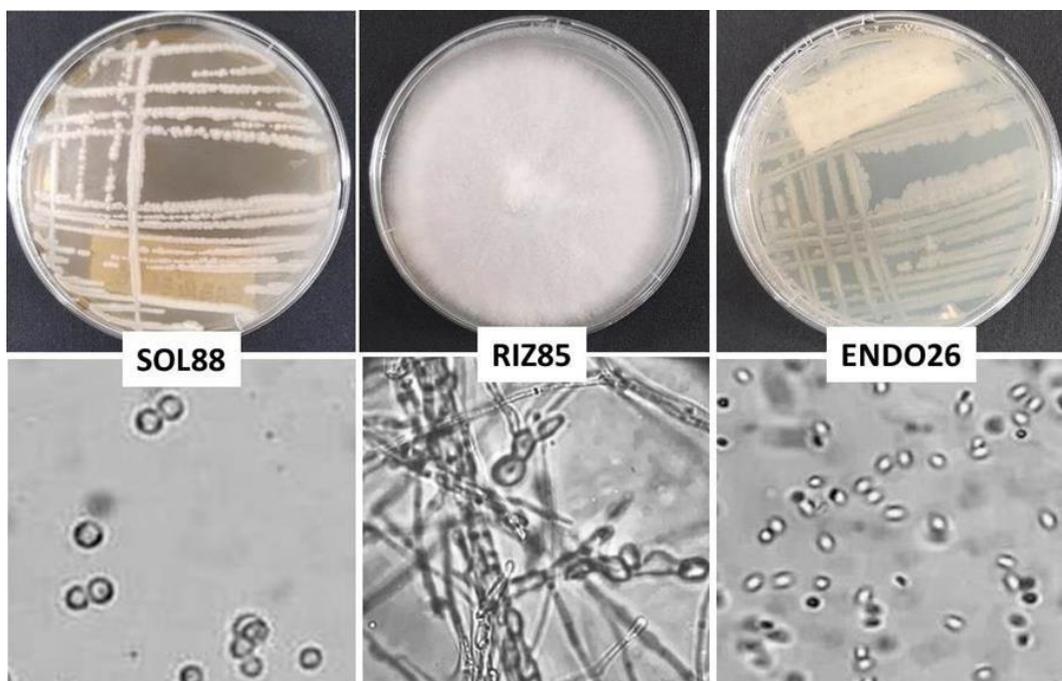


Figura 18. Comprimento de raiz de mudas de *A. thaliana* inoculada com isolados de cana-de-açúcar *in vitro*. Os valores do eixo y foram calculados através da média de cinco plantas por placa, seguido da média das três placas.

