



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



**“AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS A  
*Paspalum vaginatum* PARA DESENVOLVIMENTO DE NOVOS  
BIOINSUMOS”**

**Paulo Henrique Gomes Lisboa\***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

***Orientador:***

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

***Coorientadora:***

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

\*bolsista CAPES - 88887.495803/2020-00

**São Carlos - SP**

**2024**

PAULO HENRIQUE GOMES LISBOA

**“AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS A  
*Paspalum vaginatum* PARA DESENVOLVIMENTO DE NOVOS  
BIOINSUMOS”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

***Orientador:***

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

***Coorientadora:***

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

**São Carlos  
2024**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**



---

### Folha De Aprovação

---

Aprovação da Defesa de tese de Doutorado do candidato Paulo Henrique Gomes Lisboa, realizada em 27/06/2024.

**Membros da Comissão Examinadora:**

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava (UFSCar)

Dr. Wilson Malagó Júnior (EMBRAPA)

Dra. Sônia Regina Nogueira Stephan (EMBRAPA)

Dra. Paula Cristiane Machado (Bioagrocert)

Dra. Amanda Carolina Prado de Moraes (Monera Agrociência)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Examinadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, Antônio, Eva, Poliana, Sabrino, Karolino e Hope, pelo amor incondicional e por estarem sempre ao meu lado nos momentos bons e ruins, independente da distância. São minha base, amo vocês!

Ao Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pela orientação, pela oportunidade de crescimento profissional, pela paciência e pela ímpar orientação. Por tudo, obrigado!

À profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa, pela coorientação, pelo apoio ímpar em momentos difíceis e por toda sua luta em prol da evolução do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFSCar.

À Dra. Alessandra Pereira Fávero, à Dra. Sônia Regina Nogueira, à Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna e ao Dr. Wilson Malagó Júnior por todo o ensinamento e auxílio durante as etapas do projeto realizadas na Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

Aos colegas do LaMiB – Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas, Departamento de Morfologia e Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, por todos estes anos de convivência e aprendizado. Sou grato por cada auxílio recebido, cada conversa, cada momento.

Aos colegas, técnicos, docentes, terceirizados e demais funcionários do Departamento de Patologia e Morfologia, por todos os anos de convivência e pela amizade.

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2020/11315-6) pelo apoio financeiro para realização dessa pesquisa.

À todos os amigos que fiz na cidade de São Carlos, que me ajudaram na adaptação e na construção de uma nova vida. Gratidão eterna.

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

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001"

*“É necessário sempre acreditar que o sonho é possível  
Que o céu é o limite e você, truta, é imbatível  
Que o tempo ruim vai passar, é só uma fase  
Que o sofrimento alimenta mais a sua coragem.”  
(A vida é desafio – Racionais MC’s feat. Afro-X)*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 A:** acesso 114 do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Pecuária Sudeste. **B:** vista em detalhe do acesso de *Paspalum vaginatum*. .....- 31 -
- Figura 2** Acessos de *Paspalum* sp. do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*) da Embrapa Pecuária Sudeste .....- 32 -
- Figura 3** Desenho esquemático indicando a forma de medição do diâmetro dos halos (Dh) e das colônias (Dc) numa placa com fosfato bibásico de cálcio insolúvel. Fonte: desenvolvido pelo autor. ....- 34 -
- Figura 4** Representação esquemática da primeira etapa do ensaio de antagonismo *in vitro*. Na placa-controle (à direita) não houve inoculação bacteriana. ....- 36 -
- Figura 5** Representação esquemática da segunda etapa do ensaio de antagonismo *in vitro*, com a mensuração dos parâmetros Dh (diâmetro médio do halo de inibição) e Dc (diâmetro médio do controle). Na placa-controle (à direita) não houve inoculação bacteriana. ....- 37 -
- Figura 6** Inoculação por imersão das raízes de *P. vaginatum* em solução bacteriana. A: controle positivo (BiomaPhos®); B: tratamento com isolado 139; C: controle negativo. ....- 38 -
- Figura 7** Ensaio de fixação biológica de nitrogênio. **A)** no tubo à esquerda a fixação de nitrogênio é observada no isolado positivo pela formação da película em meio NFb semissólido livre de nitrogênio. **B)** no tubo à direita, o controle sem inoculação bacteriana. Fonte: documentado pelo autor. ....- 42 -
- Figura 8** Cubetas do ensaio de ácido 3-indolacético. **A)** controle, demonstrando translucidez. **B)** e **C)** isolados que produziram AIA, mostrando que quanto mais intensa a coloração, maior a produção do fitormônio. Fonte: documentado pelo autor. ....- 47 -
- Figura 9** Exemplo da mensuração do halo indicador de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc) de um isolado rizobacteriano positivo para solubilização de fosfato inorgânico. Fonte: documentado pelo autor. ....- 49 -
- Figura 10** Ensaio de pareamento direto do isolado 115 (*Streptomyces* sp.). **A)** pareamento direto contra *Colletotrichum* sp.; à esquerda a placa-controle, somente com a inoculação do disco micelial do fungo; à direita, a placa com inoculação do isolado. **B)** pareamento direto contra *Bipolaris* sp.; à esquerda a placa-controle, somente com a inoculação do disco micelial do fungo; à direita, a placa com inoculação do isolado. Fonte: documentado pelo autor. ....- 51 -
- Figura 11.** Proporção dos gêneros de RPCV associadas à *P. vaginatum*. Fonte: próprio autor. ....- 56 -
- Figura 12.** Dendograma da biodiversidade de rizobactérias associadas à *Paspalum vaginatum*, com sequências de comparação. Fonte: próprio autor. ....- 57 -
- Figura 13** Ensaio de promoção de crescimento em *Paspalum vaginatum* após 10 dias do plantio das sementes. **A:** controle negativo; **B:** controle positivo (BiomaPhos®). ....- 60 -
- Figura 14** Assepsia das sementes de *Paspalum regnellii*. **A:** Hipoclorito de sódio; **B:** Etanol 70%; C e D: água destilada. Fonte: próprio autor. ....- 84 -
- Figura 15** Imersão das raízes das mudas de *Paspalum regnellii* em solução bacteriana padronizada. Fonte: próprio autor. ....- 85 -

<b>Figura 16</b> Quantificação de P solúvel por método colorimétrico. <b>A:</b> Controle (Fosfato de cálcio sem inóculo bacteriano); <b>B:</b> Fosfato de cálcio + Bac 5 ( <i>Acinetobacter</i> sp.). Fonte: próprio autor. ....	88 -
<b>Figura 17</b> Segunda inoculação de solução bacteriana padronizada em <i>P. regnellii</i> . Fonte: próprio autor ...	92 -
<b>Figura 18</b> <b>A:</b> medida de comprimento da maior folha esticada; <b>B:</b> detalhe da marcação no perfilho do qual foram contadas as folhas completamente expandidas. Fonte: próprio autor. ....	93 -
<b>Figura 19</b> Imersão das raízes das mudas de <i>Paspalum regnellii</i> nas soluções bacterianas padronizadas. Fonte: próprio autor. ....	95 -
<b>Figura 20</b> Aspersão de solução padronizada com conídios de <i>Colletotrichum</i> sp. nas folhas de <i>Paspalum regnellii</i> , em câmara de nebulização. Fonte: próprio autor. ....	97 -
<b>Figura 21</b> Escala de graus de intensidade de antracnose em <i>Paspalum regnellii</i> . <b>A:</b> nota 1 - ausência de sintomas; <b>B:</b> nota 2 - sintomas da doença ocupando 1-10% da parte aérea da planta; <b>C:</b> nota 3 - sintomas da doença ocupando de 11-20% da parte aérea da planta; <b>D:</b> nota 4 - sintomas da doença ocupando de 21-30% da parte aérea da planta; <b>E:</b> nota 5 - sintomas da doença ocupando de 31-40% da parte aérea da planta; <b>F:</b> nota 6 - sintomas da doença ocupando mais de 40% da parte aérea da planta. Fonte: próprio autor. ....	98 -
<b>Figura 22</b> Ensaio de promoção de crescimento em <i>Paspalum regnellii</i> após 20 dias do plantio das sementes. <b>A:</b> tratamento com isolado 127 ( <i>Dyella</i> sp.); <b>B:</b> controle negativo; <b>C:</b> controle positivo (BiomaPhos®). ....	100 -
<b>Figura 23</b> Resultado gráfico dos descritores altura (AT), número de perfilhos (PF) e número de folhas expandidas (FTE) para os tratamentos em <i>Paspalum regnellii</i> ao longo das semanas. ....	110 -
<b>Figura 24</b> Exemplo da diferença de perfilhamento entre tratamentos (indicada pela seta azul). <b>A:</b> tratamento SSB (solo com adição de ST e sem adição de inóculo rizobacterianos); <b>B:</b> tratamento S5 (solo com adição de ST + Bac 5 ( <i>Acinetobacter</i> sp.)). Fonte: próprio autor. ....	111 -
<b>Figura 25</b> Exemplo da diferença de altura entre tratamentos. <b>A:</b> tratamento C5 (solo sem adição de fonte de P + Bac 5 ( <i>Acinetobacter</i> sp.)); <b>B:</b> tratamento CSB (solo sem adição de fonte de P e sem adição de inóculo rizobacterianos). Fonte: próprio autor. ....	114 -
<b>Figura 26</b> Resultado gráfico dos descritores área superficial foliar (AF) e área superficial radicular (AR), em barras relativas ao eixo esquerdo (cm <sup>2</sup> ), e de peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco radicular (PSR), em linhas relativas ao eixo direito (g) dos tratamentos em <i>Paspalum regnellii</i> nas quatro coletas realizadas. ....	119 -
<b>Figura 27</b> Exemplo da diferença de AF e AR entre tratamentos. <b>A:</b> tratamento C5 [solo sem adição de fonte de P + Bac 5 ( <i>Acinetobacter</i> sp.)]; <b>B:</b> tratamento CSB (solo sem adição de fonte de P e sem adição de inóculo rizobacterianos). Fonte: próprio autor. ....	120 -
<b>Figura 28</b> Exemplo de resultado do ensaio de biocontrole de <i>Colletotrichum</i> sp. em <i>Paspalum regnellii</i> , após 25 dias. <b>A:</b> tratamento com a inoculação do fungo fitopatogênico + Bac 111 ( <i>Amycolatopsis</i> sp.); <b>B:</b> tratamento com a inoculação apenas do fungo fitopatogênico. ....	122 -

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Resultados dos testes <i>in vitro</i> para fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato inorgânico (SFI), produção de compostos indólicos (AIA) e identificação das rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) associadas à <i>Paspalum vaginatum</i> .....	43 -
<b>Tabela 2</b> Porcentagem de inibição de crescimento micelial de <i>Bipolaris</i> sp. e <i>Colletotrichum</i> sp. pelos isolados rizobacterianos.....	53 -
<b>Tabela 3</b> Médias da pesagem (em gramas) da biomassa seca de partes vegetais relativas aos tratamentos e ao controle utilizados <i>Paspalum vaginatum</i> . ....	58 -
<b>Tabela 4</b> Análise físico-química do solo utilizado no ensaio. ....	89 -
<b>Tabela 5</b> Descrição dos tratamentos utilizados no ensaio de estabelecimento inicial de <i>Paspalum regnellii</i> .....	90 -
<b>Tabela 6</b> Resultados da análise nutritiva e da pesagem seca por tratamento em <i>P. regnellii</i> .....	99 -
<b>Tabela 7</b> Resultados da quantificação de fósforo solúvel de cada isolado em relação as fontes de fósforo utilizadas.....	103 -
<b>Tabela 8</b> Proporções das emergências das sementes de <i>P. regnellii</i> em relação ao inóculo bacteriano, ao tipo de solo e aos tratamentos.....	105 -
<b>Tabela 9</b> Resultados dos descritores altura (AT), número de perfilhos (PF) e número de folhas expandidas (FTE) para os tratamentos em <i>P. regnellii</i> ao longo das semanas. Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer. ....	115 -
<b>Tabela 10</b> Resultados dos descritores área superficial foliar (AF), área superficial radicular (AR), peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco radicular (PSR) para os tratamentos em <i>Paspalum regnellii</i> nas quatro coletas realizadas. Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer. ....	118 -
<b>Tabela 11</b> Resultados do biocontrole de antracnose em <i>P. regnellii</i> pelo descritor grau de severidade da doença (GS), mostrando a variação de GS antes e após a inoculação do agente etiológico. ....	121 -

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	6 -
LISTA DE TABELAS .....	8 -
RESUMO GERAL .....	10 -
INTRODUÇÃO GERAL .....	14 -
REFERÊNCIAS .....	18 -
<b>CAPÍTULO 1 – ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE DA MICROBIOTA RIZOSFÉRICA ASSOCIADA A <i>Paspalum vaginatum</i> COM POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL</b> .....	<b>22 -</b>
RESUMO.....	22 -
ABSTRACT .....	23 -
1. INTRODUÇÃO.....	24 -
2. OBJETIVOS .....	30 -
2.1. Objetivo geral.....	30 -
2.2. Objetivos específicos .....	30 -
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31 -
3.1 Coleta do material vegetal .....	31 -
3.2 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados bacterianos rizosféricos.....	32 -
3.3 Ensaio de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> .....	33 -
3.4 Seleção de isolados rizosféricos para ensaios <i>in vivo</i> .....	37 -
3.5 Ensaio de promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i> em casa de vegetação.....	38 -
3.6 Identificação taxonômica dos isolados rizosféricos .....	39 -
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42 -
4.1 Ensaio de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> .....	42 -
4.2 Produção de compostos indólicos .....	46 -
4.3 Solubilização de fosfato .....	48 -
4.4 Antagonismo à fungos fitopatogênicos .....	50 -
4.5 Identificação dos isolados, seleção de rizobactérias para ensaios <i>in vivo</i> e biodiversidade de RPCV associada a <i>Paspalum vaginatum</i> .....	53 -
4.6 Ensaio de promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i> .....	57 -
5. CONCLUSÕES .....	61 -
6. REFERÊNCIAS .....	62 -
<b>CAPÍTULO 2 – EFEITO DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS A <i>Paspalum vaginatum</i> NO CRESCIMENTO INICIAL E ESTABELECIMENTO DE <i>Paspalum regnellii</i> SOB TRATAMENTO COM DIFERENTES FONTES DE FOSFATO</b> .....	<b>72 -</b>
RESUMO.....	72 -
ABSTRACT .....	74 -
1. INTRODUÇÃO .....	75 -
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	78 -
2.1 <i>Paspalum regnellii</i> Mez .....	78 -
2.2 Eficiência do uso de fertilizantes fosfatados e bactérias solubilizadoras de fosfato .....	78 -
2.3 Controle biológico de <i>Colletotrichum</i> sp.....	80 -
3. OBJETIVOS .....	82 -

3.1	Objetivo geral.....	- 82 -
3.2	Objetivos específicos .....	- 82 -
4.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	- 83 -
4.1	Promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i> em <i>Paspalum regnellii</i> .....	- 83 -
4.2	Biossolubilização de fosfato inorgânico.....	- 86 -
4.3	Ensaio de estabelecimento inicial de <i>Paspalum regnellii</i> .....	- 88 -
4.4	Biocontrole de <i>Colletotrichum</i> sp. em <i>Paspalum regnellii</i> .....	- 93 -
4.5	Análise estatística .....	- 98 -
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	- 99 -
5.1	Efeito de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em <i>Paspalum regnellii</i> .....	- 99 -
5.2	Fosfato Quantitativo .....	- 103 -
5.3	Ensaio de estabelecimento inicial em <i>Paspalum regnellii</i> .....	- 105 -
5.4	Controle biológico de <i>Colletotrichum</i> sp.....	- 120 -
6	CONCLUSÕES.....	- 124 -
7	REFERÊNCIAS.....	- 125 -

Lisboa, Paulo Henrique Gomes. **Avaliação e seleção de rizobactérias associadas a *Paspalum vaginatum* para desenvolvimento de novos bioinsumos.** 2024. Tese (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2024

## RESUMO GERAL

A Embrapa Pecuária Sudeste possui o segundo maior banco de germoplasma de *Paspalum* no mundo, incluindo *Paspalum vaginatum*, uma planta costeira resistente a solos salinos e alagados, usada para controle de erosões e gramados esportivos e o *Paspalum regnellii*, uma gramínea de alto valor nutritivo e com potencial de uso como forrageira. Pesquisas na indústria de gramados dos EUA têm recebido investimentos, mas seus impactos ambientais e produtivos ainda são incertos. No mercado brasileiro, *Paspalum* sp. está ganhando atenção, porém, ainda poucos produtores de grama deste gênero. Essas indústrias podem se beneficiar da aplicação do *P. vaginatum* já que este possui alta resistência a salinidade do solo e é uma grama densa e de coloração intensa, sendo ideal para paisagismos e campos esportivos em áreas litorâneas. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) podem aumentar a produtividade de forma sustentável, melhorando a disponibilidade de nutrientes e auxiliando no estabelecimento das plantas. A formulação de bioinsumos pode garantir a sustentabilidade dos sistemas de produção e a autonomia brasileira em relação a tecnologias agroecológicas. Este trabalho visou caracterizar e identificar 145 bactérias da rizosfera de *P. vaginatum*, avaliando seu potencial *in vitro* para fixação biológica de nitrogênio (FBN) (18% dos isolados foram positivos), solubilização de fosfato (SFI) (18.6% foram positivos), produção de compostos indólicos (AIA) (variando entre 0,09 a 57,38 ug.mL<sup>-1</sup>) e antagonismo aos fungos fitopatogênicos *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp., que são agentes etiológicos de doenças em espécies de *Paspalum*, como a mancha foliar e a antracnose, respectivamente. Oito isolados mostraram capacidade antagonista contra os dois fungos fitopatogênicos. Cinco isolados promissores nos ensaios *in vitro* de FBN e SFI e, também, produtores de compostos indólicos, foram selecionados para ensaio de promoção de crescimento vegetal em *P. vaginatum* em casa de vegetação, usando o inoculante BiomaPhos® como controle positivo. As rizobactérias identificadas pertencem a diversos gêneros, incluindo *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Amycolatopsis*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Dyella*, *Enterobacter*, *Kitasatospora*, *Paenibacillus*, *Priestia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces*. A inoculação dos cinco isolados selecionados em *P. vaginatum* resultou em médias de biomassa seca de raiz estatisticamente semelhantes ao inoculante comercial BiomaPhos e ao controle, sem efeitos deletérios. No Brasil, atualmente, estima-se que 32,5 mil hectares do território sejam destinados à produção de grama. Simultaneamente, a sustentabilidade das pastagens, essenciais para a pecuária brasileira, exige manejo adequado e fertilização com fósforo, geralmente usando superfosfatos caros ou fosfatos naturais de liberação gradual. Superfosfatos possuem alta eficiência agrônômica, mas levantam questionamentos futuros acerca de sua sustentabilidade. Assim, a exploração da utilização conjunta de fertilizantes fosfatos com bactérias solubilizadoras de fosfato é um caminho a ser considerado. Este estudo também investigou a utilização das bactérias isoladas da rizosfera associada ao *P. vaginatum* no desenvolvimento inicial e controle de antracnose em outra espécie do gênero, *Paspalum regnellii*, que possui alto potencial

forrageiro. Cinco isolados rizosféricos foram testados *in vivo* para promoção de crescimento através do aumento da biomassa seca em *P. regnellii*, usando BiomaPhos® como controle positivo, e submetidos à quantificação de P solúvel *in vitro*. As bactérias selecionadas com base na quantificação da solubilização de fósforo *in vitro* foram submetidas a um ensaio de estabelecimento inicial em *P. regnellii*, em casa de vegetação, em solo adubado com supertríplo fosfato, rocha Araxá e rocha Bayovar, além do controle (solo sem adubação). Foram selecionados oito isolados com atividade antagônica para testes de biocontrole de *Colletotrichum* sp., agente etiológico da doença antracnose, em *P. regnellii*, também em casa de vegetação. As rizobactérias associadas a *P. vaginatum* mostraram um efeito positivo na germinação e no estabelecimento de *P. regnellii* quando combinadas com solo corrigido com calcário e adubado com supertríplo fosfato e em solo calado não-adubado, destacando-se o isolado 5 (*Acinetobacter* sp.). O tratamento com o isolado 111 (*Amycolatopsis* sp.) reduziu significativamente a intensidade da antracnose causada por *Colletotrichum* sp. em *P. regnellii*.

**Palavras-chave:** *Paspalum*, RPCV, Biocontrole.

Lisboa, Paulo Henrique Gomes. **Evaluation and selection of rhizobacteria associated with *Paspalum vaginatum* for the development of new bioinputs.** 2024. Thesis (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2024.

## GENERAL ABSTRACT

Embrapa Southeast Livestock holds the second-largest germplasm bank of *Paspalum* in the world, including *Paspalum vaginatum*, a coastal plant resistant to saline and waterlogged soils, used for erosion control and sports lawns and *P. regnellii*, a highly nutritious grass with potential use as forage. Research in the US turfgrass industry has received investments, but its environmental and productive impacts are still uncertain. In the Brazilian market, *Paspalum* sp. has been attracting attention; however, there are still few grass producers of this genus. These industries benefit from applying *P. vaginatum* since it has high salt tolerance and is a dense grass with an intense color, making it ideal for landscaping and sports fields in coastal areas. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) can sustainably increase productivity by improving nutrient availability and aiding in plant establishment. The formulation of bioinputs can ensure the sustainability of production systems and Brazil's autonomy with agroecological technologies. This work aims to characterize and identify 145 rhizosphere bacteria from *P. vaginatum*, evaluating their *in vitro* potential for biological nitrogen fixation (BNF) (18 % of isolates), phosphate solubilization (PS) (18.6 %), indolic compounds production (0.09 to 57.38  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), and antagonism to phytopathogenic fungi *Bipolaris* sp. and *Colletotrichum* sp. which cause leaf spot and anthracnose diseases in *Paspalum* species, respectively. Eight isolates showed antagonistic capacity against both phytopathogenic fungi. Five promising isolates in the *in vitro* BNF and PSI assays, also indolic compounds producers, were selected for plant growth promotion in *P. vaginatum* in a greenhouse, using the bioinoculant BiomaPhos® as a positive control. The identified rhizobacteria belong to various genera, including *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Amycolatopsis*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Dyella*, *Enterobacter*, *Kitasatospora*, *Paenibacillus*, *Priestia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, among others. The inoculation of the five selected isolates in *P. vaginatum* resulted in average root dry biomass statistically similar to the commercial inoculant BiomaPhos and the control, with no harmful effects. In Brazil, it is currently estimated that 32.5 thousand hectares of the territory are dedicated to grass production. Simultaneously, the sustainability of pastures, essential for Brazilian livestock, requires proper management and phosphorus fertilization, usually using expensive superphosphates or gradually releasing natural phosphates. Superphosphates have high agronomic efficiency but raise future sustainability concerns. Therefore, exploring the combined use of phosphate fertilizers with phosphate-solubilizing bacteria is a path to consider. This study also investigated rhizobacteria associated with *P. vaginatum* associated with *P. vaginatum* in the initial development and control of anthracnose in another species of the genus, *P. regnellii*, which has high forage potential. Five rhizospheric isolates were tested *in vivo* for growth promotion by increasing dry biomass in *P. regnellii*, using BiomaPhos® as a positive control, and subjected to *in vitro* soluble P quantification. Bacteria selected based on *in vitro* phosphate solubilization quantification were subjected to an initial establishment assay in *P. regnellii* in a greenhouse, in soil fertilized with triple superphosphate, Araxá rock and Bayovar rock, as well as the control (unfertilized soil). Isolates with antagonistic activity

were selected for biocontrol tests against *Colletotrichum* sp., the etiological agent of anthracnose in *P. regnellii* and in a greenhouse. Rhizobacteria associated with *P. vaginatum* showed a positive effect on germination and establishment of *P. regnellii* when combined with soil corrected with lime and fertilized with triple superphosphate and in limed, unfertilized soil, highlighting isolate 5 (*Acinetobacter* sp.). Isolate 111 (*Amycolatopsis* sp.) significantly reduced the intensity of anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. in *P. regnellii*.

**Keywords:** *Paspalum*, PGPR, Biocontrol.

## INTRODUÇÃO GERAL

As gramíneas desempenham um papel fundamental em vários setores, incluindo agricultura, pecuária, paisagismo e conservação da biodiversidade. Graças à sua adaptabilidade, produtividade e valor nutricional, essas plantas são essenciais para o desenvolvimento econômico e a sustentabilidade ambiental (BATISTA; GODOY, 2000; PRIMAVESI et al., 2008; PEZZOPANE et al., 2017). Um dos gêneros mais significativos de gramíneas é o *Paspalum*, pertencente à família *Poaceae*. Este gênero, com cerca de 400 espécies distribuídas por todo o continente americano, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, tem uma importância econômica e ecológica considerável e, no Brasil, são conhecidas cerca de 211 espécies, destacando-se por sua adaptabilidade a diferentes tipos de solo e condições ambientais, desde solos salinos e secos até solos úmidos e ambientes aquáticos (CHASE, 1929; FLORA DO BRASIL, 2020).

A Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos, São Paulo, mantém um banco de germoplasma ativo de *Paspalum* (BAG *Paspalum*) com 538 acessos, sendo o segundo maior do mundo neste quesito, sendo superado apenas pelo banco de germoplasma do *United States Department of Agriculture – Agriculture Research Service* (USDA-ARS), que possui 1439 acessos (MATTA et al., 2023; USDA AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE, 2023). O BAG *Paspalum* é, também, o segundo do mundo em número de espécies de *Paspalum*, com 60, sendo superado apenas pelo banco de germoplasma do Instituto de Botânica do Nordeste da Universidade Nacional do Nordeste, na Argentina, que possui 72 espécies (ACUÑA et al., 2019). O BAG *Paspalum* da Embrapa tem como metas o enriquecimento, a caracterização, a conservação, a documentação e a agregação de valor econômico de acessos de diferentes espécies, buscando estudar e desenvolver linhagens com características interessantes a nichos específicos, como tolerância a estresses hídricos, sombreamento, dentre outros, para utilização, principalmente, como forrageiras e como cobertura de solo (BATISTA; GODOY, 2000; MEIRELLES et al., 2013; PEZZOPANE et al., 2017; SOUZA et al., 2020; BARROS et al., 2023). O gênero *Paspalum* tem, ainda, potencial para recuperação de áreas degradadas e na prospecção de microrganismos benéficos (AMARAL et al., 2020; DE PAULA et al., 2022; FERNANDES et al., 2023). Manter a diversidade genética desse

banco é crucial para desenvolver cultivares que valorizem a flora nativa e tenham apelo ambiental.

*Paspalum vaginatum*, uma das espécies conservadas no BAG *Paspalum*, é uma gramínea perene e rizomatosa, nativa de áreas costeiras da América do Sul e Central. Esta espécie é altamente tolerante a solos salinos e inundados, crescendo em ambientes como margens do mar e estuários, onde poucas plantas sobrevivem (DUNCAN & CARROW, 2005). Sua densidade e qualidade de gramado a tornam ideal para campos de golfe e paisagismo em áreas costeiras (DUNCAN, 1997). A indústria americana de gramados, estimada em 40 bilhões de dólares, beneficia-se da utilização de espécies como *Paspalum vaginatum* para reduzir os efeitos adversos da salinidade do solo (NATIONAL TURFGRASS FEDERATION, 2009).

*Paspalum regnellii* é outra espécie depositada no BAG da Embrapa com grande potencial como forrageira devido à sua alta produção de biomassa e elevado teor de proteínas, embora enfrente desafios durante a germinação e crescimento inicial (BATISTA & GODOY, 2004; MEIRELLES et al., 2013). A fertilidade do solo, particularmente em relação ao fósforo (P), é crucial para o desenvolvimento das plantas. Quanto mais rapidamente a pastagem for estabelecida, mais eficiente será o uso dos recursos disponíveis. Esse processo diminui a competição com plantas invasoras, aumenta a resistência a insetos-pragas e doenças (como a antracnose, causada pelo fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp.) e melhora a produtividade ao longo de todo o ciclo da planta (DIAS FILHO, 1987; PRIMAVESI et al., 2008). Superfosfatos, embora caros, são eficientes, mas a dependência de fosfatos naturais levanta preocupações sobre a sustentabilidade futura (RESENDE et al., 2006; MELAMED et al., 2009). Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) são microrganismos que desempenham um papel crucial na agricultura, oferecendo uma alternativa sustentável para aumentar a produtividade das plantas e reduzir a dependência de fertilizantes químicos e pesticidas. Essas bactérias promovem o crescimento vegetal por meio de mecanismos diretos, como a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fósforo e a produção de fitormônios (LACAVA, BOGAS, CRUZ, 2022). Além disso, atuam indiretamente na proteção das plantas contra patógenos, através da produção de compostos que inibem organismos causadores de doenças e induzem resistência sistêmica nas plantas (GLICK, 2012; LACAVA & AZEVEDO,

2013). Esses mecanismos não apenas melhoram o crescimento das plantas, mas também ajudam na tolerância a condições adversas, contribuindo para a sustentabilidade agrícola. A exploração de práticas alternativas, como o uso de bactérias solubilizadoras de fosfato em conjunto com rochas fosfáticas insolúveis ou de solubilidade reduzida, é fundamental para tornar a adubação fosfatada mais barata ao produtor e mais sustentável a longo prazo (OWEN et al., 2015; DE PAULA et al., 2022; LACAVA, BOGAS, CRUZ, 2022; LI et al., 2023; DUCOUSSO-DÉTREZ et al., 2024; PANG et al., 2024).

Os bioinsumos estão ganhando destaque no Brasil, tornando-se uma tendência crescente no mercado nacional. De acordo com o Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020 (BRASIL, 2020), a definição do termo “bioinsumo” é a seguinte:

“... considera-se como bioinsumo o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos.”

Dentro da agroecologia e da produção orgânica, os bioinsumos são vistos como uma série de iniciativas estratégicas para criar alternativas produtivas que incentivam práticas sustentáveis, utilizando tecnologias, produtos e processos que se baseiam em recursos renováveis. Esses insumos destacam a biodiversidade do Brasil, promovendo o uso e a conservação dos recursos genéticos de microrganismos, plantas e animais em contextos locais e regionais (VIDAL & DIAS, 2023).

Um produto microbiano deve ser composto por um ou mais isolados selecionados em pesquisa laboratorial e que tenha sido estudado quanto a sua eficácia em campo e industrial, além de atender a parâmetros como: identidade do microrganismo; concentração de unidades infectivas e/ou vigorosas por kg ou L da formulação, virulência, natureza e teor de contaminantes, vida de prateleira, características físico-químicas associadas ao produto, dentre outros (JENKINS & GRZYWACZ, 2000; RAVENSBERG, 2011; FARIA et al., 2022, IWANICKI et al., 2022).

A pesquisa de bioinsumos com base nos princípios agroecológicos em conjunto com políticas públicas que estimulam o desenvolvimento desta área do conhecimento garante a sustentabilidade e promove as inovações nacionais que, quando valorizadas, levam ao incremento da produção própria e do potencial de desenvolvimento tecnológico, impulsionando uma mudança significativa no cenário dos sistemas produtivos (VIDAL & DIAS, 2023).

Portanto, a pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo do gênero *Paspalum* são essenciais para superar desafios limitantes. O uso de RPCV como potencial inoculantes de base microbiana pode melhorar o estabelecimento inicial das plantas e aumentar a produtividade dos cultivos, oferecendo uma alternativa sustentável para o manejo agrícola (DE PAULA et al., 2022; LI et al., 2023; WANG et al., 2024).

## REFERÊNCIAS

- ACUÑA, C. A. et al. (2019) Reproductive systems in *Paspalum*: Relevance for germplasm collection and conservation, breeding techniques and adoption of released cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 1377. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01377>
- AMARAL, M. B., RIBEIRO, T. G., ALVES, G. C., COELHO, M. R. R., MATTA, F. D. P., BALDANI, J. I., & BALDANI, V. L. D. (2021) The occurrence of rhizobacteria from *Paspalum* genotypes and their effects on plant growth. *Scientia Agricola*, 79. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2020-0240>
- AZEVEDO, J. L. DE et al. (2018) *Biotecnologia microbiana ambiental*. Maringá: Eduem, 331 p. ISBN 978-85-7628-734-6.
- BARROS, J. D. S. et al. (2022) Correlation of shear strength and physicochemical properties as a criterion for the selection of accessions of *Paspalum* grasses. *Acta Scientiarum Agronomy*, 45, e56280. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v45i1.56280>
- BATISTA, B. D., QUECINE-VERDI, M. C., LACAIVA, P. T. (2018) Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por endófitos e rizobactérias. In: João Lúcio Azevedo, João Alencar Pamphile, Maria Carolina Quecine-Verdi, Paulo Teixeira Lacava. (Org.) *Biotecnologia Microbiana Ambiental*. 1ed. Maringá: Eduem, 2018, 1, 105-124. ISBN: 9788576287346
- BATISTA, L. A. R., & GODOY, R. (2000) Caracterização preliminar e seleção de germoplasma do gênero *Paspalum* para produção de forragem. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29(1), 23-32. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000100004>
- BATISTA, L. A. R. & GODOY, R. (2004) Efeito do manejo intensivo na produção de biomassa de *Paspalum regnellii* Mez em três idades de corte. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41ª, Campo Grande, MS. Anais... Campo Grande, MS, 1-4.
- BRASIL (2020) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. *Diário Oficial da União*. 27 de maio de 2020, 105-106.
- CAVALLARI, M. M. (2020) Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum*: Embrapa Pecuária Sudeste. In: PADUA, J. G., ALBUQUERQUE, M. do S. M., MELLO, S. C. M. de (Ed.). Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa: conservação e uso. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. ISSN: 0102-0110.
- CHASE, A. (1929) The North American species of *Paspalum*. In: *Systematic plant studies. Contributions from the United States National Herbarium*. Washington, DC: Government Printing Office, 1-310.
- DE PAULA, A. F. et al. (2022) Endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and its potential for plant growth promotion with different phosphate sources. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.884716>
- DIAS FILHO, M.B. (1987) Espécies forrageiras e estabelecimento de pastagens na Amazônia. Embrapa CPATU, Documentos, 46. ISSN: 0101-2835.
- DUCOUSSO-DÉTREZ, A., LAHRACH, Z., FONTAINE, J., LOUNÈS-HADJ SAHRAOUI, A., HIJRI, M. (2024) Cultural techniques capture diverse phosphate-solubilizing bacteria in rock phosphate-enriched habitats. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1280848. doi: 10.3389/fmicb.2024.1280848.

DUNCAN, R. R. (1997) Environmental compatibility of seashore *Paspalum* (saltwater couch) for golf courses and other recreational uses. II. Management protocols. International Turfgrass Society Research Journal, 8, 1216-1229.

DUNCAN, R. R., & CARROW, R. N. (2005) Managing seashore *Paspalum* greens. Golf Course Management, 73(2), 114-118.

FARIA, M.; MASCARIN, G. M.; SOUZA, D. A.; LOPES, R. B. (2022) Controle de qualidade de produtos comerciais à base de fungos para o manejo de invertebrados (insetos, ácaros, nematoides). Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Documentos, 377. 48 p. ISSN 0102-0110.

FERNANDES, A. C. V., LISBOA, P. H. G., ANDRADE, P. D., VIGNA, B. B. Z., NOGUEIRA, S. R., FÁVERO, A. P., & LACAVAL, P. T. (2023) Bactérias endofíticas associadas a *Paspalum vaginatum* Swartz com potencial para promoção de crescimento vegetal e biocontrole. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research, 6(2), 1071-1089. doi: 10.34188/bjaerv6n2-010.

FLORA DO BRASIL. (2020) *Paspalum* in Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available at: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13432>. Acessado em: 20 Mai. 2024.

GLICK, B. R. (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

IWANICKI, N. S.; JÚNIOR, I. D.; FARIA, M. R. DE; LOPES, R. B.; SANCHES, M. M.; SOUZA, M. L. DE; SEIXAS, C. D. S.; SOSA-GÓMEZ, D. R. (2022) Controle de qualidade de produtos microbiológicos. In: Bioinsumos na cultura da soja. MEYER, M. C. et al. Brasília, DF: Embrapa, 2022. 550 p. ISBN: 978-65-87380-96-4

JENKINS, N. E.; GRZYWACZ, D. (2000) Quality control of fungal and viral biocontrol agents: assurance of product performance. Biocontrol Science and Technology, 10, 753-777. <https://doi.org/10.1080/09583150020011717>

KUMAWAT, K. C., NAGPAL, S., & SHARMA, P. (2022) Potential of plant growth-promoting rhizobacteria-plant interactions in mitigating salt stress for sustainable agriculture: A review. Pedosphere, 32(2), 223-245. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60070-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60070-X)

LACAVAL, P. T., AZEVEDO, J. L. (2013) Endophytic bacteria: A biotechnological potential in agrobiological system. In: Bacteria in agrobiological: crop productivity. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-44. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_1)

LACAVAL, P.T., BOGAS, A.C, CRUZ, F.P.N. (2022) Plant growth promotion and biocontrol by endophytic and rhizospheric microorganisms from the tropics: a review and perspectives. Frontiers In Sustainable Food Systems, 6, 796113. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.796113>

LI, H.P., HAN, Q.Q., LIU, Q.M., GAN, Y.N., RENSING, C., RIVERA, W. L., ZHAO, Q., ZHANG, J. L. (2023) Roles of phosphate-solubilizing bacteria in mediating soil legacy phosphorus availability, Microbiological Research, 272, 127375. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127375>.

MATTA, F. D. P., FÁVERO, A. P., VIGNA, B. B. Z., POZZOBON, M. T., DE MEDEIROS, S. R., JÚNIOR, W. B., & CAVALLARI, M. M. (2023) Agronomic, nutritive value, reproductive, cytogenetic and molecular aspects of *Paspalum* accessions: Contribution to the development of new forage cultivars. Grass and Forage Science, 78(1), 101-118. <https://doi.org/10.1111/gfs.12600>

MEIRELLES, P. D. L., BATISTA, L. A. R., COSTA, C., DA SILVA, M. G. B., FACTORI, M. A., DA SILVEIRA, J. P. F., CAVASANO, F. A. (2013) Germplasm of *Paspalum* genus with production potential for foraging. *Bioscience Journal*, 29 (Supplement 1), 1587-1595. ISSN: 1981-3163.

MELAMED, R., GASPAR, J.C., MIEKELEY, N. (2009) Pó-de-rocha como fertilizante alternativo para sistemas de produção sustentáveis em solos tropicais. In: LAPIDO-LOUREIRO, F.E., MELAMED, R., FIGUEIREDO NETO, J. (Eds.) Fertilizantes agroindústria e sustentabilidade. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 385–395.

NATIONAL TURFGRASS FEDERATION. (2009) The national turfgrass research initiative. National Turfgrass Federation, Beltsville, MD. <http://turfresearch.org/pdf/turfinitiative.pdf>. Acessado em 21 de maio de 2024.

OWEN, D., WILLIAMS, A., GRIFFITH, G., WITHERS, P. (2015) Use of commercial bioinoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41-54. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>.

PANG, F., LI, Q., SOLANKI, M.K., WANG, Z., XING., Y.X., DONG, D.F. (2024) Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1383813. doi: 10.3389/fmicb.2024.1383813.

PEZZOPANE, C. D. G., LIMA, A. G., DA CRUZ, P. G., BELONI, T., FÁVERO, A. P., & SANTOS, P. M. (2017) Evaluation and strategies of tolerance to water stress in *Paspalum* germplasm. *Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales*, 5(3), 153-162. [https://doi.org/10.17138/tgft\(5\)153-162](https://doi.org/10.17138/tgft(5)153-162)

PRIMAVESI, O., PRIMAVESI, A.C., BATISTA, L.A.R., GODOY, R. (2008) Adubação e produção de *Paspalum* em dois níveis de fertilidade de Latossolo Vermelho-Amarelo: estabelecimento e manutenção. *Ciência e agrotecnologia*, 32, 242-250. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000100035>

RAVENSBERG, W. J. (2011) A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of Arthropods. Dordrecht: Springer, 386 p. ISBN 978-94-007-0438-7. Doi: 10.1007/978-94-007-0437-4

RESENDE, A.V., FURTINI NETO, A.E., ALVES, V.M.C., MUNIZ, J.A., CURI, N., LAGO, F.J. (2006) Resposta do milho a fontes e modos de aplicação de fósforo durante três cultivos sucessivos em solo da região do cerrado. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(3): 458–466. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000300011>

SHAH, A. et al. (2021) PGPR in agriculture: A sustainable approach to increasing climate change resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 667546. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667546>

SOUZA, F. H. D. D., GUSMÃO, M. R., CAVALLARI, M. M., & BARIONI Jr, W. (2020) Characterization of the potential of native grasses for use as lawns. *Ornamental Horticulture*, 26, 109-120. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i1.2067>

USDA AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. (2003) Germplasm Resources Information Network (GRIN). USDA Agricultural Research Service. Collection. <https://doi.org/10.15482/USDA.ADC/1212393>.

VIDAL, M. C.; DIAS, R. P. (2023) Bioinsumos a partir das contribuições da Agroecologia. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 18(1), 171-192. <https://doi.org/10.33240/rba.v18i1.23735>

WANG C., PAN G., LU X. & QI W. (2023) Phosphorus solubilizing microorganisms: potential promoters of agricultural and environmental engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1181078. doi: 10.3389/fbioe.2023.1181078

## **CAPÍTULO 1 – ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE DA MICROBIOTA RIZOSFÉRICA ASSOCIADA A *Paspalum vaginatum* COM POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

### **RESUMO**

A Embrapa Pecuária Sudeste abriga o segundo maior banco de germoplasma de *Paspalum* no mundo, incluindo a espécie *Paspalum vaginatum*, uma planta costeira resistente a solos salinos e alagados, usada para controlar erosões e como gramado em campos de golfe e outros esportes. Além disso, esta espécie produz uma grama com alta densidade e verdejante, o que a torna aplicável, também, para fins de paisagismo. A pesquisa sobre agroquímicos na indústria de gramados nos EUA tem recebido investimentos crescentes, sendo esta indústria estimada em 40 bilhões de dólares, mas os impactos ambientais desse segmento demandam grande atenção. Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) podem beneficiar a produtividade de cultivos de forma sustentável, tanto por mecanismos diretos, aumentando a disponibilidade de nutrientes ou produzindo fitormônios, quanto indiretos, atuando na proteção da planta contra agentes fitopatogênicos, assim, auxiliando a cultura vegetal em seu estabelecimento no campo. Neste trabalho, objetivamos a caracterização e identificação de 145 bactérias associadas à rizosfera de *P. vaginatum* avaliando, *in vitro*, seu potencial para fixação biológica de nitrogênio (FBN) em meio de cultura NFb, dos quais 18 % mostraram potencial de FBN; solubilização de fosfato (SF) em meio adicionado de fosfato bibásico de cálcio insolúvel, onde 18,6 % apresentaram essa capacidade; produção de compostos indólicos em caldo Triptona de Soja (TSB) 10 % + L-triptofano, onde houve produção de fitormônios variando de 0,09 a 57,38  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; e antagonismo ao fungos fitopatogênicos *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp., que são agentes etiológicos de doenças em espécies de *Paspalum*, como a mancha foliar e a antracnose, respectivamente. Oito isolados mostraram capacidade antagonista contra os dois fungos fitopatogênicos. Cinco isolados promissores nos ensaios *in vitro* de FBN e SFI e, também, produtores de compostos indólicos, foram selecionados para ensaio de promoção de crescimento vegetal em *P. vaginatum* em casa de vegetação, usando o inoculante BiomaPhos® como controle positivo. As rizobactérias identificadas pertencem a diversos gêneros, incluindo *Actinomycetia*, *Agrobacterium*, *Amycolatopsis*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Dyella*, *Enterobacter*, *Kitasatospora*, *Paenibacillus*, *Priestia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Streptomyces*, entre outros. A inoculação dos cinco isolados selecionados em *P. vaginatum* resultou em médias de biomassa seca de raiz estatisticamente não diferentes do inoculante comercial BiomaPhos® e do controle, sem efeitos deletérios. Estudos com essas bactérias devem ser realizados em outras condições de nutrição e em diferentes espécies vegetais para melhor compreensão de seu potencial como RPCV.

**Palavras-chave:** RPCV, Paspalum, Biocontrole

## ABSTRACT

Embrapa Southeast Livestock houses the second largest germplasm bank of *Paspalum* in the world, including the species *Paspalum vaginatum*, a coastal plant resistant to saline and waterlogged soils, used for erosion control and as turf on golf courses and other sports fields. Moreover, this species produces dense, lush grass, making it suitable for landscaping. Research on agrochemicals in the turfgrass industry in the USA has been receiving increasing investments, with this industry estimated at \$40 billion. However, the environmental impact effects remain uncertain. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) can enhance crop productivity sustainably, both through direct mechanisms, such as increasing nutrient availability or producing phytohormones, and indirect mechanisms, such as protecting the plant against phytopathogens, thereby aiding the establishment of the crop in the field. This study aimed to characterize and identify 145 bacteria associated with the rhizosphere of *P. vaginatum*, evaluating their *in vitro* potential for biological nitrogen fixation (BNF) in NFB culture medium, with 18% showing BNF potential; phosphate solubilization (PS) in medium supplemented with insoluble dibasic calcium phosphate, with 18.6% showing this capacity; indolic compounds production in 10% Tryptone Soy Broth (TSB) + L-tryptophan, with phytohormone production ranging from 0.09 to 57.38  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; and antagonism to the phytopathogenic fungi *Bipolaris* sp. and *Colletotrichum* sp., which are etiological agents of diseases in *Paspalum* species, such as leaf spot and anthracnose, respectively. Eight isolates showed antagonistic capacity against both phytopathogenic fungi. Five promising isolates in the *in vitro* BNF and PS assays, also indolic compounds producers, were selected for plant growth promotion trials by increasing the dry biomass of *P. vaginatum* in a greenhouse, using the bioinoculant BiomaPhos® as a positive control. The identified rhizobacteria belong to various genera, including *Actinomycetia*, *Agrobacterium*, *Amycolatopsis*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Dyella*, *Enterobacter*, *Kitasatospora*, *Paenibacillus*, *Priestia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* and *Streptomyces*, among others. The inoculation of the five selected isolates in *P. vaginatum* resulted in average root dry biomass equal to the commercial bioinoculant BiomaPhos® and the control without causing harmful effects. Studies with these bacteria can be conducted under different nutritional conditions and in other plant species to better understand their potential as PGPR.

**Keywords:** PGPR, Paspalum, Biocontrol

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das principais características do gênero é a alta adaptabilidade a diferentes tipos de solo, condições climáticas e ambientes. Algumas espécies são capazes de tolerar solos salinos e condições de seca, enquanto outras são mais adaptadas a solos úmidos e ambientes aquáticos. Isso faz com que essas plantas sejam utilizadas em diferentes contextos, como na produção de forragem para animais, na recuperação de áreas degradadas, na ornamentação de jardins e parques e na proteção de margens de rios e lagos (BATISTA et al., 1999; BATISTA & GODOY; 2000).

Estudos conduzidos com espécies de *Paspalum* conservadas no banco de germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*) mantido pela Embrapa Pecuária Sudeste já mostraram o potencial de suas utilizações como forragem e gramados (PEZZOPANE et al., 2017; SOUZA et al., 2020), além de outras aplicações. A manutenção da diversidade genética do BAG *Paspalum* é essencial para o desenvolvimento de cultivares que valorizem a flora nativa do país e tenham um apelo ambiental.

*Paspalum vaginatum* é uma das espécies conservadas no BAG *Paspalum* da Embrapa e é uma planta gramínea litorânea perene, rizomatosa, estolonífera e heliófita, nativa de áreas costeiras da América do Sul e Central e distribuída pelo mundo todo (CHASE, 1929). É altamente tolerante a solos hipersalinos e inundados, sendo capaz de crescer em ambientes como nas margens do mar, lagos e estuários, onde outras plantas não conseguem sobreviver (DUNCAN & CARROW, 2005).

Essa espécie possui um sistema de raízes profundo e fibroso, o que ajuda a prevenir a erosão do solo em áreas costeiras. Essa característica é fundamental para a proteção das margens e a estabilização de dunas de areia, ajudando a manter a integridade do ecossistema costeiro (DUNCAN & CASLER, 2003; BEGAM et al., 2017). Além disso, tem potencial de utilização como cobertura de solo em áreas de solo estéril afetadas por sal (LOCH et al., 2003). Portanto, sua preservação é fundamental para a proteção das comunidades locais, uma vez que auxilia na manutenção da integridade desses ecossistemas.

Outra característica importante de *P. vaginatum* é a produção de uma grama densa e verdejante de qualidade, considerada muito atraente para campos de golfe, atletismo e paisagismo, principalmente nos Estados Unidos da América. Em conjunto

com sua alta tolerância a salinidade e solos pobres em nutrientes e resistência a pragas e doenças (DUNCAN & CARROW, 2000) isso faz com ele seja uma escolha ideal para áreas costeiras públicas e privadas e para campos de golfe situados perto do oceano, onde a salinidade do solo e da água pode ser um problema para outras espécies de grama (DUNCAN, 1997). Inclusive, a grama utilizada na Copa do Mundo de Futebol Masculino FIFA™ no Catar é a variedade “Platinum” Da espécie *P. vaginatum*, escolhida por ser irrigável com água do mar tratada (ABGL, 2023).

A indústria americana de grama é estimada em 40 bilhões de dólares e abrange gramados domésticos, propriedades comerciais, parques, campos esportivos e laterais de estradas (NATIONAL TURFGRASS FEDERATION, 2009). Os custos associados à pesquisa, desenvolvimento e registro de novos produtos químicos utilizados na agricultura, incluindo os gramados, tiveram um aumento significativo, passando de uma média de US\$ 152 milhões em 1995 para US\$ 256 milhões no período de 2005 a 2008 (MCDOUGALL, 2010; BREUNINGER et al., 2013). O problema é que esses ingredientes ativos podem ter um efeito deletério quando disseminados no solo. Várias limitações agrícolas diminuem a produtividade como, por exemplo, a indisponibilidade de nutrientes devido à lixiviação/escoamento e acúmulo/efeitos adversos de pesticidas e fertilizantes (CHAUHAN, 2020). Muitos desses efeitos adversos da maioria dos componentes químicos utilizados nesses produtos são ainda desconhecidos quanto à sua intensidade, durabilidade e escala de impactos (RANI et al., 2021).

Em relação ao mercado brasileiro, há uma grande expansão nos últimos anos devido, principalmente, a maior demanda nos setores de engenharia (63% do mercado), paisagismo (31%) e campos esportivos (6%). No Brasil, atualmente, cerca de 32,5 mil hectares estão comprometidos com a produção de gramas e o gênero *Paspalum* representa apenas 0,19% desse total, pois ainda há poucos produtores desse tipo de grama (ABGL, 2023).

A utilização de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal na agricultura pode ser uma alternativa sustentável e eficiente para aumentar a produtividade dos cultivos e reduzir o uso de fertilizantes químicos e pesticidas (AZEVEDO et al., 2018; BATISTA et al., 2018a; SHAH et al., 2021; LACAVA et al., 2022). As rizobactérias são um grupo de bactérias que vivem livremente na rizosfera, a camada de solo ao redor das

raízes das plantas (ROSENBLUETH & MARTÍNEZ-ROMERO, 2006). Essas bactérias têm a capacidade de melhorar o crescimento das plantas e aumentar a produtividade dos cultivos, através de diversos mecanismos, tanto diretos como indiretos, sendo assim, denominadas de rizobactérias promotoras do crescimento vegetal (RPCV) (GLICK, 2012; SANTOYO et al., 2012; CHANDRAN et al., 2021; SUN et al., 2024). A promoção de crescimento direta é possibilitada pelas RPCV por meio da facilitação da aquisição de nutrientes essenciais e modulação dos níveis hormonais nas plantas. A fixação biológica de nitrogênio, que ocorre quando a bactéria transforma o nitrogênio atmosférico em alguma forma que as plantas podem utilizar, ajudando a aumentar a disponibilidade de nitrogênio no solo e a solubilização de fósforo, que acontece quando há a produção de enzimas que quebram compostos orgânicos e inorgânicos complexos em íons mais simples e solúveis, que as plantas podem absorver mais facilmente, são exemplos de como as RPCV facilitam a aquisição de nutrientes (LACAIVA & AZEVEDO, 2013; SUN et al., 2024). Além disso, rizobactérias podem secretar hormônios vegetais, como o ácido 3-indolacético, que pode estimular a divisão celular, desenvolvimento celular e diferenciação, especialmente nas raízes das plantas (PERROT-RECHENMANN, 2010; ETESAMI et al., 2015; BATISTA et al., 2018b). Por outro lado, a promoção de crescimento vegetal indireta é alcançada por meio da produção de compostos secundários pelas RPCV, atuando como agentes de biocontrole, protegendo as plantas contra patógenos. Elas podem secretar metabólitos secundários e até nanopartículas, que inibem, por exemplo, o crescimento de fungos causadores de doenças, diminuindo a incidência de infecções nas plantas e perda de produtividade (BATISTA et al., 2018; LACAIVA et al., 2018; DE MORAES et al., 2023).

Doenças fúngicas representam importantes desafios para a produção agrícola, sendo crucial o controle desses patógenos para garantir o desenvolvimento e a viabilidade econômica do setor. No contexto brasileiro, onde o país se destaca como o principal produtor, consumidor e exportador de forrageiras tropicais, movimentando anualmente cerca de 1,4 bilhão de reais nesse segmento (OMOTE et al., 2021), os fungos fitopatogênicos assumem um papel de grande relevância econômica.

O fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp., agente etiológico da antracnose, é responsável por infectar em cereais e gramíneas em todo o mundo, inclusive em

espécies de *Paspalum* sp. Esta doença pode resultar em necroses em diversas partes da estrutura vegetal, reduzindo a área disponível para fotossíntese e, conseqüentemente, comprometendo a sobrevivência da planta (JEGER & PLUMBLEY, 1990; CROUCH et al., 2009). Outro fungo fitopatogênico relevante é o *Bipolaris* sp., descrito como agente etiológico de doenças em culturas da família Poaceae, causando manchas foliares e podridões nas raízes em capim-elefante, capim-mombaça, capim-tanzânia, milheto, milho, *Brachiaria* sp., *Paspalum* sp. e *Pennisetum* sp., resultando em perdas significativas (ANJOS et al., 2004a; CHARCHAR et al., 2004; 2008; MARCOS et al., 2015; AL-SADI, 2021; DE MATOS FILHO et al., 2024). Anjos e colaboradores (2004b) relataram a incidência natural de manchas foliares em indivíduos de *Paspalum atratum* cv. Pojuca em campo experimental, sendo o agente etiológico identificado como *Bipolaris maydis*. Além disso, a presença deste fungo já foi relatada em sementes de *Paspalum guenoarum* (GASPARETTO et al., 2021).

Diversas práticas agrícolas, incluindo o uso de defensivos agrícolas e fertilizantes químicos, têm sido empregadas globalmente para aumentar o crescimento e a produtividade das plantas (BHATT et al., 2022). Porém, o uso indiscriminado desses produtos químicos tem impactos negativos no ecossistema e na saúde, incluindo mudanças na composição do solo, contaminação da água e do ar e potencial interferência nos organismos vivos terrestres e aquáticos. A contaminação de animais e plantas consumidos pelos humanos também pode prejudicar a saúde, causando alterações celulares que podem levar a tumores e danos nos tecidos hematopoiéticos e hepáticos, por exemplo (FREIRE et al., 2015; WILHELM et al., 2015; BOCCOLINI et al., 2017). Além disso, podem levar ao surgimento de cepas resistentes de fitopatógenos (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). O desenvolvimento sustentável na agricultura motiva a busca por alternativas às abordagens químicas convencionais, como o biocontrole (CHAUDHARY et al., 2022).

As actinobactérias são bactérias filamentosas Gram-positivas com alto conteúdo de G + C em seu genoma, representam uma parcela significativa da população microbiana do solo, encontradas tanto em superfícies quanto profundidades superiores a 2 m. Muitas são organismos saprófitos, especialmente o gênero *Streptomyces*, um dos mais importantes), vivendo no solo e passando a maior parte do ciclo de vida como

esporos semidormentes, especialmente em condições de escassez de nutrientes (BARKA et al., 2016). O uso de antagonistas bacterianos tem se mostrado eficaz contra diversos fitopatógenos, oferecendo uma abordagem segura e econômica (O'BRIEN, 2017). Reconhecidas pela produção de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas e de biocontrole e por várias outras características benéficas, acredita-se que as actinobactérias sejam únicas entre os microrganismos da rizosfera em termos de promoção do crescimento das plantas e gestão de doenças (KAARI et al., 2023).

A riqueza de formas de vida presente nos diversos níveis inter e intraespécies é o que define a biodiversidade na ecologia. No micro-habitat da rizosfera, as plantas interagem continuamente com uma infinidade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos e vírus (HARDOIM et al., 2015). As interações entre microrganismos benéficos e patogênicos são de grande importância na sanidade e no crescimento das plantas, desempenhando um papel crucial na agricultura e na saúde humana a longo prazo, oferecendo oportunidades significativas de lucro na formulação de produtos com fins de biocontrole (KUMAR et al., 2020; SUYAL et al., 2021). Nos ecossistemas de solo rizosférico, a diversidade microbiana ultrapassa a das espécies eucarióticas. Este ambiente contém uma vasta gama de microrganismos, com mais de 10 bilhões de indivíduos, representando milhares de espécies distintas (PRAEG et al., 2019). Além disso, a diversidade microbiana está intimamente ligada a diversas plantas. Nas comunidades bacterianas, as Proteobactérias dominam como o filo mais proeminente, seguidas pelos Firmicutes e, em terceiro lugar, pelas Actinobactérias (KAARI et al., 2023). Como as RPCV vivem em comunidades na superfície da raiz ou às vezes dentro da raiz (passando a serem classificadas como endofíticas) e são recrutadas pelas plantas hospedeiras, considera-se que cada espécie bacteriana pode oferecer benefícios específicos para as plantas (RASOOL et al., 2021). Portanto, há uma necessidade crítica de compreender melhor tais interações em termos de grupamentos multiespécies de RPCV para maximizar os benefícios desejados para as plantas, particularmente sob as condições de desafios de patógenos (WANG et al., 2021).

Assim, a pesquisa e o desenvolvimento de novas tecnologias de cultivo do gênero *Paspalum* são fundamentais para a superação de desafios que limitam suas aplicações. Nesse contexto, o uso das RPCV como inoculantes pode ajudar na melhoria do

estabelecimento inicial das plantas, além de aumentar a produtividade dos cultivos, sendo uma alternativa sustentável de manejo agrícola.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Isolar e caracterizar bactérias rizosféricas cultiváveis associadas ao *Paspalum vaginatum* (BGP 114) quanto à capacidade de promoção de crescimento vegetal direto e indireto, estudando sua diversidade de gêneros.

### 2.2. Objetivos específicos

- Isolar a comunidade bacteriana rizosférica cultivável associada ao acesso de *Paspalum vaginatum* (BGP 114) oriundo do BAG *Paspalum* da EMBRAPA;
- Isolar a comunidade de actinobactérias rizosféricas cultiváveis associadas ao acesso de *Paspalum vaginatum* (BGP 114) oriundo do BAG *Paspalum* da EMBRAPA, para a seleção de isolados promissores para ensaios de biocontrole dos fungos fitopatogênicos *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp.;
- Criar um banco de culturas bacterianas isolados de *P. vaginatum* oriundo deste BAG;
- Avaliar as bactérias rizosféricas de *P. vaginatum* com potencial para promoção de crescimento vegetal direto por meio de ensaios *in vitro* para avaliação da fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção de ácido 3-indolacético;
- Submeter as bactérias rizosféricas de *P. vaginatum* a ensaios *in vitro* de antagonismo aos fungos fitopatogênicos *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp.;
- Selecionar os isolados rizosféricos que apresentaram maior potencial nos ensaios de promoção de crescimento vegetal tanto por mecanismos diretos quanto indiretos, *in vitro*, para os experimentos *in vivo* como inoculantes em *P. vaginatum*;
- Identificar por meio do sequenciamento parcial do gene 16S do DNA ribossomal dos isolados bacterianos que possuam potencial para a promoção de crescimento vegetal e estudar a diversidade dos gêneros;

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta do material vegetal

Foi utilizado o acesso de *P. vaginatum* BGP 114 (figura 1), coletado em Laguna, SC (Nº de coleta VDBdSv10117), como material de estudo. A coleta das amostras de solo rizosférico foi realizada de forma aleatória no dia 8 de dezembro de 2021, pela manhã, de 10 indivíduos do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*), situado na Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos, São Paulo, Brasil (21°57' S, 47°56' W, altitude de 856 m) (figura 2). O BAG *Paspalum* é mantido em solo tipo Latossolo Vermelho-Amarelo e adubado anualmente com N, P, K e S.



**Figura 1.** A: acesso 114 do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Pecuária Sudeste. B: vista em detalhe do acesso de *Paspalum vaginatum*.



**Figura 2.** Acessos de *Paspalum* sp. do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*) da Embrapa Pecuária Sudeste

Sacos plásticos foram utilizados para armazenar as amostras e transportá-las imediatamente até o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas - LaMiB, localizado no Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Paulo.

### **3.2 Isolamento, purificação e armazenamento dos isolados bacterianos rizosféricos**

Para isolar as rizobactérias, as dez amostras coletadas de diferentes indivíduos foram homogeneizadas e, em seguida, pesou-se 10g de cada amostra. Estes foram adicionados em *erlenmeyers* previamente autoclavados, contendo 90 mL de solução tampão PBS esterilizada (NaCl 8,0g; KCl 0,2g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2g; 1000 mL<sup>-1</sup> de água destilada; pH 7,4), que foram agitados durante 60 minutos a 150 rpm. Diluições seriadas, de fator 10, das suspensões de solo obtidas foram feitas em tampão PBS. Alíquotas de 0,1mL das diluições seriadas foram adicionadas em placas de Petri contendo o meio de cultura Triptona Soja Ágar (TSA) (Kasvi) ou *International Streptomyces Project 2* (ISP2). O meio de cultura ISP2 foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de *Streptomyces* sp. mas, com o tempo, se tornou um meio muito utilizado para o isolamento em geral de actinobactérias do solo e de raízes, visando seu estudo e

utilização no biocontrole de fungos fitopatogênicos (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966; HAZARIKA & THAKUR, 2020). Ambos os meios de cultura foram suplementados com benlate ( $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para evitar contaminação fúngica e as placas foram incubadas invertidas à temperatura de  $28^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. As colônias obtidas foram selecionadas de forma a favorecer a diversidade morfológica. A purificação das colônias foi realizada por estrias de esgotamento em placas de Petri contendo os mesmos meios de cultura (TSA e ISP2), então incubadas invertidas por mais 48 horas.

Depois de confirmada a pureza das culturas, as linhagens bacterianas foram inoculadas em *Tryptic Soy Broth* (TSB) e incubadas a  $28^{\circ}\text{C}$  por 120 horas. As bactérias foram estocadas em triplicata em microtubos de 2 mL preenchidos com  $500\mu\text{l}$  da suspensão bacteriana suplementada com  $500\mu\text{l}$  de glicerol 50%, e armazenadas em dois freezers a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para facilitar a apresentação dos dados, as linhagens obtidas receberam códigos numéricos de 1 a 145.

### **3.3 Ensaios de promoção de crescimento vegetal *in vitro***

#### **3.3.1 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)**

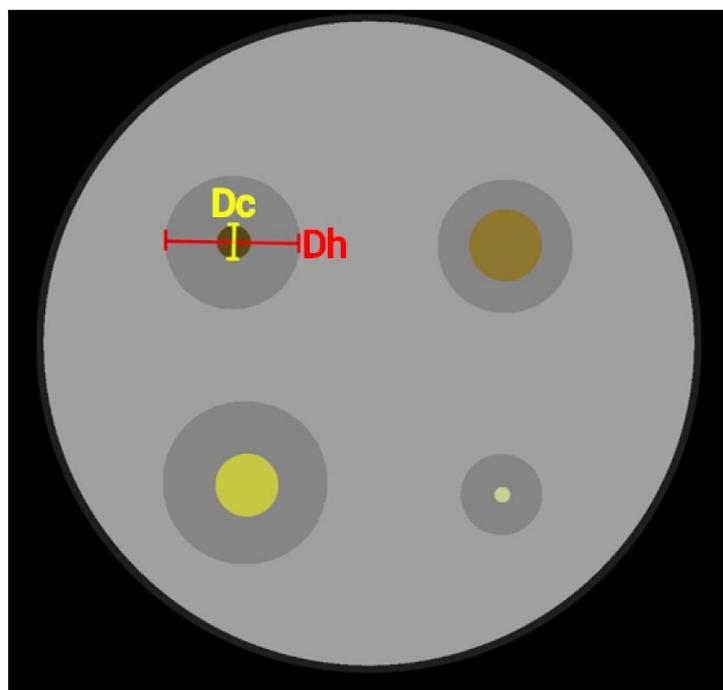
O potencial dos isolados em realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi verificado *in vitro* qualitativamente por meio da inoculação das rizobactérias em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio semissólido NFb (ácido málico,  $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $0,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,2\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{NaCl}$ ,  $0,1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $0,02\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{KOH}$ ,  $4,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; solução de micronutrientes, 2mL; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2mL; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4mL; e solução vitaminas, 1mL; pH 6,8) livre de nitrogênio, em triplicata, com incubação a  $28^{\circ}\text{C}$  por 96 horas (DÖBEREINER et al., 1995; ARAÚJO et al., 2014). A formação de película próximo à superfície dos tubos foi utilizada como indicador positivo desse potencial. A reinoculação sucessiva das linhagens consideradas positivas foi realizada para confirmar a estabilidade dessa característica, bem como para verificar se o crescimento não estava ocorrendo à custa de reservas de nitrogênio das células (CATTELAN, 1999).

#### **3.3.2 Solubilização de fosfato inorgânico (SFI)**

Para avaliar o potencial de solubilização de fosfato inorgânico, de forma qualitativa e semiquantitativa, os isolados foram inoculados em duplicata em meio de cultura sólido contendo fosfato de cálcio bibásico insolúvel (VERMA et al., 2001). A competência dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico foi determinada pela presença de halo incolor ao redor das colônias. Em seguida, as colônias das rizobactérias consideradas solubilizadoras foram inoculadas em meio TSB por 72 horas e depois ajustadas na mesma densidade óptica (DO), com 550nm = 0,1. Em seguida, 10µL dessa solução foi inoculada em triplicata em placas contendo o meio de cultura com fosfato insolúvel, sendo incubadas a 28°C por 120 horas. Então, foram mensurados os diâmetros dos halos (Dh) e os diâmetros das colônias (Dc) para o cálculo do índice de solubilização de fosfato (ISF), (Figura 3) usando a fórmula:

$$ISF = Dh/Dc$$

O ISF está diretamente relacionado com a solubilização mostrada pelo isolado e pode ser classificada como baixo ( $ISF < 2$ ), médio ( $2 < ISF < 3$ ) e alto ( $ISF > 3$ ) (SILVA FILHO & VIDOR, 2000) (BERRAQUERO et al., 1976)



**Figura 3** Desenho esquemático indicando a forma de medição do diâmetro dos halos (Dh) e das colônias (Dc) numa placa com fosfato bibásico de cálcio insolúvel. Fonte: desenvolvido pelo autor.

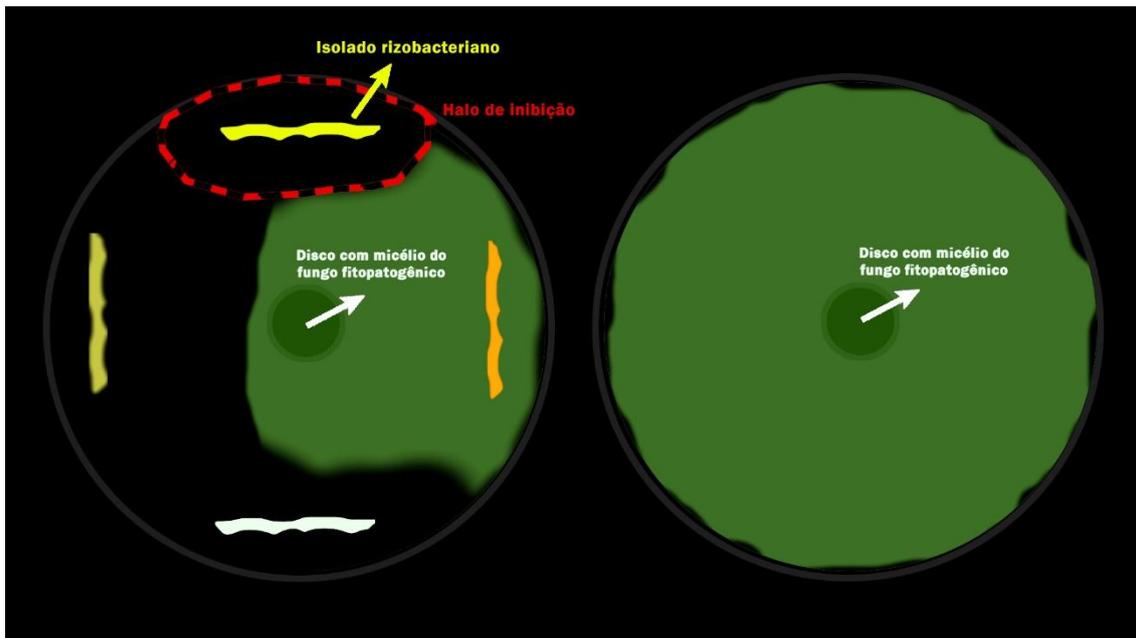
### 3.3.3 Produção de compostos indólicos (AIA)

Para avaliação da produção de compostos indólicos adotou-se o método descrito por Bric e colaboradores (1991), adaptado para análise quantitativa por Husen (2003), onde as colônias foram previamente cultivadas em meio TSB e ajustadas a DO de 550nm = 0,1. Para o ensaio, inoculou-se triplicatas de 100µL dessa solução em 3mL de meio de cultura TSB 10% suplementado com L-triptofano (5mM), com incubação protegida de luz a 28°C e agitação a 180 rpm, por 72 horas. Então, 2mL da suspensão bacteriana foram centrifugados por 5 minutos a 10.000g, sendo que 900µL do sobrenadante foram coletados e misturados a 400µL do Reagente de Salkowski (2mL de FeCl<sub>3</sub> (0,5 mol.L<sup>-1</sup>) e 98mL de HClO<sub>4</sub> (35%)), com incubação protegida da luz por 30 minutos a temperatura ambiente em cubeta de 1,5mL.

A absorbância das amostras foi medida no espectrofotômetro a 520nm de comprimento de onda, o meio de cultura TSB 10% com L-triptofano (5mM) adicionado do Reagente de Salkowski foi utilizado como controle negativo e a presença de coloração rosa-avermelhada nas amostras indicou a produção de compostos indólicos. As leituras foram normalizadas usando curva padrão, construída com base na medição utilizando doses conhecidas do hormônio ácido 3-indolacético sintetizado (Sigma) em concentrações de 1, 5, 25, 50, 75 e 100µg.mL<sup>-1</sup>.

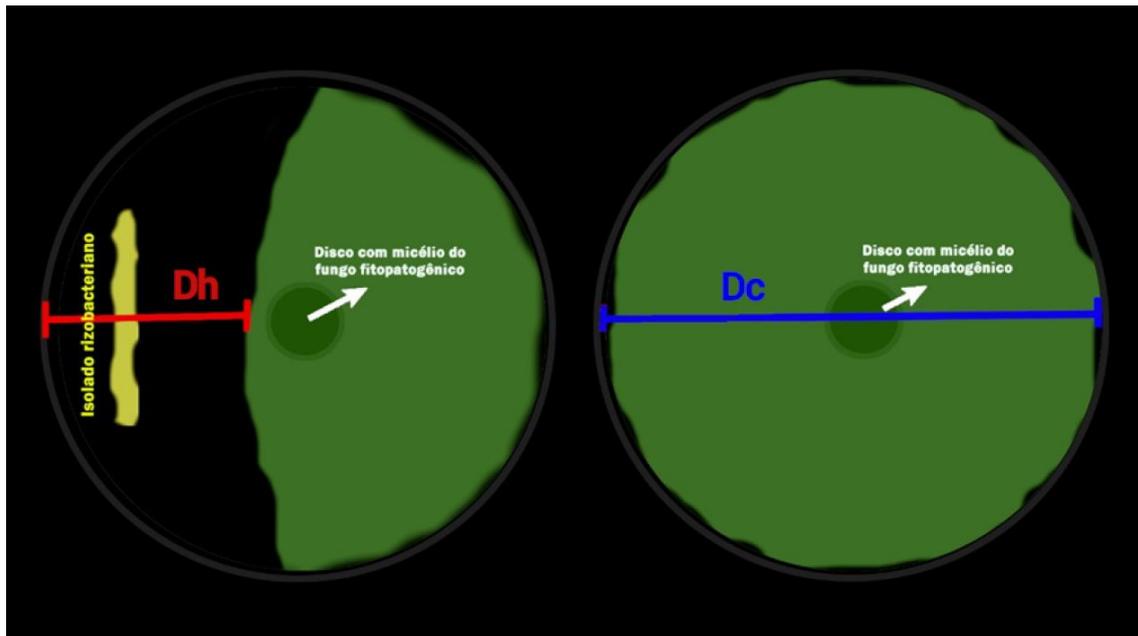
### 3.3.4 Atividade antagonista frente a *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp.