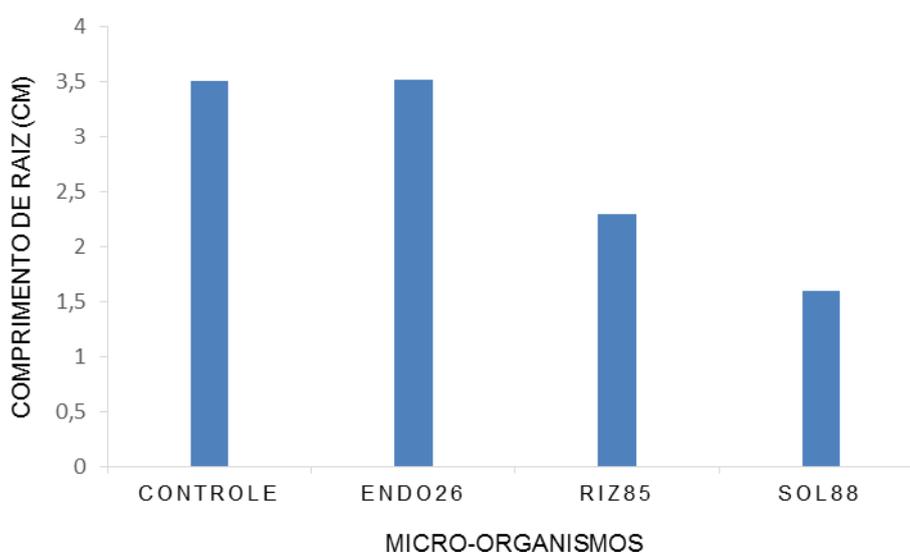
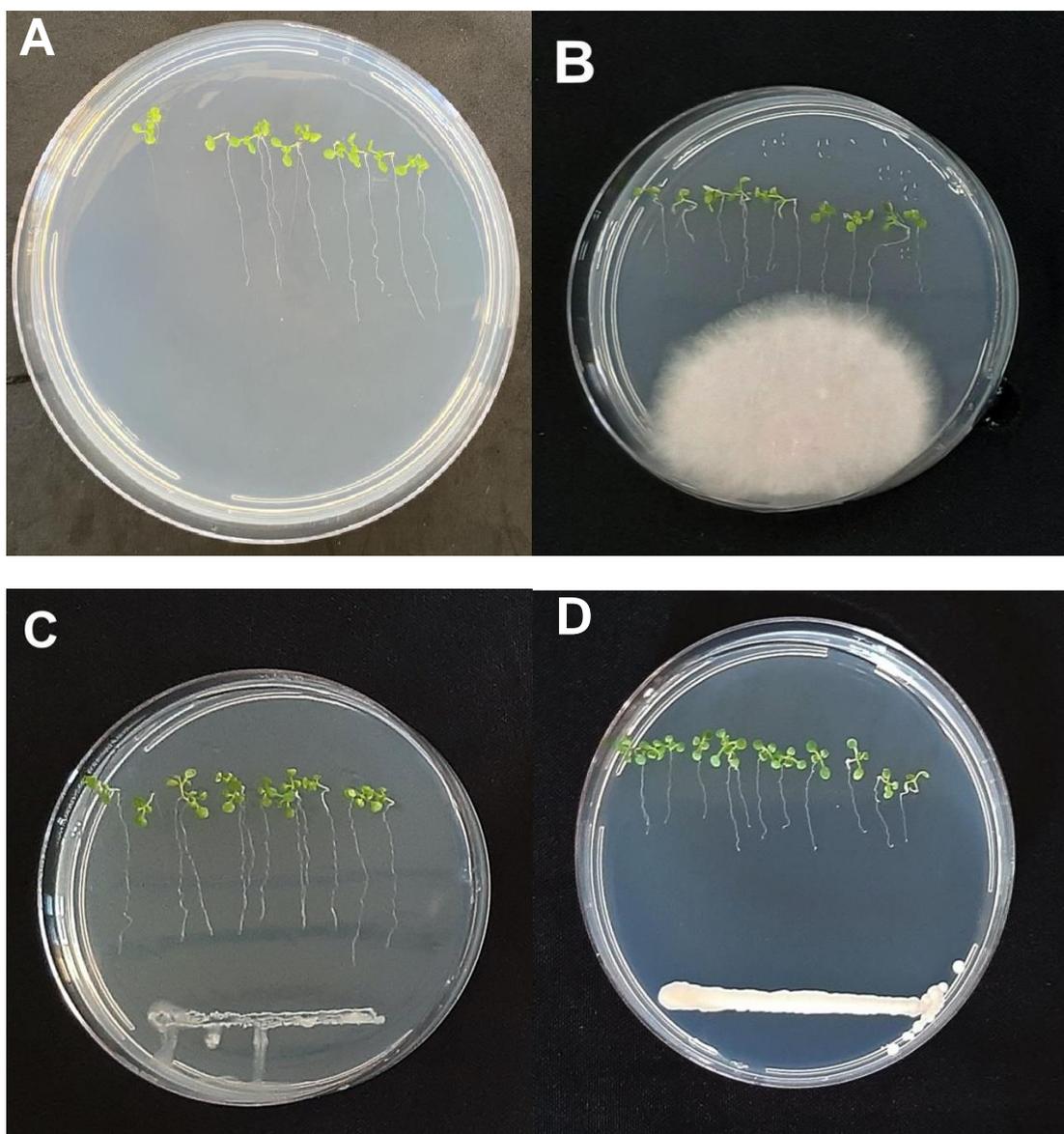


Figura 19. Cultivo de *A. thaliana* com os isolados de cana-de-açúcar. A: controle, B: fungo filamentososo RIZ85, C: bactéria ENDO26, e D: levedura SOL88.



No trabalho de Contreras-Cornejo *et al.* (2009) os fungos *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma virens* aumentaram a biomassa e estimularam o desenvolvimento de raiz lateral em *Arabidopsis*. *Kitasatospora* sp. e *Streptomyces* isoladas da rizosfera de inhame promoveram o crescimento de mudas de *Arabidopsis*, aumentando também o número de raízes laterais, um fator observado em mudas inoculadas com bactérias produtoras de AIA (PALANIYABDI *et al.*, 2012). MÉNDEZ-GÓMEZ *et al.* (2020) testaram a bactéria *Azospirillum brasilense*, produtora de AIA, e foi observada uma diminuição no

comprimento radicular, mas um aumento das raízes laterais nas concentrações 10^3 e 10^5 UFC/mL.

Uma possibilidade seria esperar por mais tempo o desenvolvimento das mudas e testar diferentes concentrações dos microrganismos, outras fases de crescimento vegetal, concentrações de nutrientes do meio de cultura. Também existe o fato de especificidade entre planta e micro-organismo, que varia de acordo com as características genéticas de ambos, como citado por Liu et al. (2016), a composição dos exsudatos radiculares pode variar de acordo com o micro-organismo presente.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que o solo, a rizosfera e a endosfera de cana-de-açúcar são locais onde podemos obter isolados com potencial para promoção de crescimento vegetal. Dentre os grupos microbianos isolados, as bactérias se destacam tanto em número, quanto por apresentar, com destaque, os mecanismos avaliados (produção de AIA, solubilização de fosfato e controle de fitopatógeno).

O solo foi o ambiente que forneceu maior número de isolados capazes de solubilizar fosfato, enquanto a rizosfera apresentou maior número de isolados antagonistas ao fitopatógeno. A endosfera apresentou os isolados que produziram maior quantidade de AIA.

Os isolados selecionados, representantes da rizosfera, solo e endosfera, respectivamente, sendo um fungo filamentoso (RIZ58), uma levedura (SOL88) e uma bactéria (ENDO26), se destacaram por apresentar mais de um mecanismo avaliado. Apesar disso, estas linhagens foram avaliadas em teste *in vitro* com *A. thaliana*, e não demonstraram promover o crescimento desta espécie vegetal.

São necessários testes mais detalhados, com outras espécies vegetais, em condições de casa-de-vegetação e campo para que se possa verificar o real potencial dessas linhagens como promotoras de crescimento de plantas. Além

disso, é imperativo a identificação das espécies para que possíveis espécies patogênicas ao ser humano sejam descartadas.

Com este trabalho foi possível a construção de um banco de linhagens, pré-analisadas, que serão futuramente estudadas em outros projetos, com o objetivo de buscar microrganismos que possam ser explorados na agricultura e na agroindústria.

8. LITERATURA CITADA

AFZAL, I.; SHINWARI, Z. K.; SIKANDAR, S.; SHAHZAD, S. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological Research**, v. 221, p. 36-49, 2019.

AHMAD, M.; AHMAD, I.; HILGER, T. H.; NADEEM, S. M.; AKHTAR, M. F.; JAMIL, M.; HUSSAIN, A.; ZAHIR, Z. A. Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. **PeerJ**, v. 6, e5122, 2018.

AMPRAYN, K.; ROSE, M. T.; KECSKÉS, M.; PEREG, L.; NGUYEN, H. T.; KENNEDY, I. R. Plant growth promoting characteristics of soil yeast (*Candida tropicalis* HY) and its effectiveness for promoting rice growth. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 295-299, 2012.

ANTUNES, J. E. L.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, L. M.S.; LYRA, M. C. C. P.; FONSECA, M.A. C.; SANTOS, C. E. R.; OLIVEIRA, J. P.; ARAÚJO, A. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Sugarcane inoculated with endophytic diazotrophic

bacteria: effects on yield, biological nitrogen fixation and industrial characteristics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, p. 1-12, 2019.

BADRI, D. V., VIVANCO, J. M. Regulation and function of root exudates. **Plant Cell Environ**, v. 32, p. 666 -681, 2009.

BALDAN, E.; NIGRIS, S.; ROMUALDI, C.; D'ALESSANDRO, S.; CLOCCHIATTI, A.; ZOTTINI, M.; STEVANATO, P.; SQUARTINI, A.; BALDAN, B. Beneficial bacteria isolated from grapevine inner tissues shape *Arabidopsis thaliana* roots. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. 1-18, 2015.