Foram realizados testes para analisar o potencial antagonista dos isolados rizosféricos de *P. vaginatum* contra duas cepas de fungos fitopatogênicos ao gênero *Paspalum*: *Bipolaris* sp., isolado do acesso 098 de *Paspalum atratum* cv. Pojuca e *Colletotrichum* sp., isolado do acesso 215 de *Paspalum regnellii*, ambos do BAG *Paspalum* (relato pessoal). As cepas dos fitopatógenos foram gentilmente cedidas pela Dra. Sônia Regina Nogueira Stephan, pesquisadora da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Na primeira etapa foi feita uma seleção, inoculando-se os isolados em placas de Petri contendo meio *Potato Dextrose Agar* (PDA), em quatro pontos dispostos de forma simétrica, com discos de 0,5 cm de diâmetro contendo o fitopatógeno específico no centro de cada placa (Figura 4). As placas foram incubadas a 28°C por 168 horas, sendo que o controle foi feito em uma placa com apenas o disco do fitopatógeno.



**Figura 4** Representação esquemática da primeira etapa do ensaio de antagonismo *in vitro*. Na placa-control (à direita) não houve inoculação bacteriana.

Na segunda etapa, foi realizado o método de pareamento direto adaptado de Mariano (1993), o qual os isolados selecionados na triagem foram estriados em uma extremidade da placa, enquanto discos dos fungos fitopatogênicos, cada qual em seu ensaio próprio, foram adicionados no centro (Figura 5). Os ensaios foram realizados em triplicata e o controle novamente foi feito em uma placa com apenas o disco do fitopatógeno. A atividade antagonista dos isolados foi indicada pela presença de um halo de inibição no crescimento micelial dos fungos.



**Figura 5** Representação esquemática da segunda etapa do ensaio de antagonismo *in vitro*, com a mensuração dos parâmetros Dh (diâmetro médio do halo de inibição) e Dc (diâmetro médio do controle). Na placa-controle (à direita) não houve inoculação bacteriana.

A equação:

$$\% \text{ inibição} = ((Dc - (Dc - Dh)) / Dc) \times 100$$

Onde Dc = diâmetro médio do controle e Dh = diâmetro médio do tratamento (que foram medidos conforme mostra a figura 4), foi utilizada seguindo a metodologia adaptada de Quiroga e colaboradores (2001) para o cálculo da porcentagem de inibição.

### 3.4 Seleção de isolados rizosféricos para ensaios *in vivo*

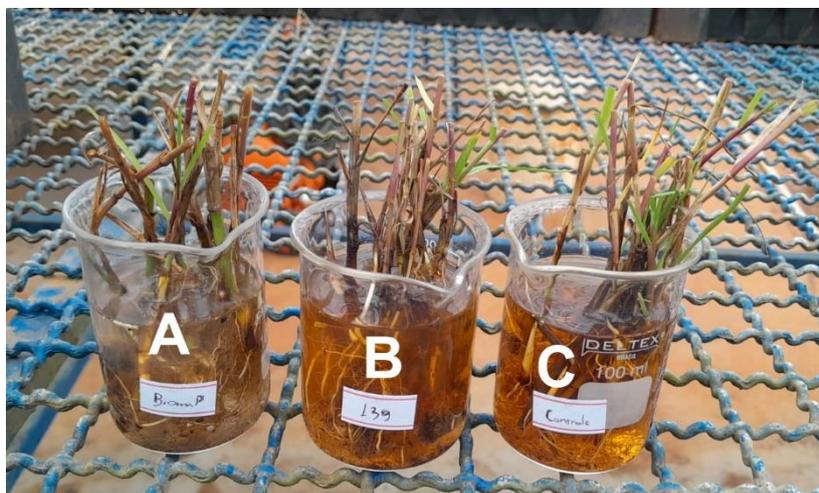
Os isolados 29, 34, 115, 127 e 139 demonstraram potencial tanto no ensaio de FBN, quanto SFI e produção de AIA e foram selecionados para o teste de promoção de crescimento vegetal *in vivo*. Todos estes foram depositados na coleção de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação na Embrapa Pecuária Sudeste (21°57'42" S, 47°50'28" W, 860m), em São Carlos, São Paulo, Brasil.

### 3.5 Ensaio de promoção de crescimento vegetal *in vivo* em casa de vegetação

#### 3.5.1 Preparo das mudas

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos em casa de vegetação na Embrapa Pecuária Sudeste. Para a avaliação da promoção de crescimento *in vivo*, foi utilizado o acesso BGP 114, coletado de *Paspalum vaginatum*.

Mudas de *P. vaginatum* foram cortadas do acesso do BAG *Paspalum* e foram padronizadas aproximadamente com o mesmo tamanho (8 a 9 cm) e o mesmo número de nós (três). Então, as mudas foram plantadas em sementeiras ((5,3 X 33,7 X 67,2 cm), com 162 células, de dimensão 3,5 X 3,5 cm e volume 31 cm<sup>3</sup>) com substrato comercial para plantas *Carolina Soil*<sup>®</sup> (*Carolina Soil do Brasil LTDA*) para seu enraizamento. Após 20 dias, as mudas foram lavadas, novamente cortadas e padronizadas da mesma forma antes de passar pela inoculação com os isolados por imersão das raízes (figura 6) e posterior plantio em vasos com 0,5kg de uma mistura de terra e substrato comercial para plantas *Carolina Soil*<sup>®</sup> esterilizado (na proporção 2:1).



**Figura 6** Inoculação por imersão das raízes de *P. vaginatum* em solução bacteriana. A: controle positivo (BiomaPhos<sup>®</sup>); B: tratamento com isolado 139; C: controle negativo.

#### 3.5.2 Preparação do inóculo bacteriano e inoculações

Os isolados selecionados foram cultivados em meio TSB por 36 horas, sob agitação constante a 28°C em *shaker* a 160 rpm. Então, as culturas foram diluídas no próprio caldo de cultura até chegar à absorvância de 0,08 a 0,13 a 625nm, o que corresponde a

concentração de, aproximadamente,  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL pela escala de McFarland. Ocorreram duas inoculações: a primeira, por imersão das raízes em solução microbiana padronizada por 30 minutos, no momento do transplante das mudas da sementeira para os vasos. A segunda ocorreu após 30 dias do transplante, onde um volume de 6 mL desta suspensão padronizada foi inoculado no solo próximo à raiz de cada planta. O controle positivo foi inoculado com BiomaPhos® comercial, um inoculante solubilizador de fósforo formado por duas cepas de *Bacillus* (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) (OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020), enquanto o controle negativo com meio de cultura estéril, sem isolado bacteriano, em ambas as inoculações. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com doze repetições. Após 35 dias da segunda inoculação as plantas foram retiradas dos vasos para avaliação de variáveis agronômicas.

### 3.5.3 Avaliação de variáveis agronômicas

A análise das plantas foi realizada por meio da mensuração do peso seco de raiz e parte aérea, após secagem por 10 dias em estufa a 60 °C. Os parâmetros medidos visaram sua aplicação em campos esportivos, considerando a promoção de desenvolvimento vegetal por meio dos tratamentos.

## 3.6 Identificação taxonômica dos isolados rizosféricos

### 3.6.1 Extração do DNA bacteriano

Os isolados rizobacterianos com potencial de promoção de crescimento foram submetidos à cultura em tubos contendo TSB a uma temperatura de 28 °C durante um período de 48 horas sob agitação contínua a 150 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado a extração de DNA foi conduzida no pellet utilizando o *Bacteria DNA Preparation Kit*®, fabricado pela Cellco Biotec do Brasil Ltda., com base nas especificações do fabricante.

### 3.6.2 Amplificação parcial do gene 16S do DNA ribossomal

A amplificação da região alvo do gene 16S do DNA ribossomal foi conduzida por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o seguinte ciclo em termociclador:

desnaturação inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 segundos a 52 °C, 1 minuto a 72 °C e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. A reação foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 200µM de cada dNTP, 10 ng de DNA molde, 1,25 U de Taq DNA polimerase® (Cellco), 2,5 µL de tampão de Taq DNA polimerase (10x) e 0,4 µM de cada *primer* V3F (5'CCAGACTCCTACGGGAGGCAG-3') e V6R (5'ACATTTCAACACGAGCTGACGA-3') (CHAKRAVORTY et al., 2007). A confirmação da amplificação do fragmento foi realizada por eletroforese em gel 1,5 % de agarose corado com Brometo de Etídeo, seguido pela comparação do fragmento com o marcador de peso molecular 1 kb DNA *Ladder* RTU (KASVI).

### 3.6.3 Purificação e sequenciamento

O fragmento de PCR foi purificado utilizando-se o *QIA quick PCR purification kit*® (QIAGEN), seguindo orientações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram submetidas à análise em gel de agarose 1,5%, comparadas com *Low Mass DNA Ladder* (INVITROGEN) e encaminhadas para sequenciamento no LMseq (Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica - <https://www.fcav.unesp.br/#!/servicos/facilities/sequenciamento/equipe/>) na UNESP campus Jaboticabal.

### 3.6.4 Análise das sequências e montagem do dendograma

Os eletroferogramas das sequências foram visualizados e editados utilizando o software *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.2.5) (HALL, 1999) para a exclusão de partes da sequência onde os picos não estavam bem definidos ou demonstravam indeterminação da base nitrogenada. Após a edição e produção das sequências contig, houve a comparação com sequências depositadas em dois bancos públicos: (1) *EzBioCloud* 16s rRNA database (<https://www.ezbiocloud.net/>), utilizando a ferramenta 16s-based ID com 95% de confiança para atribuir as sequências 16S (YOON et al., 2017) e (2) *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando a ferramenta BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997), disponível no site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

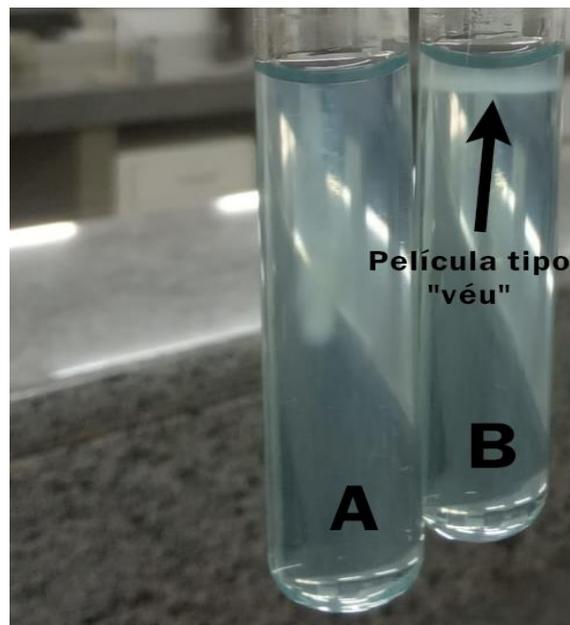
Todas as sequências obtidas de RNA ribossomal 16S dos isolados neste trabalho foram submetidas ao *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Por meio do software *Mega X* (KUMAR et al., 2018) foi feito o alinhamento das sequências através do software *ClustalW* (THOMPSON et al., 1994), sendo utilizado na construção das árvores iniciais para a busca heurística, obtidas automaticamente aplicando os algoritmos *Neighbour-Join* e *BioNJ* a uma matriz de distâncias pareadas estimadas usando o modelo Tamura-Nei (TAMURA & NEI, 1993) e, em seguida, selecionando a topologia com valor de *log* de verossimilhança superior. A história evolutiva foi inferida usando o método de máxima verossimilhança e a árvore consenso foi determinada pela análise de *bootstrap*, feita com base em 1000 réplicas (FELSENSTEIN, 1985). As ramificações correspondentes às partições reproduzidas em menos de 50% das réplicas de *bootstrap* foram eliminadas. A espécie *Halobacterium salinarum* (EZBioCloud: AE004437) foi utilizada como grupo externo nos dendogramas. Além das sequências obtidas no presente estudo, foram utilizadas as sequências das seguintes linhagens rizosféricas e endofíticas isoladas de *P. atratum* (DE PAULA et al., 2022) depositadas no *GenBank* além de outras sequências de espécies relacionadas aos resultados do BLASTN, para efeito de comparação: *Bacillus* spp. 109 (MK521292), *Enterobacter* spp. 103 (MK521286), *Enterobacter* spp. 110 (MK521293), *Microbacterium* spp. 183 (MK521307), *Micrococcus* spp. (MK521314), *Pantoea* spp. 169 (MK521301), *Pseudomonas* spp. 105 (MK521288), *Acinetobacter calcoaceticus* (EZBioCloud: AIEC01000170), *Acinetobacter pittii* (EZBioCloud: APQP01000001), *Bacillus amyloliquefaciens* strain US573 (*GenBank*: LN864508.1), *Bacillus cereus* (EZBioCloud: AE016877), *Burkholderia metallica* (EZBioCloud: AM747632), *Microbacterium mangrovi* (EZBioCloud: JTDK01000032), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* HEB5 (*GenBank*: LN794238.1) e *Streptomyces rhizophilus* (EZBioCloud: HQ267989).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ensaio de promoção de crescimento vegetal *in vitro*

Dentre os 145 isolados de rizobactérias avaliados, 26 (18%) foram capazes de crescer e formar película em meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (Figura 7), indicando o potencial de fixação biológica de nitrogênio (tabela 1).



**Figura 7** Ensaio de fixação biológica de nitrogênio. A) no tubo à esquerda a fixação de nitrogênio é observada no isolado positivo pela formação da película em meio NFb semissólido livre de nitrogênio. B) no tubo à direita, o controle sem inoculação bacteriana. Fonte: documentado pelo autor.

Dentro do contexto de utilização de gênero *Paspalum* para fins de gramado é exigida uma alta demanda de nitrogênio (N), nutriente essencial para manter sua coloração verde, densidade adequada e para recuperação de estresses, tais como seca, doenças e desgaste físico por pisoteio (KOERITZ & STIER, 2009). Sabe-se que a administração de doses mais altas de fertilizante nitrogenado em *P. vaginatum* pode aumentar a tolerância ao desgaste físico por tráfego (TRENHOLM et al., 2001) e que essa planta só absorve nitratos (DUNCAN & CARROW, 2005). Nesse sentido, os microrganismos diazotróficos, como rizobactérias, promotores de crescimento vegetal podem tornar a administração de fertilizantes nitrogenados mais eficiente e precisa, tendo um alto potencial para aumentar absorção de nitrogênio pela planta hospedeira e promover o crescimento por fixação biológica de nitrogênio (LIU et al., 2021).

Segundo De Paula e colaboradores (2022), isolados bacterianos associados a *P. atratum* e *P. notatum* apresentaram resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio, sendo estes isolados pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, dentre outros. Moraes (2021) descreveu os gêneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Serratia* como potenciais fixadores de nitrogênio atmosférico. Os dois últimos estudos supracitados pertencem ao mesmo grupo de pesquisa ao qual este trabalho também faz parte. Em outra pesquisa, foram encontradas bactérias diazotróficas pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Enterobacter* e *Rhizobium* isoladas de cultivares de *P. vaginatum* na China (LIU et al., 2021). Esses estudos corroboram os gêneros de RPCV encontradas no presente trabalho e embora seja ainda necessária a condução de pesquisas mais específicas sobre a interação nitrogênio-*Paspalum*-rizobactéria para a elaboração de inoculantes que tornem a aplicação desse tipo de fertilizante mais eficiente, é possível que rizobactérias diazotróficas promotoras de crescimento vegetal constitua uma promissora alternativa para a melhora do cultivo de gramados.

**Tabela 1** Resultados dos testes *in vitro* para fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato inorgânico (SFI), produção de compostos indólicos (AIA) e identificação das rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) associadas à *Paspalum vaginatum*

Código	Meio de cultura de isolamento	Número de acesso GenBank®	Identificação	FBN	SFI	AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
1	TSA	PP885946	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	3,02
2	TSA	PP885947	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	2,7	7,23
3	TSA	PP885948	<i>Acinetobacter</i> sp.	+	-	11,36
4	TSA	PP885949	<i>Enterobacter</i> sp.	+	2,9	32,10
5	TSA	PP885950	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	3,1	4,52
6	TSA	NI*	NI*	-	-	31,30
7	TSA	NI*	NI*	-	-	23,57
8	TSA	PP885951	<i>Lysinibacillus</i> sp.	+	-	12,57
9	TSA	PP885952	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	5,66
10	TSA	PP885953	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	8,14
11	TSA	PP885954	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	9,16
12	TSA	PP885955	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	11,02
13	TSA	PP885956	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	0,89
14	TSA	NI*	NI*	-	-	2,49
15	TSA	NI*	NI*	-	-	37,75
16	TSA	PP885957	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	15,49
17	TSA	PP885958	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	19,09

18	TSA	PP885959	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	7,72
19	TSA	PP885960	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	9,06
20	TSA	PP885961	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	2,59
21	TSA	PP885962	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	41,59
22	TSA	NI*	NI*	-	-	5,64
23	TSA	NI*	NI*	-	-	17,20
24	TSA	PP885963	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	19,85
25	TSA	PP885964	<i>Priestia</i> sp.	-	1,4	10,36
26	TSA	PP885965	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	4,48
27	TSA	PP885966	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	13,79
28	TSA	NI*	NI*	-	-	18,01
29	TSA	PP885967	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	2,1	23,38
30	TSA	NI*	NI*	-	-	4,27
31	TSA	PP885968	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	0,09
32	TSA	NI*	NI*	-	-	10,73
33	TSA	PP885969	<i>Priestia</i> sp.	+	-	1,42
34	TSA	PP885970	<i>Priestia</i> sp./ <i>Bacillus</i> sp.	+	2	42,16
35	TSA	PP885971	<i>Priestia</i> sp.	+	-	2,87
36	TSA	PP885972	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	2,22
37	TSA	NI*	NI*	-	-	3,49
38	TSA	PP885973	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	8,78
39	TSA	PP885974	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	12,87
40	TSA	PP885975	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	10,44
41	TSA	NI*	NI*	-	-	7,01
42	TSA	NI*	NI*	-	-	5,98
43	TSA	PP885976	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	17,86
44	TSA	PP885977	<i>Moraxella</i> sp.	-	-	25,32
45	TSA	NI*	NI*	-	-	1,79
46	TSA	NI*	NI*	-	-	12,71
47	TSA	NI*	NI*	-	-	30,56
48	TSA	NI*	NI*	-	-	5,46
49	TSA	NI*	NI*	-	-	17,66
50	TSA	PP885978	<i>Priestia</i> sp.	-	1,2	5,62
51	TSA	NI*	NI*	-	-	3,43
52	TSA	PP885979	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	19,55
53	TSA	NI*	NI*	-	-	25,54
54	TSA	NI*	NI*	-	-	16,38
55	TSA	PP885980	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	8,16
56	TSA	PP885981	<i>Amycolatopsis</i> sp.	+	-	3,63
57	TSA	NI*	NI*	-	-	6,86
58	TSA	PP885982	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	1,02
59	TSA	PP885983	<i>Lysinibacillus</i> sp.	-	-	40,52
60	TSA	NI*	NI*	-	-	1,15
61	TSA	NI*	NI*	-	-	9,78
62	TSA	PP885984	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	12,88
63	TSA	NI*	NI*	-	-	18,96
64	TSA	NI*	NI*	-	-	1,32
65	TSA	NI*	NI*	-	-	3,89

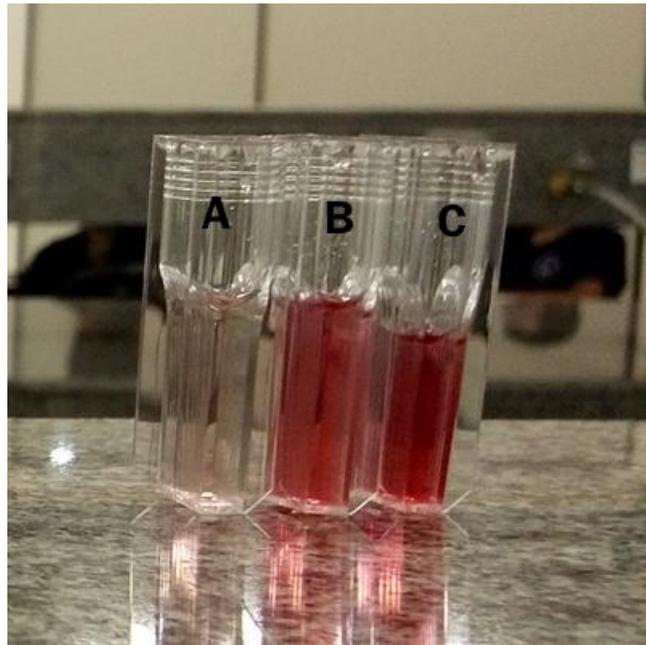
66	TSA	PP885985	<i>Priestia</i> sp.	-	1,3	8,41
67	TSA	NI*	NI*	-	-	24,32
68	TSA	NI*	NI*	-	-	5,24
69	TSA	NI*	NI*	-	-	8,79
70	TSA	PP885986	<i>Brevibacillus</i> sp.	+	-	6,35
71	ISP2	PP885987	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	2,3	1,12
72	ISP2	PP885988	<i>Burkholderia</i> sp.	+	1,8	23,87
73	ISP2	PP885989	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	3,65
74	ISP2	NI*	NI*	-	-	10,78
75	ISP2	PP885990	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	2,6	7,64
76	ISP2	PP885991	<i>Enterobacter</i> sp.	+	3,7	39,27
77	ISP2	PP885992	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	8,36
78	ISP2	NI*	NI*	-	-	32,18
79	ISP2	NI*	NI*	-	-	23,72
80	ISP2	NI*	NI*	-	-	2,15
81	ISP2	PP885993	<i>Streptomyces</i> sp.	-	1,5	4,96
82	ISP2	NI*	NI*	-	-	2,54
83	ISP2	PP885994	<i>Arthrobacter</i> sp.	-	-	24,64
84	ISP2	PP885995	<i>Kitasatospora</i> sp./ <i>Streptomyces</i> sp.	-	2,1	12,85
85	ISP2	NI*	NI*	-	-	3,15
86	ISP2	NI*	NI*	-	-	7,86
87	ISP2	NI*	NI*	-	-	6,98
88	ISP2	NI*	NI*	-	-	13,25
89	ISP2	NI*	NI*	-	-	2,17
90	ISP2	PP885996	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	4,68
91	ISP2	PP885997	<i>Chryseobacterium</i> sp.	-	-	8,94
92	ISP2	PP885998	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	3,21
93	ISP2	PP885999	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	7,69
94	ISP2	PP886000	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	-	9,85
95	ISP2	NI*	NI*	-	-	12,89
96	ISP2	PP886001	<i>Nocardia</i> sp.	-	-	4,55
97	ISP2	PP886002	<i>Nocardia</i> sp.	-	-	24,68
98	ISP2	NI*	NI*	-	-	2,12
99	ISP2	NI*	NI*	-	-	3,47
100	ISP2	PP886003	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	2,88
101	ISP2	PP886004	<i>Rhodococcus</i> sp.	-	1,2	4,86
102	ISP2	NI*	NI*	-	-	18,68
103	ISP2	PP886005	<i>Microbacterium</i> sp.	-	1,2	9,39
104	ISP2	PP886006	<i>Microbacterium</i> sp.	-	1,5	1,22
105	ISP2	NI*	NI*	-	-	1,78
106	ISP2	PP886007	<i>Arthrobacter</i> sp.	-	1,2	5,79
107	ISP2	PP886008	<i>Mycobacterium</i> sp.	-	1,2	16,7
108	ISP2	PP886009	<i>Microbacterium</i> sp.	+	-	0,54
109	ISP2	PP886010	<i>Lysinibacillus</i> sp.	-	-	9,85
110	ISP2	NI*	NI*	-	-	7,23
111	ISP2	PP886012	<i>Amycolatopsis</i> sp.	-	1,2	1,41
112	ISP2	PP886011	<i>Sinomonas</i> sp.	-	1,3	15,97

113	ISP2	PP886013	<i>Burkholderia</i> sp.	-	3	0,98
114	ISP2	PP886014	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	17,74
115	ISP2	PP886015	<i>Streptomyces</i> sp.	+	1,3	27,16
116	ISP2	PP886016	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	16,35
117	ISP2	NI*	NI*	-	-	4,07
118	ISP2	PP886017	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	1,72
119	ISP2	PP886018	<i>Microbacterium</i> sp.	+	-	10,51
120	ISP2	PP886019	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	3,84
121	ISP2	NI*	NI*	-	-	13,64
122	ISP2	PP886020	<i>Curtobacterium</i> sp.	-	-	9,74
123	ISP2	PP886021	<i>Arthrobacter</i> sp.	-	-	6,48
124	ISP2	PP886022	<i>Arthrobacter</i> sp.	-	-	13,59
125	ISP2	PP886023	<i>Paenibacillus</i> sp.	-	-	5,45
126	ISP2	PP886024	<i>Prescottella</i> sp.	-	-	17,95
127	ISP2	PP886025	<i>Dyella</i> sp.	+	2	13,89
128	ISP2	NI*	NI*	-	-	21,64
129	ISP2	PP886026	<i>Priestia</i> sp.	-	-	8,85
130	ISP2	PP886027	<i>Microbacterium</i> sp.	-	-	3,28
131	ISP2	NI*	NI*	-	-	4,41
132	ISP2	NI*	NI*	-	-	8,96
133	ISP2	PP886028	<i>Kitasatospora</i> sp./ <i>Actinomycetia</i> sp.	-	1,3	5,43
134	ISP2	NI*	NI*	-	-	4,79
135	ISP2	PP886029	<i>Streptomyces</i> sp.	-	1,4	12,47
136	ISP2	PP886030	<i>Leifsonia</i> sp.	-	-	12,99
137	ISP2	PP886031	<i>Microbacterium</i> sp.	-	-	28,63
138	ISP2	NI*	NI*	-	-	2,39
139	ISP2	PP886032	<i>Rhizobium</i> sp./ <i>Agrobacterium</i> sp.	+	1,8	57,38
140	ISP2	PP886033	<i>Lysinibacillus</i> sp.	-	-	13,24
141	ISP2	PP886034	<i>Burkholderia</i> sp.	+	-	7,21
142	ISP2	NI*	NI*	-	-	16,56
143	ISP2	NI*	NI*	-	-	3,11
144	ISP2	PP886035	<i>Prescottella</i> sp.	-	-	23,65
145	ISP2	PP886036	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	5,21

**TSA:** meio de cultura *Tryptic Soy Agar* ou ágar triptona de soja; **ISP2:** meio de cultura *International Streptomyces Project 2*; **NI\*:** isolado não-identificado.