BARBOSA, J.Z.; CONSALTER, R.; VEZZANI, F.M.; MOTTA, A.C.V. Bactérias e fungos benéficos na endosfera das plantas. **Revista Agroambiental**, v.7, n.3, p. 99-116, 2015.

BARRERA, S. E.; SARANGO-FLÓRES, S. W.; MONTENEGRO-GÓMEZ, S.P. The phyllosphere microbiome and its potential application in horticultural crops – A review. **Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas**, 13 (3), 2019.

BARUCHA, U. D.; PATEL, K. C.; TRIVEDI, U. B. *In vitro* screening of isolates for its plant growth promoting activities from the rhizosphere of Alfafa (*Medicago Sativa*). **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 3, n. 5, 2013.

BEHBAHANI, B. A.; YAZDI, F. T.; SHAHIDI, F.; MORTAZAVI, S. A.; MOHEBBI, M. Principle component analysis (PCA) for investigation of relationship between population dynamics of microbial pathogenesis, chemical and sensory characteristics in beef slices containing Tarragon essential oil. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 37-50, 2017.

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F. COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth

promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94-104, 2013.

BHARDWAJ, D.; ANSARI, M. W.; SAHOO, R. K.; TUTEJA, N. Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2014.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327-1350, 2011.

BHATTACHARYYA, D.; GARLADINNE, M.; LEE, Y. H. Volatile indole produced by *Rhizobacterium proteus vulgaris* JBS202 stimulates growth of *Arabidopsis thaliana* through auxin, cytokinin, and brassinosteroid pathways. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 34, n.1, p. 158-168, 2014.

BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 53, p. 1-8, 2011.

BURBANO-FIGUEROA, O. Resistencia de plantas a patógenos: una revisión sobre los conceptos de resistència vertical y horizontal, **Revista Argentina de Microbiología**, v. 52, n. 3, p. 245-255, 2020.

BUSBY, P. E.; SOMAN, C.; WAGNER, M. R.; FRIESEN, M. L.; KREMER, J.; BENNET, A.; MORSY, M.; EISEN, J.; LEACH, J. E.; DANGL, J. L. Research priorities for harnessing plant microbiomes in sustainable agriculture. **Plos Biology**, v. 15, n. 3, p. 1-14, 2017.

CABRINI, P. G.; SALA, F. C.; MAGRI, M. M. R. *Torulaspota globosa*: rizosphere promoting lettuce growth on seedlings and under field conditions. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 266-271, 2019.

CHAUHAN, M. K.; VARUN; CHAUDHARY, S.; KUMAR, S.; SAMAR. Life cycle

assessment of sugar industry: a review: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 7, p. 3445-3453, 2011.

CHEN, K.; TIAN, Z.; HE, H; LONG, C.; JIANG, F. *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. **Biological Control**, v. 151, p. 1-9, 2020.

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Perspectivas para a agropecuária, 2019. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>

CONAB, **Companhia Nacional de Abastecimento**. Acompanhamento da safra brasileira, cana-de-açúcar, 2020. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; CORTÉS-PENAGOS, C.; LÓPEZ-BUCIO, J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 149, n. 3, p. 1579-1592, 2009.

CONTRERAS-CORNEJO, H. A.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L.; DEL-VAL, E.; LARSEN, J. Ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 92, n. 4, p. 1-17, 2016.

DE-LA-PEÑA, C.; LOYOLA-VARGAS, V. M. Biotic Interactions in the rhizosphere: a diverse cooperative enterprise for plant productivity. **Plant Physiology**, v. 166, n. 2, p. 701-719, 2014.

DINI-ANDREOTE, F. Endophytes: the second layer of plant defense. **Trends In Plant Science**, v. 25, n. 4, p. 319-322, 2020.

FANG, K.; WANG, Y. Z.; ZHANG, H. B. Differential effects of plant growth-promoting bacteria on invasive and native plants. **South African Journal of Botany**, v. 124, p. 94-101, 2019.

FERROL, N.; AZCÓN-AGUILAR, C.; PÉREZ-TIENDA, J. Review: arbuscular mycorrhizas as key players in sustainable plant phosphorus acquisition. **Plant Science**, v. 280, p. 441-447, 2019.

FONTANA, D. C.; PAULA, S.; TORRES, A. G.; SOUZA, V. H. M.; PASCHOLATI, S. F.; SCHMIDT, D.; DOURADO NETO, D. Endophytic Fungi: biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. **Pathogens**, v. 10, n. 5, p. 1-28, 2021.

GAUTAM, A. K.; AVASTHI, S. Fungal endophytes: potential biocontrol agents in agriculture. **Role of Plant Growth Promoting Microorganisms in Sustainable Agriculture and Nanotechnology**, p. 241-283, 2019.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. **Plant Physiology**, v.26, p.192–195, 1951.

GONZÁLEZ-PÉREZ, E.; ORTEGA-AMARO, M. A.; SALAZAR-BADILLO, F. B.; BAUTISTA, E.; DOUTERLUNGNE, D.; JIMÉNEZ-BREMONT, J. F. The *Arabidopsis-Trichoderma* interaction reveals that the fungal growth medium is an important factor in plant growth induction. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.

HARMAN, G. E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzinum* T-22. **Plant Disease**, v. 84, n. 4, p. 377-393, 2000.

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; ABD_ALLAH, E. F. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1291-1297, 2019.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. **Embrapa Soja**, p. 1-48, 2001.

IGNATOVA, L. V.; BRAZHNIKOVA, Y. V.; BERZHANOVA, R. Z.; MUKASHEVA, T. D. Plant growth promotion and antifungal activity of yeasts from dark chestnut soil. **Microbiological Research**, v.175, p.78-83, 2015.

JOHNS, N. I.; BLAZEJEWSKI, T.; GOMES, A. L.; WANG, H. H. Principles for designing synthetic microbial communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 31, p. 146-153, 2016.

KANDEL, S. L.; FIRINCIELI, A.; JOUBERT, P. M.; OKUBARA, P. A.; LESTON, N. D.; MCGEORGE, K. M.; MUGNOZZA, G. S.; HARFOUCHE, A.; KIM, S.; DOTY, S. L. An In vitro study of bio-control and plant growth promotion potential of Salicaceae endophytes. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-16, 2017.

KHUNNAMWONG, P.; JINDAMORAKOT, S.; LIMTONG, S. Endophytic yeast diversity in leaf tissue of rice, corn and sugarcane cultivated in Thailand assessed by a culture-dependent approach. **Fungal Biology**, v. 122, n. 8, p. 785-799, 2018.

KUMAR, A.; DROBY, S.; SINGH, V. K.; SINGH, S. K.; WHITE, J. F.; Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. **Microbial Endophytes**, p. 1-33, 2020.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético *in vitro* por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n.10, p. 1459-1456, 2007.

LAMBAIS, M. R.; CURY, J. C.; MALUCHE-BARETTA, R.; BULL, R. C. Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. **Tópicos Ci. Solo**, 4:43-84, 2005.

LAREEN, A.; BURTON, F.; SCHÄFER, P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 575-587, 2016.

LIMTONG, S.; KAEWWICHIAN, R.; YONGMANITCHAI, W.; KAWASAKI, H. Diversity of culturable yeasts in phylloplane of sugarcane in Thailand and their capability to produce indole- 3-acetic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 1785-1796, 2014.

LIRA, D. N. S.; ARAUCO, A. M. S.; BOECHAT, C. L.; MOITINHO, M. R.; LACERDA, J. J. J.; MARTINS, E. C. Associative diazotrophic bacteria inoculated in sugarcane cultivars: implications on morphophysiological attributes and plant nutrition. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 44, p. 1-17, 2020.

LIU, Y.; CHEN, L.; ZHANG, N.; LI, Z.; ZHANG, G.; XU, Y.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Plant-microbe communication enhances auxin biosynthesis by a root-associated bacterium, *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 29, n. 4, p. 324-330, 2016.

MARCHIORO, L. E. D. **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. 2005. 76 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MEHMOOD, A.; HUSSAIN, A.; IRSHAD, M.; HAMAYUN, M.; IQBAL, A.; KHAN, N. In vitro production of IAA by endophytic fungus *Aspergillus awamori* and its growth promoting activities in *Zea mays*. **Symbiosis**, v. 77, n. 3, p. 225-235, 2018.