#### 4.2 Produção de compostos indólicos

Todos os isolados rizosféricos avaliados foram capazes de produzir AIA (figura 8). Os valores de produção de AIA com valores variando de 0,09  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  até 57,38  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (tabela 1).



**Figura 8** Cubetas do ensaio de ácido 3-indolacético. A) controle, demonstrando translucidez. B) e C) isolados que produziram AIA, mostrando que quanto mais intensa a coloração, maior a produção do fitormônio. Fonte: documentado pelo autor.

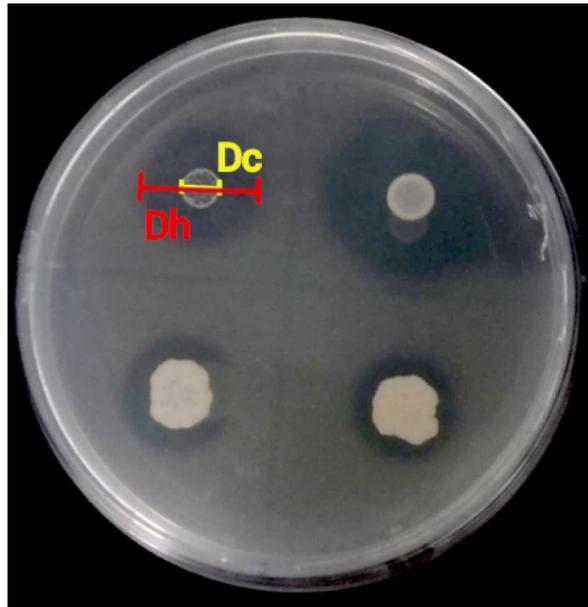
As RPCV podem equilibrar os níveis de hormônios vegetais, sintetizando fitormônios. Estresses abióticos, como estresses hídricos e alta salinidade, reduzem a quantidade desses fitormônios nas plantas, diminuindo seu efeito (KAUSHAL & WANI, 2016, NGUMBI & KLOPPER, 2016). O fitormônio ácido-3-indol acético, um composto indólicos da classe das auxinas, é conhecido por auxiliar no crescimento das células vegetais e no alongamento do tecido, aumentando a área de superfície radicular para a absorção de nutrientes e água, além de coordenar uma defesa celular contra o estresse hídrico (ETESAMI et al., 2015).

Alguns trabalhos já descreveram microrganismos promotores de crescimento vegetal produtores de AIA associados à *Paspalum* sp. variando entre as mais diversas concentrações e pertencentes a diversos gêneros, como *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, dentre outros (MACHADO et al., 2013; AMARAL et al., 2021; DE PAULA et al., 2022). Neste estudo, os principais gêneros produtores de compostos indólicos foram *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Priestia* e *Rhizobium*, com produção acima de  $30 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Amaral e colaboradores (2021) isolaram bactérias associadas a *Paspalum* sp. pertencentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Paraburkholderia* e *Pseudomonas*, produzindo compostos indólicos em

concentrações variadas de 2,79 a 36,62  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . De Paula e colaboradores (2022) trabalhando, também, com rizobactérias associadas a *Paspalum* sp., discorreu sobre linhagens de *Pseudomonas* sp. produzindo AIA entre 16,09 a 65,12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Porém, é importante notar que altos níveis AIA podem originar efeitos adversos, como inibir o crescimento das raízes primárias (DUCA et al., 2014). Assim, é essencial conhecer o nível ideal de AIA na planta para selecionar a bactéria apropriada para uso como inoculante.

### 4.3 Solubilização de fosfato

Dos os 145 isolados rizosféricos avaliados quanto à capacidade de solubilização de fosfato em meio de cultura sólido contendo  $\text{CaHPO}_4$ , vinte e sete apresentaram halo em torno das colônias (Figura 9) representando 18,6 % do total testado e indicando o potencial de solubilização de fosfato pelos mesmos; após este primeiro ensaio, foi feita a avaliação quantitativa da solubilização de fosfato e os isolados 5 (*Acinetobacter* sp.), 76 (*Enterobacter* sp.) e 113 (*Burkholderia* sp.) apresentaram alto potencial de solubilização, igual ou acima a 3,00. Os isolados 2 (*Acinetobacter* sp.), 4 (*Enterobacter* sp.), 29 (*Pseudomonas* sp.), 34 (*Priestia* sp./*Bacillus* sp.), 71 (*Acinetobacter* sp.), 75 (*Acinetobacter* sp.), 84 (*Kitasatospora* sp./*Streptomyces* sp.), 127 (*Dyella* sp.) e 139 (*Rhizobium* sp./*Agrobacterium* sp.) apresentaram potencial médio (entre 2,00 e 2,99). Os demais isolados (25 (*Priestia* sp.), 50 (*Priestia* sp.), 66 (*Priestia* sp.), 72 (*Burkholderia* sp.), 81 (*Streptomyces* sp.), 101 (*Rhodococcus* sp.), 103 (*Microbacterium* sp.), 104 (*Microbacterium* sp.), 106 (*Arthrobacter* sp.), 107 (*Mycobacterium* sp.), 111 (*Amycolatopsis* sp.), 112 (*Sinomonas* sp.), 115 (*Streptomyces* sp.), 133 (*Kitasatospora* sp./*Actinomyces* sp.) e 135 (*Streptomyces* sp.) apresentaram baixo potencial (1,99 ou menos) (tabela 1).



**Figura 9** Exemplo da mensuração do halo indicador de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc) de um isolado rizobacteriano positivo para solubilização de fosfato inorgânico. Fonte: documentado pelo autor.

O fósforo (P) é um macronutriente essencial às plantas e é sabido que no cultivo de *P. vaginatum* em campos de golfe, no primeiro mês após a irrigação, são necessárias taxas médias a altas de fósforo e potássio (DUNCAN & CARROW, 2005). Sabe-se, também, que a aplicação eficiente de fósforo estimula o desenvolvimento radicular e o perfilhamento em gramíneas, favorecendo seu estabelecimento inicial (CORRÊA & HAAG, 1993; BERNARDI et al., 2011).

Os microrganismos rizosféricos e endofíticos possuem potencial para a formulação de inoculantes, pois podem disponibilizar o P para as plantas através da solubilização por diversos mecanismos. Isso aumenta a eficiência da adubação fosfatada e minimiza o uso excessivo de fertilizantes fosfatados (AHEMAD & KIBRET, 2014; LACAVA et al., 2021).

Estudo realizado por De Paula e colaboradores (2022) sobre bactérias isoladas de *Paspalum notatum* revelou índices de solubilização de fosfato variando entre 2,00 e 3,61, sendo o maior índice de solubilização pertencente a um isolado endolítico de raiz pertencente ao gênero *Enterobacter*. Moraes (2021) descreveu isolados bacterianos solubilizadores de fosfato rizosféricos e endofíticos associados a 3 genótipos de *Paspalum* sp., variando entre 1,32 a 4,71 em SFI, onde o maior índice foi de um isolado rizosféricos associado a *P. compressifolium* identificado como *Pseudomonas* sp.

Linhagens rizosféricas solubilizadoras de fosfato de *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Burkholderia sp.* e *Rhizobium sp.* associados a espécies de *Paspalum* também já foram descritas, com SFI variando entre 1,05 a 2,36 (AMARAL et al., 2021). Neste trabalho, o índice de solubilização de fosfato compreendeu a faixa de 1,20 a 3,70, onde os gêneros *Acinetobacter*, *Burkholderia* e *Enterobacter* corroboraram com o alto potencial de solubilização descrito em literatura, sendo promissores para estudo *in vivo*. As rizobactérias apresentam maior potencial para uso comercial como solubilizadoras de fosfato, pois a bactéria deve estar próxima da fonte de fósforo (TAURIAN et al., 2010).

#### **4.4 Antagonismo à fungos fitopatogênicos**

Dos 145 isolados avaliados contra os fungos fitopatogênicos, doze isolados (3, 9, 12, 17, 84, 111, 115, 116, 125, 133, 135 e 141) apresentaram atividade antagônica contra *Bipolaris sp.* e oito isolados (17, 84, 111, 115, 125, 133, 135 e 141) contra *Colletotrichum sp.* Foi realizada a intersecção desses dois grupos e os oito isolados que apresentaram atividade antagônica contra ambos os fungos fitopatogênicos testados foram selecionados para a etapa de pareamento direto (Figura 10). Os resultados da porcentagem de inibição micelial são mostrados na tabela 2.



**Figura 10** Ensaio de pareamento direto do isolado 115 (*Streptomyces* sp.). A) pareamento direto contra *Colletotrichum* sp.; à esquerda a placa-controle, somente com a inoculação do disco micelial do fungo; à direita, a placa com inoculação do isolado. B) pareamento direto contra *Bipolaris* sp.; à esquerda a placa-controle, somente com a inoculação do disco micelial do fungo; à direita, a placa com inoculação do isolado. Fonte: documentado pelo autor.

Os fungos compõem o maior e o mais diverso grupo de microrganismos fitopatogênicos, eles são responsáveis por uma perda substancial na qualidade e quantidade da produção agrícola em todo o mundo. O uso dos fungicidas pode trazer diversas consequências ambientais e para a saúde humana (RANI et al., 2021). Uma alternativa sustentável é o controle biológico de doenças de plantas onde um microrganismo é utilizado para controlar outro (MORANDI et al., 2009).

Entre os isolados que apresentaram atividade antagônica contra ambos os fungos fitopatogênicos estão bactérias pertencentes aos gêneros *Streptomyces* e *Amycolatopsis* classificados como actinobactérias, um grupo conhecido pela produção de antibióticos naturais (BARKA et al., 2016). Os gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Amycolatopsis*, apresentam potencial uso no controle de doenças causadas por fungos na agricultura e tem sido estudados, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, como antagonistas de uma vasta gama de agentes fitopatogênicos, dentre eles o *Bipolaris* sp. e o *Colletotrichum* sp. (MONTEIRO et al., 2017; VILLA-RODRIGUEZ et al., 2019; KIM et al.,

2021; BRITO et al., 2022; SHARMA et al., 2022; WANG et al., 2023), agentes causadores de doenças em diversas culturas de importância econômica, inclusive em gramíneas (ANJOS et al., 2004; HYDE et al., 2009; GASPARETTO et al., 2017; DEPETRIS et al., 2020; ALIZADEH et al., 2022). Brito e colaboradores (2022) descreveu linhagens de *Amycolatopsis* sp. e *Streptomyces* sp. produzindo compostos orgânicos voláteis biologicamente ativos contra *Colletotrichum* sp. Em estudo realizado por Chen e colaboradores (2020), compostos orgânicos voláteis produzidos por *Burkholderia* sp., isolada das raízes de *Sophora tonkinensis* (planta medicinal chinesa), foram antagônicos a diversos fungos fitopatogênicos, incluindo *Bipolaris* sp. Xu e colaboradores (2021) descreveram sobre uma linhagem rizosférica de *Burkholderia* sp. inibindo o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. em 36,7 %. No presente estudo, a inibição pelo isolado 141 (*Burkholderia* sp.) frente ao *Colletotrichum* sp. foi de 52,4 %. O gênero *Paenibacillus* sp. já foi descrito com atividade antagônica *in vitro* e induzindo resistência sistêmica *in vivo* contra *Colletotrichum* sp. (YADAV et al., 2021). Uma cepa de *Paenibacillus* sp. endofítica de soja foi antagônica, *in vitro*, contra duas espécies de *Bipolaris* sp. (LIU et al., 2016). Os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces* possuem vantagem em relação aos outros gêneros, devido à sua capacidade de formar esporos, o que facilita o uso desses microrganismos na formulação de produtos mais estáveis e viáveis (BARRATT et al., 2018; RECHCIGL, 2018). Fernandes e colaboradores (2023) descreveram, em um trabalho que faz parte do mesmo grupo de pesquisa deste estudo, bactérias endofíticas isoladas também do acesso BGP 114 de *P. vaginatum*, pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Streptomyces* com porcentagens de inibição *in vitro* do crescimento de *Bipolaris* sp. variando entre 12 % e 77 %. No presente estudo, a faixa de inibição para este fungo variou de 31,0 % a 85,7 %, indicando que foram obtidos altos índices de inibição *in vitro*, principalmente pelos isolados 111 (*Amycolatopsis* sp.), 125 (*Paenibacillus* sp.), 133 (*Kitasatospora* sp./*Actinomyces* sp.) e 135 (*Streptomyces* sp.), com porcentagens de inibição acima de 80%.

**Tabela 2** Porcentagem de inibição de crescimento micelial de *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp. pelos isolados rizobacterianos

Isolados	Porcentagem de inibição	
	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Colletotrichum</i> sp.
17 ( <i>Bacillus</i> sp.)	77,4	75,0
84 ( <i>Kitasatospora</i> sp./ <i>Streptomyces</i> sp.)	58,3	51,2
111 ( <i>Amycolatopsis</i> sp.)	81,0	71,4
115 ( <i>Streptomyces</i> sp.)	31,0	28,6
125 ( <i>Paenibacillus</i> sp.)	85,7	82,1
133 ( <i>Kitasatospora</i> sp./ <i>Actinomycetia</i> sp.)	81,0	73,8
135 ( <i>Streptomyces</i> sp.)	84,5	61,9
141 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	72,6	52,4

#### 4.5 Identificação dos isolados, seleção de rizobactérias para ensaios *in vivo* e biodiversidade de RPCV associada a *Paspalum vaginatum*

Ao todo, noventa e um isolados (62,8% do total) foram sequenciados e identificados. Após a identificação, foi realizada uma seleção com as rizobactérias que mostraram resultados positivos em ambos os testes *in vitro* de solubilização de fosfato inorgânico e fixação biológica de nitrogênio, sendo realizada uma pesquisa sobre cada um de acordo com sua identificação, com o objetivo de excluir das inoculações *in vivo* quaisquer isolados que apresentassem alta homologia (acima de 99 %) com espécies patogênicas ao homem. Neste sentido, foram excluídos dos ensaios em casa de vegetação os isolados 4 (100 % de homologia com *Enterobacter cloacae*), 72 (100 % de homologia com *Burkholderia contaminans*), 76 (100 % de homologia com *E. cloacae*) e 141 (99,46 % de homologia com *Burkholderia metallica*).

Dos isolados bacterianos identificados, 31% deles pertencem ao gênero *Bacillus*, 8% pertencem ao *Priestia*, 8% pertencem a *Streptomyces*, 7% pertencem a *Microbacterium*, 5% pertencem a *Acinetobacter*, 4% pertencem a *Arthrobacter*, 4% pertencem a *Lysinibacillus*, 3% pertencem a *Burkholderia*, 3% pertencem a *Staphylococcus*, 2% pertencem a *Amycolatopsis*, 2% pertencem a *Enterobacter*, 2% pertencem a *Kitasotospora*, 2% pertencem a *Nocardia*, 2% pertencem a *Prescottella* e a

proporção restante dividida entre os gêneros *Agrobacterium*, *Brevibacillus*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Dyella*, *Leifsonia*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sinomonas* e *Stenotrophomonas*, totalizando 28 gêneros diferentes (figura 11).

O desenvolvimento e as características morfológicas das actinobactérias são influenciados por fatores nutricionais, químicos e ambientais, como as fontes de carbono, a temperatura e o pH utilizados (BOUBEKRI et al., 2022). *Streptomyces* é o gênero de actinobactéria mais encontrado na rizosfera, porém, outros gêneros de actinobactérias também são descritos como rizosféricos, tais como *Sanguibacter*, *Rhodococcus*, *Pseudonocardia*, *Propionibacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Frankia*, *Corynebacterium*, *Clavibacter*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* e *Actinomyces* (SILVA et al., 2022). A proporção da diversidade de gêneros encontrados muito provavelmente sofreu influência da utilização de dois meios de cultura diferentes no isolamento, visto que o meio de cultura ISP2 favorece especificamente o desenvolvimento de actinobactérias, o que possibilitou, também, o estudo da diversidade de actinobactérias associadas à rizosfera de *P. vaginatum* (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966; HAZARIKA & THAKUR, 2020). A utilização de meios de cultura diversificados pode possibilitar a observação de uma maior biodiversidade de bactérias cultiváveis, incluindo as que necessitam de fontes nutricionais complexas para seu desenvolvimento (KUMAR & JADEJA, 2016; HASSAN et al., 2019).

Sabe-se que diferentes tipos de manejo e modos de irrigação, podem alterar a composição físico-química do solo e, conseqüentemente, a microbiota associada (ANDRADE et al., 2023; MACHADO et al., 2024). Trabalhos discutindo a diversidade de rizobactérias associadas ao gênero *Paspalum* sp. são escassos e recentes, sendo necessário mais pesquisas nessa temática de forma a entender melhor o relacionamento dos microrganismos com essas plantas que possuem grande potencial de aplicações em diversas áreas. Amaral e colaboradores (2021) discutiram sobre a alta diversidade de rizobactérias diazotróficas associadas a *Paspalum* sp. utilizando o meio seletivo NFb (DÖBEREINER et al., 1995) para o isolamento e identificando os gêneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Paraburkholderia*, *Enterobacter*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Dyadobacter* e *Acinetobacter* como os mais frequentes,

respectivamente. Além disso, o estudo ainda sugeriu a ausência de especificidade entre as linhagens encontradas e os genótipos das plantas. De Paula e colaboradores (2022) relataram bactérias da rizosfera e raiz de *P. atratum* positivas *in vitro* para testes de solubilização de fosfato, fixação biológica de nitrogênio e produção de ácido indol acético, encontrando a proporção dos gêneros *Enterobacter* (46,50%), *Pseudomonas* (32,50%) e *Pantoea* (13,90%), além de *Bacillus*, *Microbacterium* e *Micrococcus* que totalizaram, junto, 6,90%. Fernandes e colaboradores (2023), trabalhando com bactérias endofíticas isoladas do mesmo acesso de *P. vaginatum* deste estudo, identificaram os gêneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptomyces* demonstrando, *in vitro*, potencial para promoção de crescimento vegetal.

Comparando as RPCV encontradas neste estudo com as RPCV obtidas por De Paula e colaboradores (2022) da rizosfera e raiz de *P. atratum* que tiveram melhor desempenho nos ensaios *in vivo*, podemos observar uma maior proximidade entre certas linhagens (como Bac 137 e *Microbacterium* spp. 183 MK521307) e um certo distanciamento entre outras (Bac 4 e Bac 76, *Enterobacter* spp. 103 MK521286 e *Enterobacter* spp. 110 MK521293) (figura 12). Isso pode ser explicado devido ao fato de que as mesmas espécies de bactérias podem ser encontradas habitando a rizosfera de diferentes espécies de *Paspalum*, corroborando a teoria de ausência de especificidade proposta por Amaral e colaboradores (2021) e, além disso, várias espécies rizobacterianas pertencentes ao mesmo gênero podem ser classificadas como RPCV (HASAN et al., 2024).

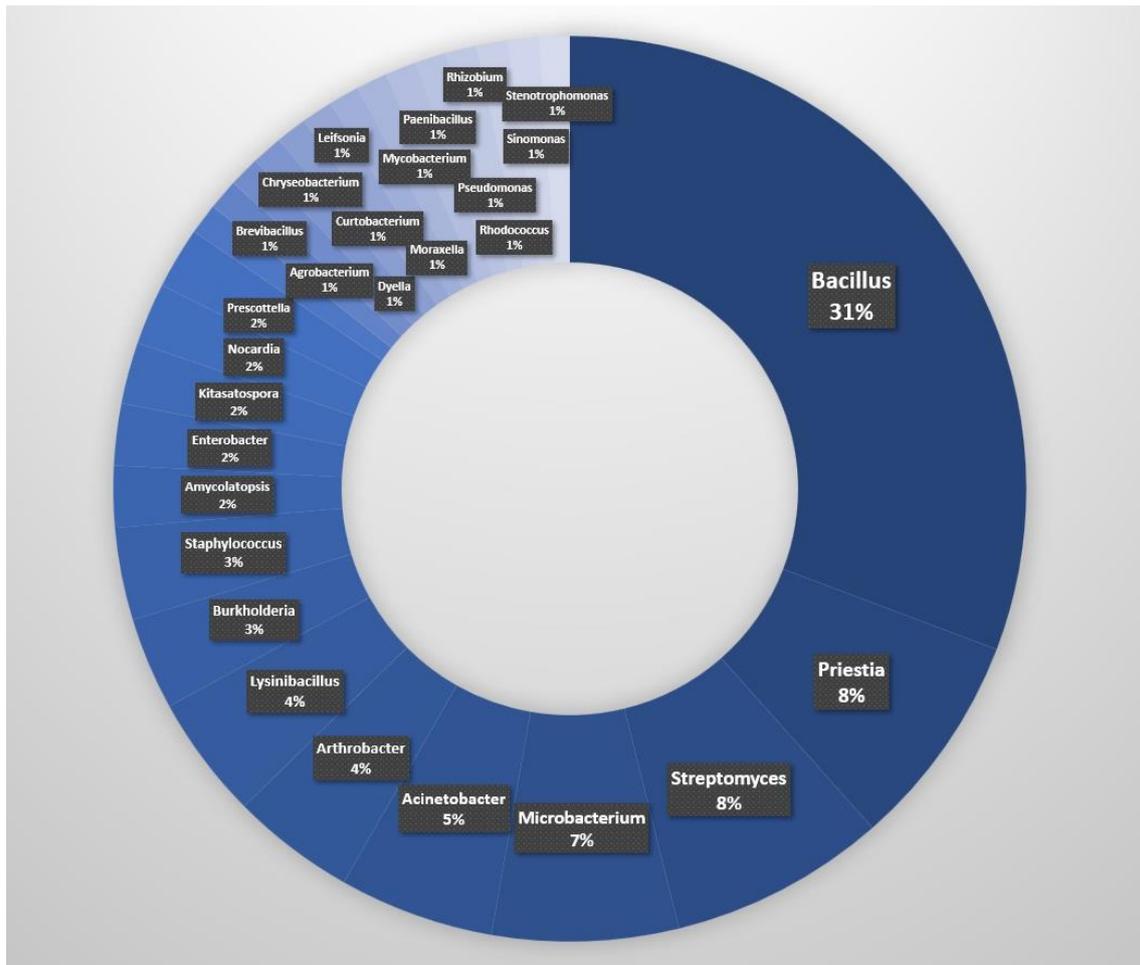


Figura 11. Proporção dos gêneros de RPCV associadas à *P. vaginatum*. Fonte: próprio autor.



**Figura 12.** Dendrograma da biodiversidade de rizobactérias associadas à *Paspalum vaginatum*, com seqüências de comparação. Fonte: próprio autor.

#### 4.6 Ensaio de promoção de crescimento vegetal *in vivo*

Os resultados da análise da determinação de massa seca dos tratamentos e controle para *P. vaginatum* são apresentados na tabela 3.

**Tabela 3** Médias da pesagem (em gramas) da biomassa seca de partes vegetais relativas aos tratamentos e ao controle utilizados *Paspalum vaginatum*.

Tratamento	Raíz	Parte aérea
Controle	2.93a	2.56a
BiomaPhos®	2.55a	1.79a
29 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	3.16a	2.35a
34 ( <i>Priestia</i> sp./ <i>Bacillus</i> sp.)	3.03a	2.38a
115 ( <i>Streptomyces</i> sp.)	3.29a	2.10a
127 ( <i>Dyella</i> sp.)	3.27a	2.33a
139 ( <i>Rhizobium</i> sp./ <i>Agrobacterium</i> sp.)	3.60a	2.16a

Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer.