MEHMOOD, A.; IRSHAD, M.; KHAN, N.; HAMAYUN, M.; ISMAL; HUSNA; JAVED, A. IAA producing endophytic fungus *Fusarium oxysporum* wlv colonize maize roots and promoted maize growth under hydroponic condition. **European Journal of Experimental Biology**, v. 8, n. 4, p. 1-7, 2018.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAÚJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 2007.

MOMMER, L.; KIRKEGAARD, J.; VAN RUIJVEN, J. Root–root interactions: towards a rhizosphere framework. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 3, p. 209-217, 2016.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

NEWTON, A.C., FITT, B.D., ATKINS, S.D., WALTERS, D.R., DANIEL, T.J. Pathogenesis, parasitism and mutualism in the trophic space of microbe-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v. 8, p. 365-373, 2010.

NUTARATAT, P.; SRISUK, N.; ARUNRATTIYAKORN, P.; LIMTONG, S. Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. **Fungal Biology**, v. 118, n. 8, p. 683-694, 2014.

OLANREWAJU, O.S., GLICK, B.R., BABALOLA, O.O. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33, p.197, 2017.

OLIVEIRA, A. L. M. et al The effect of inoculating endophytic N₂-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. **Plant and Soil**, v. 242, n. 2, p. 205-215, 2002.

OLIVEIRA, T. B.; BIZZARIA JUNIOR, F.; SILVA, L. GL; ROSA-MAGRI, M. M. Rhizosphere yeast *Torulaspota globosa* with plant growth promotion traits and improvement of the development of tomato seedlings under greenhouse conditions. **African Journal of Agricultural Research**, v. 14, n. 22, p. 935-942, 2019.

OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; ROCHA-GRANADOS, M. C.; GLICK, B. R.; SANTOYO, G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. **Microbiological Research**, v. 208, p. 25-31, 2018.

OUKALA, N.; AISSAT, K.; PASTOR, V. Bacterial endophytes: the hidden actor in plant immune responses against biotic stress. **Plants**, v. 10, n. 5, p. 1-24, 2021.

PATEL, P.; SHAH, R.; JOSHI, B.; RAMAR, K.; NATARAJAN, A. Molecular identification and biocontrol activity of sugarcane rhizosphere bacteria against red rot pathogen *Colletotrichum falcatum*. **Biotechnology Reports**, v. 2, p. 1-8, 2019.

PALANIYANDI, S. A.; YANG, S. H.; DAMODHARAN, K.; SUH, J. Genetic and functional characterization of culturable plant-beneficial actinobacteria associated with yam rhizosphere. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 12, p. 985-995, 2013.

PÉREZ-MONTAÑO, F.; ALÍAS-VILLEGAS, C.; BELLOGÍN, R. A.; DEL CERRO, P.; ESPUNY, M. R.; JIMÉNEZ-GUERRERO, I.; LÓPEZ-BAENA, F. J.; OLLERO, F. J., CUBO, T. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiological Research**, v. 169, n. 5-6, p. 325-336, 2014.

PRAKASH, J.; ARORA, N. K. Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. **3 Biotech**, v. 9, n. 4, p. 1-9, 2019.

PURI, A.; PADDA, K. P.; CHANWAY, C. P. In vitro and in vivo analyses of plant-growth-promoting potential of bacteria naturally associated with spruce trees growing on nutrient-poor soils. **Applied Soil Ecology**, v. 149, p. 1-15, 2020.

RANA, K. L.; KOUR, D.; KAUR, T.; DEVI, R.; YADAV, A. N.; YADAV, N.; DHALIWAL, H. S.; SAXENA, A. K. Endophytic microbes: biodiversity, plant growth-promoting mechanisms and potential applications for agricultural sustainability. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 113, n. 8, p. 1075-1107, 2020.

RASMANN, S.; TURLINGS, T. C. Root signals that mediate mutualistic interactions in the rhizosphere. **Current Opinion In Plant Biology**, v. 32, p. 62-68, 2016.

RAVNSKOV, S.; CABRAL, C.; LARSEN, J. Mycorrhiza induced tolerance in *Cucumis sativus* against root rot caused by *Pythium ultimum* depends on fungal species in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Biological Control**, v. 141, p. 1-5, 2020.

RODRIGUES, A. A.; FORZANI, M. V.; SOARES, R. S.; SIBOV, S. T.; VIEIRA, J. D. G. Isolation and selection of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 2, p. 149-158, 2016.

ROMÃO-DUMARESQ, A. S.; DOURADO, M. N.; FÁVARO, L. C. L.; MENDES, R.; FERREIRA, A.; ARAÚJO, W. L.; Diversity of cultivated fungi associated with conventional and transgenic sugarcane and the interaction between endophytic *Trichoderma virens* and the host plant. **Plos One**, v. 11, n. 7, p. 1-28, 2016.

ROSA-MAGRI, M. **Avaliação de leveduras isoladas de áreas agrícolas como agentes de controle biológico de fitopatógenos**. 2009.151 f. Tese (Doutorado Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual de São Paulo, Rio Claro.

ROSA, M. M.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; RAMPAZZO, P. E.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Evaluation of the biological control by the yeast *Torulaspota globosa* against *Colletotrichum sublineolum* in sorghum. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 8, p. 1491-1502, 2010.

ROSA-MAGRI, M. M.; AVANSINI, S. H.; LOPESASSAD, M. L.; TAU-K-TORNISIELO, S. M.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Release of potassium from rock powder by the yeast *Torulaspota globosa*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 4, p. 577-582, 2012.

SANTOS, S. G.; CHAVES, V. A.; RIBEIRO, F. S.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 12-23, 2018.

SANTOS, S. G.; CHAVES, V. A.; RIBEIRO, F. S.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. **Applied Soil Ecology**, v. 133, p. 12-23, 2019.

SASSE, J.; MARTINOIA, E.; NORTHEN, T. Feed your friends: do plant exudates shape the root microbiome? **Trends in Plant Science**, v. 23, n. 1, p. 25-41, 2018.

SENTHILKUMAR, M., ANANDHAM, R., MADHAIYAN, M., VENKATESWARAN, V., SA, T. Endophytic 895 bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production. **Bacteria in Agrobiological Crop 896 Ecosystems**, p. 61–96, 2011.

SCHLAEPPI, K.; BULGARELLI, D. The plant microbiome at work. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v. 28, n. 3, p. 212-217, 2015.

SHASTRI, B.; KUMAR, R. Microbial secondary metabolites and plant–microbe communications in the rhizosphere. **New Future Developments In Microbial Biotechnology And Bioengineering**, p. 93-111, 2019.

SINGH, P. P.; KUJUR, A.; YADAV, A.; KUMAR, A.; SINGH, S. K.; PRAKASH, B. Mechanisms of plant-microbe interactions and its significance for sustainable agriculture. **Pgpr Amelioration in Sustainable Agriculture**, p. 17-39, 2019.

SOUZA, R. S. C.; OKURA, V. K.; ARMANHI, J. S. L.; JORRÍN, B.; LOZANO, N.; SILVA, M. J.; GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; ARAÚJO, L. M.; VERZA, N. C.; BAGHERI, H. C. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2016.

SUGIYAMA, A. The soybean rhizosphere: metabolites, microbes, and beyond :a review: Metabolites, microbes, and beyond - A review. **Journal of Advanced Research**, v. 19, p. 67- 73, 2019.

SYAMSIA; KUSWINANTI, T.; SYAM'UN, E.; MASNIAWATI, A. The potency of endophytic fungal isolates collected from local aromatic rice as indole acetic acid (IAA) Producer. **Procedia Food Science**, v. 3, p. 96-103, 2015.

TORRES, M.; LLAMAS, I.; TORRES, B.; TORAL, L.; SAMPEDRO, I.; BÉJAR, V. Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. **Applied Soil Ecology**, v. 150, p. 1-8, 2020.

VERBON, E. H.; LIBERMAN, L. M. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 3, p. 218-229, 2016.

VESSEY J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant Soil**, v., 255 p. 571- 86, 2003.

VOGEL, T. M.; SIMONET, P.; JANSSON, J. K.; HIRSCH, P. R.; TIEDJE, J. M.; ELSAS, J. D.; BAILEY, M. J.; NALIN, R.; PHILIPPOT, L. Terra Genome: a consortium for the sequencing of a soil metagenome. **Nature Review Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 252-252, 2009.

YOSHIDA, F.A.; STOLF, R. Mapeamento digital de atributos e classes de solos da UFSCar – Araras/SP. **Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v.3, n.1, p.1-11, 2016.