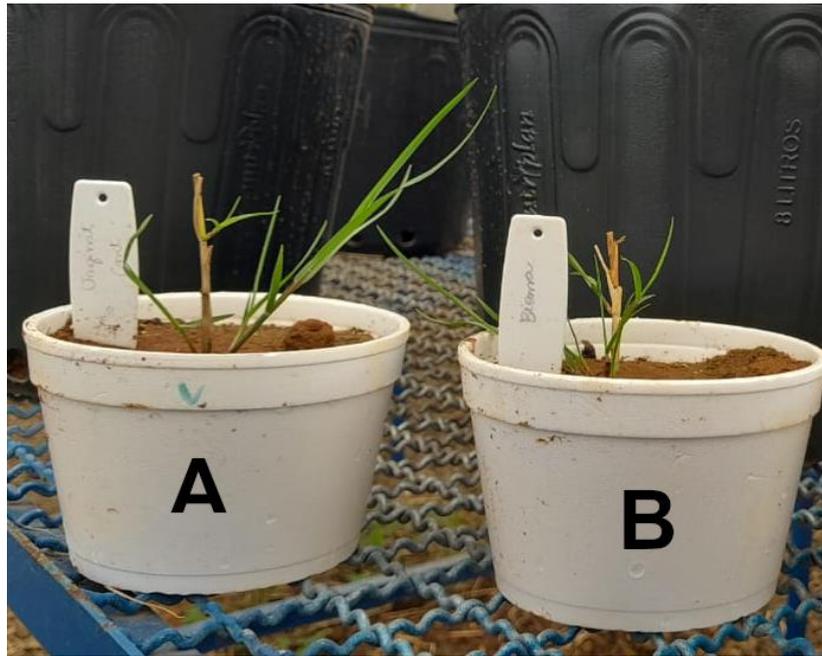
O BiomaPhos® apresentou as menores médias de massa seca de raiz e de parte aérea (2,55 g e 1,79 g, respectivamente) (figura 13). Embora a diferença não seja significativa ( $p < 0.05$ ), este fato pode ser um indicativo de que as plantas do gênero *Paspalum* podem não reconhecer as duas cepas de *Bacillus* utilizadas na formulação do bioproduto como bactérias benéficas (TEIXEIRA et al., 2019). O solo é um ambiente altamente complexo e possui uma capacidade significativa de tamponamento em relação aos fatores bióticos, o que pode atenuar os impactos da introdução de novos organismos (MENDES & REIS-JÚNIOR, 2003).

Os tratamentos com inóculos rizobacterianos também apresentaram maiores médias de peso seco de raiz em relação ao controle, porém, essas médias não foram significativamente diferentes. Todos os isolados produziram compostos indólicos (29 (*Pseudomonas* sp.) = 23,38 mg.L<sup>-1</sup>; 34 (*Priestia* sp./*Bacillus* sp.) = 42,16 mg.L<sup>-1</sup>; 115 (*Streptomyces* sp.) = 27,16 mg.L<sup>-1</sup>; 127 (*Dyella* sp.) = 13,89 mg.L<sup>-1</sup> e 139 (*Rhizobium* sp./*Agrobacterium* sp.) = 57,38 mg.L<sup>-1</sup>), dentre os quais há fitormônios capazes de modular a fisiologia das plantas, como a auxina ácido-3-indol acético, que promove desenvolvimento radicular (TAIZ et al., 2017). As plantas empregam estratégias de distribuição de recursos para gerenciar seu crescimento e, dependendo das condições

em que se encontram, pode haver diferença entre as respostas destinadas à parte aérea e à parte subterrânea (HERMANS et al. 2006). Amaral e colaboradores (2021) estudaram RPCV isoladas e inoculadas em espécies de *Paspalum* sp. e linhagens de *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Rhizobium* sp. foram capazes de aumentar o peso seco de raiz das plantas quando comparadas ao controle.

Um estudo de Zhao e colaboradores (2021) mostrou que a inoculação de linhagens de *Enterobacter* sp. isoladas de *P. vaginatum* aumentou a taxa de germinação e o comprimento das raízes em *Cynodon dactylon*, também uma gramínea da família Poaceae, sob estresse salino. De Moraes (2021) relatou a inoculação de linhagens de *Enterobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. isoladas de *Paspalum rojasii* aumentando o comprimento radicular e o peso seco de raiz quando comparadas ao controle em *Paspalum notatum*.

As RPCV podem ser aplicadas, dentre vários, em dois cenários especiais: (1) em cultivo orgânico sem a presença de fertilizantes químicos, atuando no aumento da concentração de nutrientes no solo e (2) em cultivo extensivo em conjunto com esses fertilizantes, de modo a diminuir a quantidade aplicada e aumentar sua eficiência (BHARDWAJ et al, 2023; HASAN et al., 2024). Além disso, podem ser isoladas de uma planta e serem aplicadas em outra espécie vegetal também causando efeitos benéficos, desde que consiga passar pelo efeito de “tamponamento” do ambiente (MENDES & REIS-JÚNIOR, 2003; SUN et al., 2024). Nesse contexto, uma possibilidade interessante é também explorar o efeito destes isolados rizosféricos por mais tempo e em outras culturas agrícolas de interesse econômico, principalmente aqueles onde o BiomaPhos® apresenta efeitos significativos, visto que eles apresentaram desempenho estatisticamente semelhante ao de um inoculante comercial e demonstraram potencial para promover o crescimento vegetal *in vitro*.



**Figura 13** Ensaio de promoção de crescimento em *Paspalum vaginatum* após 10 dias do plantio das sementes. **A:** controle negativo; **B:** controle positivo (BiomaPhos®).

## 5. CONCLUSÕES

Dos 145 isolados rizobacterianos avaliados para mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento vegetal, oito (5,5% do total) (4, 29, 34, 72, 76, 115, 127 e 139) confirmaram potencial para promoção de crescimento de forma direta *in vitro* (FBN, SFI e AIA) e oito (5,5% do total) (17, 84, 111, 115, 125, 133, 135 e 141) confirmaram potencial de promoção de crescimento vegetal indireto *in vitro* por meio de antagonismo frente a *Bipolaris* sp. e *Colletotrichum* sp. sendo, assim, estas bactérias possuem interessante potencial para ensaios *in vivo* de biocontrole de fungos e como bioestimulante.

São gêneros associados a rizosfera de *P. vaginatum*: *Bacillus*, *Priestia*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Lysinibacillus*, *Burkholderia*, *Staphylococcus*, *Amycolatopsis*, *Enterobacter*, *Kitasatospora*, *Nocardia*, *Prescottella*, *Agrobacterium*, *Brevibacillus*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Dyella*, *Leifsonia*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sinomonas* e *Stenotrophomonas*.

A inoculação de rizobactérias em *P. vaginatum* gerou efeito estatisticamente similar ao inoculante comercial BiomaPhos® e ao controle em relação as médias de biomassa seca de raiz, sem efeitos deletérios. Estudos com essas bactérias podem ser realizados em outras condições de nutrição e em diferentes espécies vegetais para uma melhor compreensão de seu potencial como RPCV.

## 6. REFERÊNCIAS

ABGL – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA GRAMA LEGAL. Mercado da Gramicultura no Brasil. Disponível em: <https://gramalegal.com/mercado-da-gramicultura-no-brasil>. Acesso em 29 de agosto de 2024.

ACUÑA, C. A. et al. (2019) Reproductive systems in *Paspalum*: Relevance for germplasm collection and conservation, breeding techniques and adoption of released cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 1377. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01377>

AHEMAD, M. & KIBRET, M. (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>

ALIZADEH, A. et al. (2022) New species of *Colletotrichum* from wild *Poaceae* and *Cyperaceae* plants in Iran. *Mycologia*, 114(1), 89-113. <https://doi.org/10.1080/00275514.2021.2008765>

AL-SADI, A. M. (2021) *Bipolaris sorokiniana*-induced black point, common root rot, and spot blotch diseases of wheat: A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 584899. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.584899>

AMARAL, M. B., RIBEIRO, T. G., ALVES, G. C., COELHO, M. R. R., MATTA, F. D. P., BALDANI, J. I., & BALDANI, V. L. D. (2021) The occurrence of rhizobacteria from *Paspalum* genotypes and their effects on plant growth. *Scientia Agricola*, 79. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2020-0240>

ANDRADE, P. H. M. et al. (2023) 16S metabarcoding analysis reveals the influence of organic and conventional farming practices on bacterial communities from the rhizospheric of *Coffea arabica* L. *Brazilian Journal of Biology*, 83, e274070. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.274070>

ANJOS, J., CHARCHAR, M. J., TEIXEIRA, R. N., & ANJOS, S. S. (2004) Ocorrência de *Bipolaris maydis* causando mancha foliar em *Paspalum atratum* cv. Pojuca no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 656-658. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582004000600010>

ARAÚJO, R. M., ARAÚJO, A. S. F. D., NUNES, L. A. P. L., & FIGUEIREDO, M. D. V. B. (2014) Resposta do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio. *Ciência Rural*, 44, 1556-1560. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130355>

AZEVEDO, J. L. DE et al. (2018) *Biotecnologia microbiana ambiental*. Maringá: Eduem, 331 p. ISBN 978-85-7628-734-6.

BARKA, E. A. et al. (2016) Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00019-15>

BARRATT, B. I. P., MORAN, V. C., BIGLER, F., & VAN LENTEREN, J. C. (2018) The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. *BioControl*, 63, 155-167. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9831-y>

BATISTA, B. D., LACAVA, P. T., FERRARI, A., TEIXEIRA-SILVA, N. S., BONATELLI, M. L., TSUI, S., MONDIN, M., KITAJIMA, E. W., PEREIRA, J. O., AZEVEDO, J. L., QUECINE, M. C. (2018a) Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. *Microbiological Research*, 206, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.007>

BATISTA, B. D., QUECINE-VERDI, M. C., LACAVAL, P. T. (2018b) Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por endófitos e rizobactérias. In: João Lúcio Azevedo, João Alencar Pamphile, Maria Carolina Quecine-Verdi, Paulo Teixeira Lacava. (Org.) Biotecnologia Microbiana Ambiental. 1ed. Maringá: Eduem, 2018, 1, 105-124. ISBN: 9788576287346

BATISTA, L. A. R., GODOY, R., & REGITANO NETO, A. (1999) Recursos Genéticos de Forrageiras do Gênero *Paspalum* na Embrapa Pecuária Sudeste. In A. S. da Mariante & P. G. Bustamante (Eds.), Simpósio de Recursos Genéticos Para América Latina e Caribe – SIRGEALC. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), 2, 1-6.

BATISTA, L. A. R., & GODOY, R. (2000) Caracterização preliminar e seleção de germoplasma do gênero *Paspalum* para produção de forragem. Revista Brasileira de Zootecnia, 29(1), 23-32. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982000000100004>

BEGAM, Mst. M. et al. (2017) Native salt-tolerant grass species for habitat restoration, their acclimation and contribution to improving edaphic conditions: a study from a degraded mangrove in the Indian Sundarbans. Hydrobiologia, 803(1), 373–387. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3320-2>

BERNARDI, A. C. de C., CARDOSO, R. D., SOUZA, F. H. D. de. (2011) Produção de *Paspalum regnellii* em função da calagem e adubação com fósforo em três classes de solo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 33, Uberlândia. Solos nos biomas brasileiros: sustentabilidade e mudanças climáticas. Anais... Uberlândia: SBCS.

BERRAQUERO, F. R., BAYA, A. M., CORMENZANA, A. R. (1976) Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. Ars Pharmaceutica, 17(4), 399–406. Disponível em: <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/24869>

BHARDWAJ, I., KUMAR, V., & VERMA, R. (2023) Impact of vermicompost and Rhizobacteria in organic agriculture on plant growth and soil health: A review. Journal of Eco-Friendly Agriculture, 18(2), 219-229. Doi: 10.5958/2582-2683.00041.2

BHATT, K., SUYAL, D. C., KUMAR, S., SINGH, K., & GOSWAMI, P. (2022) New insights into engineered plant-microbe interactions for pesticide removal. Chemosphere, 309, 136635. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136635>

BOCCOLINI, P.M., BOCCOLINI, C.S., CHRISMAN, J.R., KOIFMAN, R.J., MEYER, A. (2017) Non-Hodgkin lymphoma among Brazilian agricultural workers: A death certificate case-control study. Arch Environ Occup Health, 72(3), 139-144. doi: 10.1080/19338244.2016.1179167.

BOUBEKRI, K., SOUMARE, A., MARDAD, I., LYAMLOULI, K., OUHDOUCH, Y., HAFIDI, M., & KOUISNI, L. (2022) Multifunctional role of *Actinobacteria* in agricultural production sustainability: A review. Microbiological Research, 261, 127059. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127059>

BREUNINGER, J. M., WELTERLEN, M. S., AUGUSTIN, B. J., CLINE, V., & MORRIS, K. (2013) The turfgrass industry. Turfgrass: Biology use and management, 56, 37-103. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr56.c2>

BRIC, J. M., BOSTOCK, R. M., SILVERSTONE, S. E. (1991) Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 535-538. <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991>

BRITO, M. V. D. et al. (2022) Biologically active volatile organic compounds (VOCs) produced by rhizospheric actinobacteria strains inhibit the growth of the phytopathogen *Colletotrichum musae*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 33, 1172-1189. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220037>

CATTELAN, A. J. (1999) Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal. Londrina: Embrapa Soja. Documentos, 139, 36p. ISSN: 1516-781X.

CAVALLARI, M. M. (2020) Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum*: Embrapa Pecuária Sudeste. In: PADUA, J. G., ALBUQUERQUE, M. do S. M., MELLO, S. C. M. de (Ed.). Bancos e coleções de germoplasma da Embrapa: conservação e uso. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. ISSN: 0102-0110.

CHAKRAVORTY, S., HELB, D., BURDAY, M., CONNELL, N., & ALLAND, D. (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>

CHANDRAN, H., MEENA, M., AND SWAPNIL, P. (2021) Plant growth-promoting rhizobacteria as a green alternative for sustainable agriculture. *Sustainability*, 13, 10986. doi: 10.3390/su131910986

CHARCHAR, M. D. A., DOS ANJOS, J. R. N., DE ANDRADE, R. P., FERNANDES, F., & FERNANDES, C. (2004) Doenças de *Arachis forrageiro* no Distrito Federal. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 18p. ISSN: 1676-918X.

CHARCHAR, M. J., ANJOS, J. R. N. D., SILVA, M. S., & SILVA, W. A. D. M. (2008) Mancha foliar em capim-elefante no Cerrado do Brasil Central causada por *Bipolaris maydis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 1637-1639. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008001100025>

CHASE, A. (1929) The North American species of *Paspalum*. In: *Systematic plant studies. Contributions from the United States National Herbarium*. Washington, DC: Government Printing Office, 28, 1-310.

CHAUDHARY, P., AGRI, U., CHAUDHARY, A., KUMAR, A., & KUMAR, G. (2022) Endophytes and their potential in biotic stress management and crop production. *Frontiers in Microbiology*, 13, 933017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.933017>

CHAUHAN, B. S. (2020) Grand challenges in weed management. *Frontiers in Agronomy*, 1, 3. <https://doi.org/10.3389/fagro.2019.00003>

CHEN, J. H. et al. (2020) Characterization of volatile organic compounds emitted from endophytic *Burkholderia cenocepacia* ETR-B22 by SPME-GC-MS and their inhibitory activity against various plant fungal pathogens. *Molecules*, 25(17), 3765. <https://doi.org/10.3390/molecules25173765>

CORRÊA, L.A., HAAG, H.P. (1993) Níveis críticos de fósforo para o estabelecimento de gramíneas forrageiras em Latossolo Vermelho-Amarelo, álico: II Experimento de Campo. *Scientia Agrícola*, 50, 109-116. <https://doi.org/10.1590/S0103-90161993000100015>

CROUCH, J. A., & BEIRN, L. A. (2009) Anthracnose of cereals and grasses. *Fungal Diversity*, 39, 19.

DE MATOS FILHO, A. M., DIAS, C. E. B., DO AMARAL, C. A. G., REGO, L. G. P., DA SILVA, R. A. L., DE LIMA FILHO, S. F., & DA SILVA MARQUES, M. L. (2024) Levantamento georeferenciado de doenças fungicas em milho para ensilagem. *Contribuciones a las Ciencias Sociales*, 17(1), 3015-3022. <https://doi.org/10.55905/revconv.17n.1-180>

DE MORAES, A. C. P. (2021) Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas e rizosféricas de *Paspalum* spp. e nanopartículas de sílica para promoção de crescimento vegetal. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

DE MORAES, A. C. P., LISBOA, P. H. G., DA SILVA RIBEIRO, L., DE CAMARGO, E. R., & LACAVAL, P. T. (2023) Plant growth-promoting microbes and nanoparticles: Biotechnological potential in agrobiological systems. In *Microbial Inoculants*, Academic Press, 183-206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99043-1.00014-1>

DE PAULA, A. F. et al. (2022) Endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and its potential for plant growth promotion with different phosphate sources. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.884716>

DEPETRIS, M. B., ACUÑA, C. A., GUTIERREZ, S., MARCÓN, F., & FELITTI, S. A. (2020) Fungal endophyte diversity in *Paspalum* and effects on plant growth. *Grass and Forage Science*, 75(3), 316-325. <https://doi.org/10.1111/gfs.12494>

DÖBEREINER, J., BALDANI, V. L. D., BALDINI, J. I. (1995) Como Isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-SPI. 60p. ISBN: 85-85007-65-6

DUCA, D., LORV, J., PATTEN, C. L., ROSE, D., & GLICK, B. R. (2014) Indole-3-acetic acid in plant-microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 85-125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>

DUNCAN, R. R. (1997) Environmental compatibility of seashore *Paspalum* (saltwater couch) for golf courses and other recreational uses. II. Management protocols. *International Turfgrass Society Research Journal*, 8, 1216-1229.

DUNCAN, R. R., & CARROW, R. N. (2000) *Seashore Paspalum: The environmental turfgrass*. John Wiley & Sons, Hoboken, 4.

DUNCAN, R. R., CASLER, M. (2003) *Seashore Paspalum (Paspalum vaginatum Swartz)*. Turfgrass biology, genetics and breeding. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, p. 295-307. ISBN: 1-57504-141-3.

DUNCAN, R. R., & CARROW, R. N. (2005) Managing seashore *Paspalum* greens. *Golf Course Management*, 73(2), 114-118.

ETESAMI, H., ALIKHANI, H. A., HOSSEINI, H. M. (2015) Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*, 2, 72-78. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.02.008>

FERNANDES, A. C. V., LISBOA, P. H. G., ANDRADE, P. D., VIGNA, B. B. Z., NOGUEIRA, S. R., FÁVERO, A. P., & LACAVAL, P. T. (2023) Bactérias endofíticas associadas a *Paspalum vaginatum* Swartz com potencial para promoção de crescimento vegetal e biocontrole. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 6(2), 1071-1089. Doi: 10.34188/bjaerv6n2-010.

FREIRE, C., KOIFMAN, R.J., KOIFMAN, S. (2015) Hematological and hepatic alterations in Brazilian population heavily exposed to organochlorine pesticides. *Journal of Toxicology and Environment Health*, part A, 78(8), 534-548. doi: 10.1080/15287394.2014.999396.

GASPARETTO, B. F., FRANKE, L. B., ANDRADE, C. C. L., DALBOSCO, M., DUARTE, V., MOREIRA, S. I., & ALVES, E. (2017) First Report of *Bipolaris micropus*, *Curvularia geniculata*, *Epicoccum sorghinum* and *Fusarium incarnatum* on *Paspalum guenoarum* seeds in Rio Grande do Sul, Brazil. *Plant Disease*, 101(9), 1679-1679. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-16-1746-PDN>

GASPARETTO, B. F., RADUNZ, L. L., LOPES, R. R., FRANKE, L. B., & MARTINELLI, J. A. (2021) Fungos associados com sementes de *Paspalum guenoarum*: seus impactos na fisiologia e controle. *Ciência Rural*, 51, e20200497. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200497>

GLICK, B. R. (2012) *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Scientifica, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

HALL, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, 41, 95-98.

HARDOIM, P. R. et al. (2015) The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3), 293-320. <https://doi.org/10.1128/mubr.00050-14>

HASAN, A., TABASSUM, B., HASHIM, M., & KHAN, N. (2024) Role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as a plant growth enhancer for sustainable agriculture: A review. *Bacteria*, 3(2), 59-75. <https://doi.org/10.3390/bacteria3020005>

HASSAN, M. K., MCINROY, J. A., & KLOEPPER, J. W. (2019) The interactions of rhizodeposits with plant growth-promoting rhizobacteria in the rhizosphere: a review. *Agriculture*, 9(7), 142. <https://doi.org/10.3390/agriculture9070142>

HAZARIKA, S. N. & THAKUR, D. (2020) *Actinobacteria*. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*, 443-476. doi:10.1016/b978-0-12-823414-3.00021-6

HERMANS C, HAMMOND JP, WHITE PJ, VERBRUGGEN N. (2006) How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science*, 11, 610-617. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.10.007>

HUSEN, E. (2003) Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities *in vitro*. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, 4(1), 27-31.

HYDE, K. D. et al. (2009) *Colletotrichum*—names in current use. *Fungal Diversity*, 39(1), 147-182.

JEGAR, M., & PLUMBLEY, R. A. (1990) The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*, 39, 343-366.

KAARI, M., MANIKKAM, R., ANNAMALAI, K. K., & JOSEPH, J. (2023) Actinobacteria as a source of biofertilizer/biocontrol agents for bio-organic agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, 134(2), lxac047. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac047>

KAUSHAL, M., & WANI, S. P. (2016) Rhizobacterial-plant interactions: strategies ensuring plant growth promotion under drought and salinity stress. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 231, 68-78. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.06.031>

KIM, Y. S. et al. (2021) Characterization of *Bacillus velezensis* AK-0 as a biocontrol agent against apple bitter rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Scientific Reports*, 11(1), 626. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80231-2>

KOERITZ, E. J., & STIER, J. C. (2009) Nitrogen rate and mowing height effects on velvet and creeping bentgrasses for low-input putting greens. *Crop science*, 49(4), 1463-1472. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.09.0575>

KUMAR, A., KUMAR, R., KUMARI, M., & GOLDAR, S. (2020) Enhancement of plant growth by using PGPR for a sustainable agriculture: a review. *International Journal of Current Microbiology Applied Science*, 9(2), 152-165. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2020.902.019>

KUMAR, R. R., & JADEJA, V. J. (2016) Isolation of actinomycetes: A complete approach. *International Journal of Current Microbiology Applied Science*, 5(5), 606-618. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.505.062>

KUCEY, R. M. N., JANZEN, H. H., & LEGGETT, M. E. (1989) Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in agronomy*, 42, 199-228. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60525-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60525-8)

LACAVAL, P. T., AZEVEDO, J. L. (2013) Endophytic bacteria: A biotechnological potential in agrobiological system. In: *Bacteria in agrobiological: crop productivity*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-44. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-37241-4_1)

LACAVAL, P. T., MELO, I. S., PEREIRA, J. O. (2018) Controle biológico e simbiótico de insetos-pragas e doenças por micro-organismos endofíticos. In: *Azevedo, J. A., Pamphile, J. A., Quecine-Verdi, M. C., Lacava, P. T. (Org.). Biotecnologia Microbiana Ambiental*. 1. ed. Maringá: Eduem, 83-104.

LACAVAL, P. T., MACHADO, P. C., DE ANDRADE, MARQUES, P. H. (2021) Phosphate solubilization by endophytes from the tropical plants. In: *Sustainable Development and Biodiversity*. 26ed. Springer Nature Switzerland AG: Springer International Publishing, 3, 207-226. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-65447-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-65447-4_9)

LACAVAL, P.T., BOGAS, A.C, CRUZ, F.P.N. (2022) Plant growth promotion and biocontrol by endophytic and rhizospheric microorganisms from the tropics: a review and perspectives. *Frontiers In Sustainable Food Systems*, 6, 796113. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.796113>

LIU, T., ZHAI, C., ZHANG, J., & COULTER, J. A. (2021) Genetic diversity and promotion plant growth of culturable endophytic diazotrophs associated with seashore paspalum cultivars. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 49(2-3), 243-257. <https://doi.org/10.1080/01140671.2021.1893193>

LIU, Y. et al. (2016) Identification and antagonistic activity of endophytic bacterial strain *Paenibacillus* sp. 5 L8 isolated from the seeds of maize (*Zea mays* L., Jingke 968). *Annals of Microbiology*, 66, 653-660. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1150-x>

LOCH, D. S., BARRETT-LENNARD, E., & TRUONG, P. (2003) Role of salt tolerant plants for production, prevention of salinity and amenity values. In: Proceedings of the 9th National Conference on the Productive Use and Rehabilitation of Saline Land (PURSL), Yeppoon, Queensland, Australia, 1-16.

LOPES, C. V. A., & ALBUQUERQUE, G. S. C. D. (2018) Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde em debate*, 42, 518-534. <https://doi.org/10.1590/0103-1104201811714>

MACHADO, P. C., DE ANDRADE, P. H. M., JUNIOR, E. M., CARAZZOLLE, M. F., DE CARVALHO, L. M., DA CUNHA, A. F., & LACAIVA, P. T. (2024) Caracterização de rizobactérias associadas ao pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) por análise metagenômica: Characterization of rhizobacteria associated with physic nut (*Jatropha curcas* L.) by metagenomic analysis. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, 7(1), 173-190. <https://doi.org/10.34188/bjaerv7n1-014>

MACHADO, R. G., DE SÁ, E. L. S., BRUXEL, M., GIONGO, A., DA SILVA SANTOS, N., & NUNES, A. S. (2013) Indoleacetic acid producing rhizobia promote growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). *International Journal of Agriculture & Biology*, 15(5). ISSN: 1814–9596.

MARCOS, M. F., JANK, L., FERNANDES, C. D., VERZIGNASSI, J. R., MALLMANN, G., QUEIRÓZ, C. D. A., & BATISTA, M. V. (2015) Reação à *Bipolaris maydis*, agente causal da mancha foliar, em híbridos apomíticos de *Panicum maximum*. *Summa Phytopathologica*, 41, 197-201. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2078>

MARIANO, R. L. R. (1993) Métodos de seleção *in vitro* para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 1, 369-409.

MCDUGALL, P. (2017) The global agrochemical market trends by crop. In: Proceedings of the 11th China International Forum on Development of Pesticide Industry, Shanghai, China.

MENDES, I. D. C., & DOS REIS JÚNIOR, F. B. (2003) Microrganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados: Documentos, 85, 26 p. ISSN: 1517-5111.

MONTEIRO, P., BORBA, M. P., & VAN DER SAND, S. T. (2017) Evaluation of the antifungal activity of *Streptomyces* sp. on *Bipolaris sorokiniana* and the growth promotion of wheat plants. *The Journal of Agricultural Science*, 9(12), 229. Doi:[10.5539/JAS.V9N12P229](https://doi.org/10.5539/JAS.V9N12P229)

MORANDI, M. A. B., PAULA JÚNIOR, T. J., BETTIOL, W., & TEIXEIRA, H. (2009) Controle biológico de pragas, doenças e plantas invasoras. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 30(251), 73-82.

NATIONAL TURFGRASS FEDERATION. (2009) The national turfgrass research initiative. National Turfgrass Federation, Beltsville, MD. <http://turfresearch.org/pdf/turfinitiative.pdf>. Acessado em 21 de maio de 2024.

NGUMBI, E., & KLOEPPER, J. (2016) Bacterial-mediated drought tolerance: current and future prospects. *Applied Soil Ecology*, 105, 109-125. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.04.009>

O'BRIEN, P. A. (2017) Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology*, 46, 293-304. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>

OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. (2020) Viabilidade técnica e econômica do BiomaPhos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja. Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 210. 20p. ISSN 1679-0154.

OMOTE, H. de S. G., CASTRO, L. M. de, GRACIANO, V. A., SANTOS, R. C. DOS, SOUZA, J. D. F. de, VAZ, A. P. A., ARAUJO, A. R. de, SALMAN, A. K. D., BUENO, L. G., KOPP, M. M., ANTONIO, R. P., EUCLIDES, V. P. B., GUARDA, V. D. A., SANTOS, P. M. (2021) Monitoramento tecnológico de cultivares de forrageiras no Brasil. Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 139, 34 p. ISSN: 1980-6841.

PERROT-RECHENMANN, C. (2010) Cellular responses to auxin: division versus expansion. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2(5), a001446. doi: 10.1101/cshperspect.a001446

PEZZOPANE, C. D. G., LIMA, A. G., DA CRUZ, P. G., BELONI, T., FÁVERO, A. P., & SANTOS, P. M. (2017) Evaluation and strategies of tolerance to water stress in *Paspalum* germplasm. Tropical Grasslands-Forrajeras Tropicales, 5(3), 153-162. [https://doi.org/10.17138/tgft\(5\)153-162](https://doi.org/10.17138/tgft(5)153-162)

PRAEG, N., PAULI, H., & ILLMER, P. (2019) Microbial diversity in bulk and rhizosphere soil of *Ranunculus glacialis* along a high-alpine altitudinal gradient. Frontiers in Microbiology, 10, 447734. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01429>

QUIROGA, E. N., SAMPIETRO, A. R., VATTUONE, M. A. (2001) Screening antifungal activities of selected medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 74(1), 89–96. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00350-0](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00350-0)

RANI, L. et al. (2021) An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. Journal of Cleaner Production, 283, 124657. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124657>

RANJANI, A., DHANASEKARAN, D., GOPINATH, P.M. (2016) An Introduction to Actinobacteria. In: Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications, InTech. Doi: 10.5772/62329

RASOOL, A., MIR, M. I., ZULFAJRI, M., HANAFIAH, M. M., UNNISA, S. A., & MAHBOOB, M. (2021) Plant growth promoting and antifungal asset of indigenous rhizobacteria secluded from saffron (*Crocus sativus* L.) rhizosphere. Microbial Pathogenesis, 150, 104734. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104734>

RECHCIGL, J. E. (2018) Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control: CRC Press. ISBN 978-1-315-89272-6.

RICHARDSON, A. E. (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. Functional Plant Biology, 28(9), 897-906. <https://doi.org/10.1071/PP01093>

RICHARDSON, A.E. (1994) Soil microorganisms and phosphorus availability. In Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems, CSIRO Information Services: Melbourne, Australia, 50–62. ISBN: 978-0-643-05599-5

ROSENBLUETH, M., MARTÍNEZ-ROMERO, E. (2006) Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant-Microbe Interactions, 19(8), 827-837. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0827>

SANTOYO, G., DEL OROZCO-MOSQUEDA, M. C., GOVINDAPPA, M. (2012) Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. Biocontrol Science and Technology, 22(8), 855-872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>

SHAH, A. et al. (2021) PGPR in agriculture: A sustainable approach to increasing climate change resilience. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 667546. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667546>

SHARMA, P. et al. (2022) Characterization of actinobacteria from wheat seeds for plant growth promoting traits and protection against fungal pathogens. *Journal of Basic Microbiology*, 63(3-4), 439-453. <https://doi.org/10.1002/jobm.202200259>

SHIRLING, E. T., & GOTTLIEB, D. (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313-340. ISSN: 0020-7713.

SILVA, G. D. C., KITANO, I. T., RIBEIRO, I. A. D. F., & LACAVA, P. T. (2022) The potential use of actinomycetes as microbial inoculants and biopesticides in agriculture. *Frontiers in Soil Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fsoil.2022.833181>

SILVA FILHO, G. N., VIDOR, C. (2000) Solubilização de fóstatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24(2), 311–319. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832000000200008>

SOUZA, F. H. D. D., GUSMÃO, M. R., CAVALLARI, M. M., & BARIONI Jr, W. (2020) Characterization of the potential of native grasses for use as lawns. *Ornamental Horticulture*, 26, 109-120. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v26i1.2067>

SUN, W., SHAHRAJABIAN, M.H., SOLEYMANI, A. (2024) The Roles of Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR)-Based Biostimulants for Agricultural Production Systems. *Plants*, 13, 613. <https://doi.org/10.3390/plants13050613>

SUYAL, D. C., SONI, R., SINGH, D. K., & GOEL, R. (2021) Microbiome change of agricultural soil under organic farming practices. *Biologia*, 76(4), 1315-1325. <https://doi.org/10.2478/s11756-021-00680-6>

TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I. M., & MURPHY, A. (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6ed. Artmed Editora. Porto Alegre, 858p.

TAMURA, K., & NEI, M. (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>

TAURIAN, T. et al. (2010) Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and Soil*, 329, 421-431. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0168-x>

TEIXEIRA, P., COLAIANNI, N., FITZPATRICK, C., DANGL, J. (2019) Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. *Current Opinion in Microbiology*, 49, 7-17. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.08.003>

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., & GIBSON, T. J. (1994) CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>

TRENHOLM, L. E., CARROW, R. N., & DUNCAN, R. R. (2001) Wear tolerance, growth, and quality of seashore *Paspalum* in response to nitrogen and potassium. *HortScience*, 36(4), 780-783.

VERMA, S. C., LADHA, J. K., TRIPATHI, A. K. (2001) Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91(2-3), 127–141. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00333-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00333-9)

VILLA-RODRIGUEZ, E., PARRA-COTA, F., CASTRO-LONGORIA, E., LÓPEZ-CERVANTES, J., & DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S. (2019) *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological Control*, 132, 135-143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>

WANG, H., LIU, R., YOU, M. P., BARBETTI, M. J., & CHEN, Y. (2021) Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): Role of bacterial diversity. *Microorganisms*, 9(9), 1988. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091988>

WANG, Y., YANG, D., & YU, Z. (2023) New lactones produced by *Streptomyces* sp. SN5431 and their antifungal activity against *Bipolaris maydis*. *Microorganisms*, 11(3), 616. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030616>

WILHELM, C.M., CALSING, A.K. & DA SILVA, L.B. (2015) Assessment of DNA damage in floriculturists in southern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 8182–8189. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3959-4>

XU, Z., WANG, M., DU, J., HUANG, T., LIU, J., DONG, T., & CHEN, Y. (2020) Isolation of *Burkholderia* sp. HQB-1, a promising biocontrol bacteria to protect banana against *Fusarium* wilt through phenazine-1-carboxylic acid secretion. *Frontiers in Microbiology*, 11, 605152. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.605152>

YADAV, M., DUBEY, M. K., & UPADHYAY, R. S. (2021) Systemic resistance in chilli pepper against anthracnose (caused by *Colletotrichum truncatum*) induced by *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Paenibacillus dendritiformis*. *Journal of Fungi*, 7(4), 307. <https://doi.org/10.3390/jof7040307>

YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H., & CHUN, J. (2017) Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 1613-1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>

ZHAO, X. T., CHEN, X. D., LI, Z. J., ZHANG, J. M., & LIU, T. Z. (2021) An evaluation of the effects of the plant endophyte *Enterobacter* on the salt tolerance of bermudagrass. *Acta Prataculturae Sinica*, 30(9), 127. Doi: [10.11686/cyxb2020317](https://doi.org/10.11686/cyxb2020317)

## **CAPÍTULO 2 – EFEITO DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS A *Paspalum vaginatum* NO CRESCIMENTO INICIAL E ESTABELECIMENTO DE *Paspalum regnellii* SOB TRATAMENTO COM DIFERENTES FONTES DE FOSFATO**

### **RESUMO**

O Brasil é líder global na produção e exportação de carne bovina e no mercado forrageiro. A sustentabilidade das pastagens exige manejo adequado para garantir produtividade a longo prazo, o que inclui uma adubação adequada e cuidados para prevenção de doenças. Atualmente, a fertilização com fósforo (P) é realizada, principalmente, por superfosfatos caros de alta solubilidade e eficiência, porém, há a possibilidade de utilização de rochas fosfáticas insolúveis em conjunto com bactérias solubilizadoras de fosfato, aumentando a eficiência e poder residual destes fertilizantes. Além disso, as bactérias podem, também, proteger a planta através do antagonismo à fungos fitopatogênicos. Este trabalho teve como objetivo explorar a utilização de rizobactérias associadas à *Paspalum vaginatum* com potencial de promoção de crescimento vegetal no desenvolvimento inicial e no controle da antracnose em *Paspalum regnellii*, espécie com alto potencial forrageiro, mas que apresenta desafios na germinação e estabelecimento inicial no campo e que é suscetível à antracnose, causada por *Colletotrichum* sp. Cinco isolados rizosféricos isolados de *P. vaginatum*, promissores em testes *in vivo* para fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção de compostos indólicos, foram selecionados para ensaio *in vivo* de promoção de crescimento vegetal em *P. regnellii* em casa de vegetação, utilizando o inoculante comercial BiomaPhos® como controle positivo, em solo misturado a substrato comercial, sem a adição de fertilizantes. As plantas foram analisadas morfológicamente e nutritivamente. Estes mesmos isolados e outras 2 bacterias também solubilizadoras de fosfato foram submetidos a quantificação de P solúvel *in vitro* (QP) a partir de rocha Araxá, rocha Bayovar, supertriplo fosfato (ST) e fosfato de cálcio. As bactérias selecionadas de acordo com o teste QP foram submetidas a ensaio de crescimento inicial em *P. regnellii*, em casa de vegetação, sob tratamentos com adição de diferentes fontes de P. Foram selecionados 7 rizobactérias associadas a *P. vaginatum* que mostraram potencial de atividade antagônica contra *Colletotrichum* sp. *in vitro* para ensaio de biocontrole do mesmo em *P. regnellii*, também em casa de vegetação. As rizobactérias associadas a *P. vaginatum* mostraram efeito positivo na emergência de sementes e estabelecimento inicial de *P. regnellii* quando combinadas com solo calado (calciado) e com adição de ST e em solo calado não fertilizado, com destaque para Bac 5 (*Acinetobacter* sp.). O tratamento com Bac 111

(*Amycolatopsis* sp.) reduziu significativamente a intensidade da antracnose causada por *Colletotrichum* sp. em *P. regnellii*.

Palavras-chave: *Paspalum*, RPCV, Biocontrole

## ABSTRACT

Brazil is a global leader in beef production and export and in the forage market. The sustainability of pastures requires proper management to ensure long-term productivity, which includes adequate fertilization and measures to prevent diseases. Currently, phosphorus (P) fertilization is mainly achieved through the use of expensive, highly soluble, and efficient superphosphates. However, there is the possibility of using insoluble phosphate rocks in conjunction with phosphate-solubilizing bacteria, increasing the efficiency and residual power of these fertilizers. Moreover, bacteria can also protect the plant through antagonism against phytopathogenic fungi. This study aimed to explore the use of rhizobacteria associated with *Paspalum vaginatum* with potential for promoting plant growth in the initial development and control of anthracnose in *Paspalum regnellii*, a species with high forage potential but that presents challenges in germination and initial establishment in the field and is susceptible to anthracnose, caused by *Colletotrichum* sp. Five rhizospheric isolates from *P. vaginatum*, promising *in vivo* tests for biological nitrogen fixation, inorganic phosphate solubilization and production of indole compounds, were selected for *in vivo* plant growth promotion assay in *P. regnellii* in a greenhouse, using the commercial bioinoculant BiomaPhos® as a positive control, in soil mixed with commercial substrate, without the addition of fertilizers. The plants were analyzed morphologically and nutritionally. The same isolates were subjected to *in vitro* quantification of soluble P (QP) from Araxá rock, Bayovar rock, triple superphosphate (ST) and calcium phosphate, with the addition of 2 more solubilizing isolates also associated with the rhizosphere of *P. vaginatum*. The bacteria selected according to the QP test were subjected to an initial growth assay in *P. regnellii*, in a greenhouse, under treatments with the addition of different P sources. Seven rhizobacteria associated with *P. vaginatum* that showed potential antagonistic activity against *Colletotrichum* sp. *in vitro* were selected for biocontrol assay of the same in *P. regnellii*, also in a greenhouse. The rhizobacteria associated with *P. vaginatum* showed a positive effect on the seed emergence and initial establishment of *P. regnellii* when combined with limed soil with the addition of ST and in unfertilized limed soil, with a highlight for Bac 5 (*Acinetobacter* sp.). Bac 111 (*Amycolatopsis* sp.) significantly reduced the intensity of anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. in *P. regnellii*.

Keywords: Paspalum, PGPR, Biocontrol

## 1. INTRODUÇÃO

As pastagens desempenham um papel fundamental na pecuária brasileira, ocupando vastas extensões de terra e fornecendo a base nutricional para um dos setores mais importantes da economia nacional (IBGE, 2019). Com o Brasil destacando-se como líder mundial em exportação e segundo maior produtor de carne bovina e, também, como maior produtor, consumidor e exportador de forrageiras, a relevância das pastagens na produção agropecuária é inegável, movimentando conjuntamente nestes dois mercados mais de 181,4 bilhões de reais por ano (KIST et al., 2019; OMOTE et al., 2021; ABIEC, 2022). Contudo, é necessária a adoção de práticas de manejo sustentáveis para mitigar impactos ambientais, evitando desmatamento desnecessários e garantido a produtividade a longo prazo, visto que, nas queimadas, por exemplo, nutrientes são incorporados ao solo na forma de cinzas, porém, essa alta fertilidade dura pouco tempo (GERHARDSON, 2002).

A questão da fertilidade do solo, particularmente em relação ao fósforo (P), é um aspecto crucial na manutenção da produtividade das pastagens e sua deficiência pode prejudicar o desenvolvimento de plantas jovens (TAIZ & ZEIGER, 2017). Os superfosfatos são reconhecidos por sua rápida solubilidade e alta eficiência agrônômica em comparação com os fosfatos naturais. Embora proporcionem uma resposta biológica mais imediata, esses fertilizantes são mais caros quando comparados aos fosfatos naturais, que podem liberar o P no solo de forma mais gradual, proporcionando efeitos de fertilização por tempo prolongado (RESENDE et al., 2006; MELAMED et al., 2009).

Porém, a dependência de recursos não-renováveis, como os fosfatos naturais, levanta preocupações sobre a sustentabilidade futura da produção agrícola (DIAS & LAJOLO, 2010; STRAATEN, 2010; LACAVALA, MACHADO, ANDRADE, 2021). Se o atual ritmo de utilização de fertilizantes persistir, projeções indicam que as reservas de rocha fosfática estarão esgotadas dentro dos próximos 60 a 90 anos (GRAHAM E VANCE, 2003; CORDELL et al., 2009).

Explorar a implementação de práticas alternativas de menor custo e maior poder residual de manejo de fertilizantes pode aprimorar tanto o uso quanto a eficácia do fertilizante fosfatado. Buscar alternativas é fundamental para tornar a adubação fosfatada mais viável em longo prazo. Recentes estudos têm explorado o potencial de

bactérias solubilizadoras de fosfato para melhorar a disponibilidade de P no solo e sua absorção pelas plantas (OWEN et al., 2015; DE PAULA et al., 2022). Essas bactérias têm a capacidade de converter formas inacessíveis de fósforo em formas disponíveis para as plantas, apresentando-se como uma alternativa promissora para otimizar o uso de fertilizantes fosfatados (STRAATEN, 2010; LI et al., 2023; WANG et al., 2023).

Paralelamente, a seleção e melhoramento de espécies forrageiras, como o gênero *Paspalum*, caracterizado por espécies que apresentam um alto potencial para serem empregadas em pastagens destinadas à produção de carne e leite bovinos e forragem, têm sido objeto de interesse crescente na busca por alternativas mais eficientes e adaptadas às condições locais (ACUÑA et al., 2019; NOVO et al., 2016; ORTIZ et al., 2020). No programa de melhoramento genético de plantas da Embrapa Pecuária Sudeste, destaca-se entre os acessos de *Paspalum* a espécie *P. regnellii* (BGP 215) devido à sua notável capacidade nutritiva para bovinos sob manejo intensivo, excelente produção de biomassa em ambientes otimizados e resistência a áreas alagadas e sombreadas (CRUZ et al., 2006; PRIMAVESI et al., 2008; BARRO et al., 2012; BELONI et al., 2017). No entanto, apesar do potencial nutritivo e das características agrônômicas favoráveis, desafios relacionados à germinação e ao crescimento inicial ainda limitam sua adoção em larga escala (CRUZ et al., 2006; PRIMAVESI et al., 2008; BORTOLIN, 2016).

A adubação fosfatada é crucial para o estabelecimento e manutenção das forrageiras, uma vez que elas respondem de forma significativa a essa prática (REIS et al., 2022). A deficiência de fósforo acarreta distúrbios graves no metabolismo e desenvolvimento das plantas, resultando em crescimento lento, baixa produção de perfilhos e desenvolvimento insuficiente do sistema radicular, o que compromete a produtividade das forrageiras (WERNER, 1986; REIS et al., 2022). Quanto mais breve for o período necessário para estabelecer a pastagem, maior será a utilização eficiente dos recursos disponíveis, pois este processo reduz a competição com plantas invasoras, aumenta a resistência a pragas e doenças, além de promover uma maior produtividade ao longo do ciclo produtivo (DIAS FILHO, 1987; VECHIATO & APARECIDO, 2008; CUNHA, 2015). Conseqüentemente, os prejuízos na produção e qualidade das pastagens devido ao ataque de agentes patogênicos e ao manejo inadequado impactam diretamente na produção de leite e carne, resultando em perdas econômicas significativas.

Além das questões relacionadas à fertilidade do solo e seleção de espécies forrageiras, o controle de insetos-pragas e doenças também desempenha um papel crucial na produtividade das pastagens. O fungo *Colletotrichum* sp. causa a antracnose em gramíneas, gerando necroses e reduzindo a área de fotossíntese, podendo levar a planta à morte (CROUCH & BEIRN, 2009). Já foi relatado em várias espécies de *Paspalum* sp. (CROUCH et al., 2009) e, recentemente, pode ser observado no BAG *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste, em acessos de *Paspalum regnellii* (BGP 215). O uso de inoculantes a base de microrganismos, como RPCV, é uma alternativa sustentável ao controle químico convencional, promovendo o desenvolvimento das plantas e reduzindo os impactos ambientais (LACAVA et al., 2022).

Diante desse contexto, este estudo visa explorar o potencial de rizobactérias solubilizadoras de fosfato e antagonistas ao fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. no estabelecimento e proteção de *P. regnellii*, buscando contribuir para a sustentabilidade e eficiência da produção agropecuária.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 *Paspalum regnellii* Mez**

*Paspalum regnellii* Mez (1917) é uma gramínea perene com desenvolvimento cespitoso de rizomas curtos, pertencente ao grupo informal Virgata, comumente encontrada em regiões tropicais e subtropicais, que tem grande potencial como forrageira, apresentando ótima produção e qualidade de biomassa em ambientes melhorados, elevado teor de proteínas e boa resposta a práticas de irrigação, sombreamento e correção da fertilidade do solo (BATISTA & GODOY, 2004; CRUZ et al., 2006; PRIMAVESI et al., 2008; BARRO et al., 2012; MEIRELLES et al., 2013; BELONI et al., 2017).

Pode chegar a 100 cm de altura em crescimento livre, apresenta forma quadrangular a piramidal de sua inflorescência e antécio fértil de cor castanho-clara (ARAÚJO, 1971; RIGHI GOMES, 1995). Possui talos eretos, glabros com 3 a 5 nós pubescentes; inflorescências em panícula com 6 a 20 racemos de 6 a 10 cm. Mostra boa produção de sementes durante o verão, floresce de novembro a março, dependendo da região em que se encontra, e apresenta citótipo sexual tetraplóide (VARELLA et al., 2009, BARRO, 2011).

Porém, apesar de possuir atributos importantes que a tornam uma opção viável na produção de forragem, ela ainda apresenta desafios que são frequentemente encontrados em espécies do gênero, especialmente no que diz respeito aos estágios de germinação e o lento crescimento inicial, resultando em competição com plantas daninhas, o que pode gerar dúvidas no contexto comercial, já que as espécies são pouco familiares aos criadores de gado (SCHRAUF et al, 1995; ANDERSON et al., 2009; GLISON et al., 2015).

O acesso BGP 215, utilizado neste estudo foi coletado em Itirapina, São Paulo, Brasil, sob a latitude -22.40 e longitude -47.90, a aproximadamente 500 m de altitude, e está depositado no banco de germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*), localizado na Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos, São Paulo, Brasil.

### **2.2 Eficiência do uso de fertilizantes fosfatados e bactérias solubilizadoras de fosfato**

O fósforo (P) é um dos elementos que mais limita a produção vegetal, pois participa de diversos processos moleculares e fisiológicos para o desenvolvimento das plantas (MARSCHNER, 1995). Somando as características de solos tropicais, intemperizados e com baixa fertilidade, com o fato de que o fósforo forma ligações com elementos da fração argila, o que reduz sua disponibilidade para a planta, justifica-se o aumento da frequência da demanda por fertilizantes fosfatados (NOVAIS et al., 2007; FINK et al., 2016).

O P pode ser encontrado em depósitos naturais em todo o mundo, principalmente na forma de rochas. As rochas fosfáticas, predominantes em depósitos sedimentares (cerca de 85% globalmente) e ígneos (aproximadamente 15%), representam a principal fonte viável de fósforo sendo classificadas de acordo com sua solubilidade em água, citrato neutro de amônio (CNA) e ácido cítrico (AC), conforme a legislação brasileira (SOUSA & LOBATO, 2004; SOUZA & FONSECA, 2009).

No contexto agrícola brasileiro, as rochas fosfáticas, predominantemente compostas por apatitas e fosforitas, são amplamente utilizadas. Enquanto as apatitas são de origem vulcânica e extraídas de minas profundas, as fosforitas podem ser de depósitos metamórficos ou sedimentares, extraídas de minas superficiais (SOUZA & FONSECA, 2009). O superfosfato triplo (ST), um fertilizante fosfatado totalmente acidulado, é obtido a partir do tratamento ácido de rochas fosfáticas. Embora os fosfatos solúveis, como o ST, sejam mais produzidos no Brasil devido à sua alta eficiência agronômica, eles têm uma eficácia reduzida ao longo do tempo devido ao processo de "adsorção" ou "fixação", ao contrário dos fosfatos naturais, que se dissolvem lentamente no solo, aumentando gradualmente a disponibilidade de P ao longo do tempo (GOEDERT, 1983; BARRETO et al., 2007).

Cerca de 80% das jazidas de fosfato natural no Brasil são de origem ígnea, apresentando baixo teor de  $P_2O_5$  (SOUZA & FONSECA, 2009). Os fosfatos naturais brasileiros podem ser insolúveis em água, como o fosfato natural de Araxá (AX), que requer um pH em torno de 5,4 para ser disponibilizado (PROCHNOW et al., 2006). Por outro lado, os fosfatos naturais sedimentares de alta reatividade, como o fosfato reativo Bayovar (BYR) do Peru, são insolúveis em água e têm média ou alta solubilidade em AC (BECH et al., 2010).

Os fosfatos naturais são usados como alternativas de menor custo, conseqüentemente o consumo de fontes de fósforo de baixa solubilidade como os fosfatos naturais reativos, tem aumentado (OLIVEIRA et al., 2015). Entretanto, as rochas fosfáticas são recursos não-renováveis e, se o atual ritmo de utilização de fertilizantes persistir, projeções indicam que as reservas de rocha fosfática estarão esgotadas dentro dos próximos 60 a 90 anos (GRAHAM E VANCE, 2003; CORDELL et al., 2009). Na agricultura brasileira, estima-se que cerca de 55% dos fertilizantes fosfatados utilizados sejam importados e, em 2018, os gastos com importação chegaram a 2,5 bilhões de dólares (BRASIL, 2018; SCHUELER et al., 2019). Portanto, é necessária a implantação de novas técnicas agrícolas, que visem um aumento na eficiência do uso dos nutrientes e reduzam a dependência dos mercados internacionais.

Nesse contexto, a modificação microbiológica emerge como uma técnica promissora para aumentar a disponibilidade de fósforo para as plantas. Bactérias solubilizadoras de fosfato podem transformar e disponibilizar o fósforo de várias formas, incluindo o fósforo direto de rochas e o fósforo solúvel que se tornou indisponível no solo (KIM et al., 1998). Diversos gêneros já vêm sendo utilizados em estudos *in vivo* recentes de solubilização de fosfato em culturas de interesse econômico, tais como, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, dentre outros (ADHIKARI et al., 2020; MENDOZA-ARROYO et al., 2020; HE & WAN, 2021; ZHAO et al., 2021).

Um exemplo de sucesso da utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato é o BiomaPhos®, um bioproduto com tecnologia e capital brasileiros da Embrapa Milho e Sorgo, resultado de 20 anos de pesquisa, formado por duas cepas de *Bacillus* (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *B. megaterium* CNPMS B119), que melhora a eficiência do uso do fósforo e beneficiamento das plantas, resultando em ganhos de até 8,9% de produtividade quando aplicado em milho (OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020).

### **2.3 Controle biológico de *Colletotrichum* sp.**

Em diversas espécies do gênero *Colletotrichum*, podem ser encontradas formas saprofíticas e fitopatogênicas. Estas últimas são responsáveis por causar doenças economicamente significativas, conhecidas como antracnoses, que afetam uma ampla variedade de hospedeiros (AFANADOR-KAFURI et al., 2014; MARIN-FELIX et al., 2017;

GUARNACCIA et al., 2021; XU et al., 2018). As plantas podem ser afetadas por essa doença, que é mais severa em regiões tropicais e subtropicais, em todas as fases de seu desenvolvimento e o patógeno pode ser disseminado de uma planta a outra por meio do ambiente aéreo. Além disso, sementes infectadas podem espalhar o patógeno de uma área para outra e, quando germinadas, podem transmiti-lo para plântulas, resultando em sintomas de tombamento ou *damping-off* antes e após a emergência. Com a colonização do patógeno nos diversos tecidos da planta hospedeira, os sintomas de antracnose tornam-se evidentes em folhas, inflorescências e frutos (JEGER & PLUMBLEY, 1990; THAKUR & MATHUR, 2000; WHARTON & DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004). O fungo *Colletotrichum* sp. já foi identificado em mais de 40 gêneros da família *Poaceae* (CROUCH & BEIRN, 2009), entre elas várias espécies de *Paspalum* sp. (CROUCH et al., 2009) e, recentemente, foi observado no BAG *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste, em indivíduos de *Paspalum regnellii* (BGP 215). Nos últimos anos, diversos estudos relatam o biocontrole do gênero *Colletotrichum* por bactérias dos gêneros *Amycolatopsis* sp., *Bacillus* sp., *Burkholderia* sp., *Pseudomonas* sp. e *Streptomyces* sp., dentre outros gêneros, em diversas culturas agrícolas de interesse econômico (HAN et al., 2015; SADEGHIAN et al., 2016; JISHA et al., 2018; SANDANI et al., 2019; PUPAKDEEPAN et al., 2023).

Uma das vantagens do rápido estabelecimento da pastagem é o aumento da resistência a insetos-pragas e doenças (DIAS FILHO, 1987; VECHIATO & APARECIDO, 2008). Sendo assim, em espécies vegetais onde a germinação e crescimento inicial são lentos, como no *P. regnellii* (PRIMAVESI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013; BORTOLIN et al., 2015) é importante adotar estratégias que mitiguem o efeito dos fitopatógenos, com o controle biológico se apresentando como uma técnica interessante a ser estudada.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Estudar rizobactérias associados à *Paspalum vaginatum* com potencial de promoção de crescimento vegetal quanto a seus efeitos no desenvolvimento inicial e controle de antracnose em *P. regnellii*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Selecionar os isolados rizosféricos associados à *Paspalum vaginatum* (BGP 114) que apresentaram maior potencial nos ensaios *in vitro* de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção de compostos indólicos para experimentos *in vivo* como inoculantes em *Paspalum regnellii*;
- Submeter os isolados rizosféricos do item anterior e os isolados rizosféricos associados a *P. vaginatum* que obtiveram altos índices de solubilização de fosfato inorgânico, a ensaio quantitativo *in vitro* de solubilização de fosfato em *P. regnellii*, utilizando diferentes tipos de rochas fosfáticas;
- Avaliar a influência de isolados rizosféricos, selecionados no ensaio quantitativo *in vitro* de solubilização de fosfato inorgânico, em experimento *in vivo* (casa-de-vegetação) de estabelecimento inicial de *Paspalum regnellii*, utilizando diferentes fontes de fósforo.
- Selecionar os isolados rizosféricos associados à *Paspalum vaginatum* (BGP 114) que apresentaram atividade antagônica contra *Colletotrichum* sp. para ensaio *in vivo* (casa-de-vegetação) de controle biológico deste fungo em *P. regnellii*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Promoção de crescimento vegetal *in vivo* em *Paspalum regnellii*

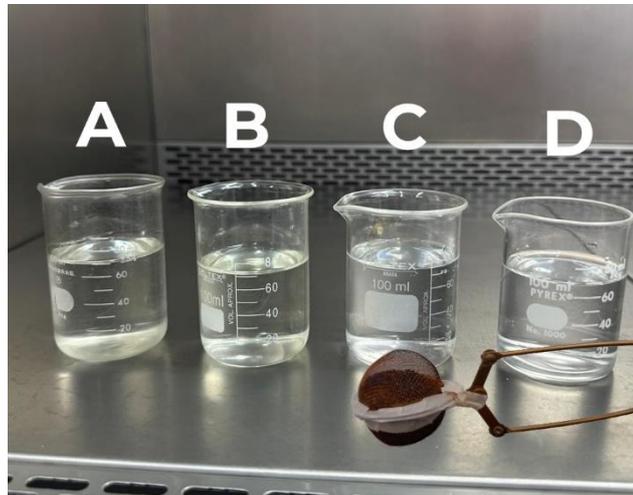
#### 4.1.1 Seleção de isolados rizosféricos para inoculação em casa-de-vegetação em *Paspalum regnellii*

As bactérias rizosféricas selecionadas para este ensaio foram os isolados 29 (*Pseudomonas* sp.), 34 (*Priestia* sp./*Bacillus* sp.), 115 (*Streptomyces* sp.), 127 (*Dyella* sp.) e 139 (*Agrobacterium* sp./*Rhizobium* sp.). Todos estes isolados que possuem potencial de promoção de crescimento vegetal foram obtidos da rizosfera associada a *P. vaginatum* e estão depositados na coleção de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação na Embrapa Pecuária Sudeste (21°57'42" S, 47°50'28" W, 860 m), em São Carlos, São Paulo, Brasil.

#### 4.1.2 Preparo das sementes e primeira inoculação bacteriana

As sementes de *P. regnellii* (acesso 215, código BRA 019186) foram gentilmente cedidas pelo curador do BAG *Paspalum* da Embrapa, Dr. Marcelo Mattos Cavallari (<https://av.cenargen.embrapa.br/avconsulta/Passaporte/detalhesBanco.do?idb=77>). Essas sementes passaram por assepsia superficial, conforme De Moraes (2021) com modificações, sendo suspensas por 1 min em solução de hipoclorito de sódio 5 % (v/v), 30 s em etanol 70 % e lavadas duas vezes em água destilada e esterilizada (figura 14). Após a desinfecção, as sementes foram submetidas à imersão nos tratamentos por 2 horas. Os tratamentos consistiam dos inóculos bacterianos padronizados na concentração aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL pela escala de McFarland, em meio de cultura líquido caldo de triptona de soja (TSB). O tratamento controle negativo foi feito apenas imergindo as sementes em meio de cultura líquido (TSB) esterilizado e o controle positivo foi realizado com a imersão das sementes em BiomaPhos® comercial, na concentração de 100 mL/kg de semente. Após a imersão nos tratamentos, as sementes foram plantadas em sementeiras [(5,3 X 33,7 X 67,2 cm), com 162 células, de dimensão 3,5 X 3,5 cm e volume 31 cm<sup>3</sup>], uma semente por célula, 20 células por tratamento, com

substrato comercial para plantas *Carolina Soil*<sup>®</sup> (Carolina Soil do Brasil LTDA) esterilizado.



**Figura 14.** Assepsia das sementes de *Paspalum regnellii*. A: Hipoclorito de sódio; B: Etanol 70%; C e D: água destilada. Fonte: próprio autor.

#### 4.1.3 Preparo das mudas e segunda inoculação bacteriana

O preparo das mudas foi feito conforme De Paula e colaboradores (2022), com modificações. Após 30 dias da semeadura, as mudas foram retiradas da sementeira, selecionadas de acordo com seu vigor e tamanho, totalizando doze mudas para cada tratamento. Então, tiveram suas raízes lavadas e passaram pela segunda inoculação com os tratamentos, por meio da imersão das raízes nas soluções bacterianas padronizadas e nas soluções controle, conforme item anterior, por 30 min (figura 15). Então, foram plantadas em potes de isopor de 500 ml contendo uma mistura de solo esterilizado e substrato comercial para plantas *Carolina Soil*<sup>®</sup> (Carolina Soil do Brasil LTDA), na proporção 2:1. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com doze repetições. Após 35 dias do transplante, as plantas foram retiradas dos vasos e lavadas para análise morfológica.



**Figura 15.** Imersão das raízes das mudas de *Paspalum regnellii* em solução bacteriana padronizada. Fonte: próprio autor.

#### *4.1.4 Avaliação de parâmetros agronômicos*

A avaliação das plantas foi realizada por meio de pesagem das estruturas vegetais secas, conforme De Paula e colaboradores (2022), com modificações. Pesou-se folhas, material morto, hastes e raízes após as partes vegetais citadas secarem por 120 h em estufa a 60 °C.

#### *4.1.5 Análise nutritiva*

A análise nutritiva foi realizada conforme Costa e colaboradores (1997). Após a secagem das amostras e determinação do peso seco das estruturas vegetais, estas foram trituradas em moinho do tipo Wiley, com facas de aço inoxidável, com peneiras de 1 mm, sendo coletado apenas o material que passou na peneira. O material foi acondicionado em frasco plástico identificado com o código de cada amostra.

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

## **4.2 Biossolubilização de fosfato inorgânico**

### *4.2.1 Seleção de isolados bacterianos para o ensaio*

Foram submetidos a este teste os isolados bacterianos anteriormente selecionados para promoção de crescimento vegetal *in vivo* em *P. regnellii*, 29 (*Pseudomonas* sp.), 34 (*Priestia* sp./*Bacillus* sp.), 115 (*Streptomyces* sp.), 127 (*Dyella* sp.) e 139 (*Agrobacterium* sp./*Rhizobium* sp.) com a adição de isolados com ISF igual ou maior a 3,0, mas que não foram positivos para o teste de NFb, o isolado 5 (*Acinetobacter* sp.) e 113 (*Burkholderia* sp.). Optou-se por eliminar o isolado 76 (*Enterobacter* sp.) do teste, apesar de seu ISF igual a 3.7, devido ao seu possível pertencimento à uma espécie patogênica a humanos. Todos estes isolados estão depositados na coleção de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação (telado) na Embrapa Pecuária Sudeste (21°57'42" S, 47°50'28" W, 860m), em São Carlos, São Paulo, Brasil.

### *4.2.2 Preparo do meio, das fontes de fosfato e dos inóculos bacterianos*

Para quantificar o nível de fósforo solúvel de cada uma das diferentes fontes de fosfato utilizadas foi utilizado o método do fosfomolibdato, descrito por Marra e colaboradores (2012) com modificações conforme Silva e colaboradores (2021), aplicado em meio de cultivo líquido NBRIP (NAUTYAL, 1999). Suplementou-se o meio com fosfato natural de Araxá (AX), fosfato natural Bayovar (BYR), supertriplo fosfato (ST)

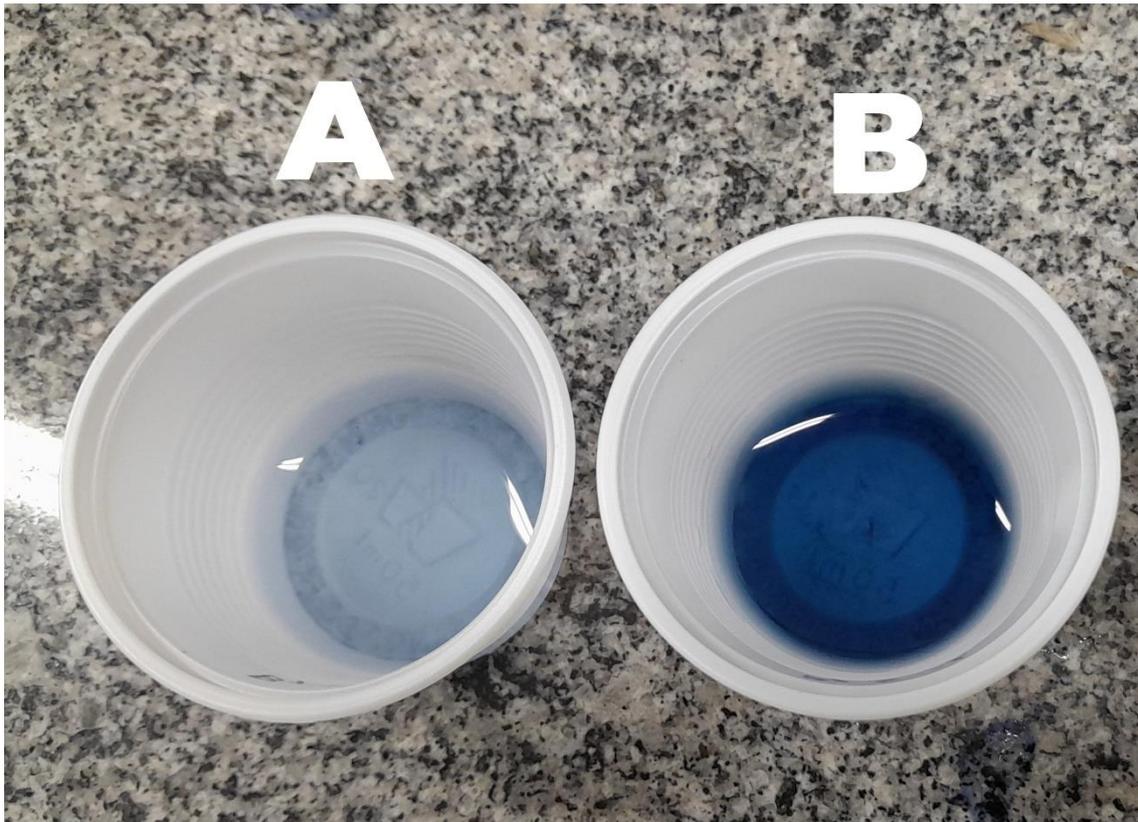
e fosfato de cálcio (FC) ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ), cada qual a uma concentração de 5 g/L (nos meios contendo AX, BYR e ST essa concentração foi ajustada conforme suas porcentagens de  $\text{P}_2\text{O}_5$ ), como única fonte de fósforo presente no meio.

Inicialmente, 50 mL do meio de cultivo NBRIP líquido, acrescido da respectiva fonte de fosfato, foram inoculados com 0,5 mL de cultura bacteriana padronizada a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL pela escala de McFarland e incubados a 28 °C, sob agitação, por 10 dias. Como controle, utilizou-se o meio NBRIP líquido acrescido das fontes de fosfato, porém, sem inoculação das estirpes bacterianas em estudo. Cada tratamento foi realizado em triplicada.

#### 4.2.3 Análise colorimétrica do fósforo solúvel

A análise colorimétrica do P solúvel foi performada conforme Murphy & Riley (1962). As amostras foram submetidas a centrifugação a 5000 g por 10 min, seguida de filtração através de papel *Whatman* nº 42. Para a quantificação do fósforo solúvel, alíquotas de 0,5 ml do filtrado foram misturadas com 5 mL de água ultra pura e 1 mL de uma solução composta por 125 ml de ácido sulfúrico (12 %), 75 ml de ácido ascórbico ( $0,099 \text{ mol/L}^{-1}$ ), 37,5 ml de molibdato de amônio ( $0,03 \text{ mol/L}^{-1}$ ), 12,5 ml de tartarato de antimônio-potássio ( $4,1071 \times 10^{-3} \text{ mol/L}^{-1}$ ). Após 20 minutos de reação, a intensidade da cor azul formada foi medida em espectrofotômetro a 880 nm (figura 16). A quantidade de fósforo solubilizado foi então calculada utilizando uma curva padrão preparada com fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), em oito concentrações (1,2 mg/L, 2,4 mg/L, 4,8 mg/L, 6,0 mg/L, 8,0 mg/L, 10 mg/L, 12 mg/L, 14 mg/L). Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas em triplicata.

A capacidade de cada estirpe bacteriana em solubilizar o fósforo foi determinada pela diferença entre a quantidade de fósforo solúvel encontrada no meio de cultura com o isolado inoculado e a quantidade presente no meio de controle.



**Figura 16.** Quantificação de P solúvel por método colorimétrico. A: Controle (Fosfato de cálcio sem inóculo bacteriano); B: Fosfato de cálcio + Bac 5 (*Acinetobacter* sp.). Fonte: próprio autor.

### **4.3 Ensaio de estabelecimento inicial de *Paspalum regnellii***

As bactérias rizosféricas selecionadas para este ensaio foram os isolados 5 (*Acinetobacter* sp.), 113 (*Burkholderia* sp.), 115 (*Streptomyces* sp.), 127 (*Dyella* sp.) e 139 (*Agrobacterium* sp./*Rhizobium* sp.). Todos estes isolados possuem potencial de promoção de crescimento vegetal, foram obtidos da rizosfera associada a *P. vaginatum* e estão depositados na coleção de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O experimento foi conduzido em casa-de-vegetação (telado) na Embrapa Pecuária Sudeste (21°57'42" S, 47°50'28" W, 860m), em São Carlos, São Paulo, Brasil.

#### **4.3.1 Preparo do solo**

Neste ensaio, o solo utilizado foi tratado em solarizador para diminuição da carga microbiológica, analisado quanto a características físico-químicas (conforme VAN RAIJ et al, 2001) e, com base nos resultados desta análise (tabela 4), 30 dias antes do início

do ensaio, recebeu calcário dolomítico (PRNT 70 %) para atingir a saturação por base de 60 % e sua umidade foi mantida a aproximadamente 20 %. Não foi utilizado substrato comercial para plantas devido a obtenção de uma da simulação de situação de campo com maior fidelidade. O solo foi dividido em 4 partes, 3 delas preparadas com diferentes fontes de fosfato e 1 sem fosfato, considerada o solo controle (Solo C) (tabela 5). As fontes de fosfato utilizadas foram: (1) fosfato natural de Araxá (Solo A) (29,93 % de  $P_2O_5$  total e 5,74 % solúvel em ácido cítrico a 2 %); (2) fosfato natural Bayovar (Solo B) (28,9 % de  $P_2O_5$  total e 14,8 % solúvel em ácido cítrico a 2 %) e (3) superfosfato triplo granulado (Solo S) (46 % de  $P_2O_5$  total e 41 % solúvel em ácido cítrico a 2 %), na dose de  $300 \text{ mg kg}^{-1} P_2O_5$ .

**Tabela 4** Análise físico-química do solo utilizado no ensaio.

Descritor	Quantidade
Al	$2,0 \text{ mmol}_c.\text{dm}^{-3}$
SB	$23,0 \text{ mmol}_c.\text{dm}^{-3}$
CTC	$65,0 \text{ mmol}_c.\text{dm}^{-3}$
V	35 %
B	$0,2 \text{ mg}.\text{dm}^{-3}$
Areia Total	$638,0 \text{ g}.\text{Kg}^{-1}$
Argila	$280,0 \text{ g}.\text{Kg}^{-1}$
Silte	$82,0 \text{ g}.\text{Kg}^{-1}$
pH H <sub>2</sub> O	4,2
pH CaCl <sub>2</sub>	4,6
M.O.	$11,0 \text{ g}.\text{dm}^{-3}$
P(res)	$2,0 \text{ mg}.\text{dm}^{-3}$
K(res)	$0,7 \text{ mmol}_c.\text{dm}^{-3}$
Ca	$15,0 \text{ mmol}_c.\text{dm}^{-3}$
Mg	$7,0 \text{ mmol}_c.\text{dm}^{-3}$
H + Al	$42,0 \text{ mmol}_c.\text{dm}^{-3}$

**pH:** Potencial hidrogeniônico; **M.O.:** Matéria Orgânica; **P(res):** Fósforo Resina; **K(res):** Potássio Resina; **Ca:** Cálcio **Mg:** Magnésio; **H + Al:** Potencial ácido; **Al:** Alumínio; **SB:** Soma de bases; **CTC:** Capacidade de troca catiônica; **V:** Vanádio; **B:** Boro.

Cada partição foi, então, utilizada no enchimento de vasos de isopor de 500 mL, conforme o número de repetições de cada tratamento e cada tipo de solo.

#### 4.3.2 Preparo das sementes e dos inóculos bacterianos

As sementes de *P. regnellii* (BGP 215) foram gentilmente cedidas pelo curador do

BAG Paspalum, Dr. Marcelo Mattos Cavallari

(<https://av.cenargen.embrapa.br/avconsulta/Passaporte/detalhesBanco.do?idb=77>).

Essas sementes passaram por assepsia superficial, conforme De Moraes (2021) com modificações, sendo suspensas por 1 min em solução de hipoclorito de sódio 5 % (v/v), 30 s em etanol 70 % e lavadas duas vezes em água destilada esterilizada (figura 14). Após a desinfecção, as sementes foram submetidas à imersão nos tratamentos por 2 h. Os tratamentos consistiam nos inóculos bacterianos 5 (*Acinetobacter* sp.), 113 (*Burkholderia* sp.), 115 (*Streptomyces* sp.), 127 (*Dyella* sp.) e 139 (*Agrobacterium* sp./*Rhizobium* sp.) padronizados na concentração aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL pela escala de McFarland, em meio de cultura líquido caldo de triptona de soja (TSB). O tratamento controle negativo foi feito apenas imergindo as sementes em meio de cultura líquido (TSB) estéril. Então, foram semeadas na parte central dos vasos de isopor a uma profundidade de 5 mm da superfície, sendo 5 sementes/vaso. Durante todo o período do experimento foi realizada a irrigação uniforme das plantas, ao menos 2 vezes ao dia. A tabela 5 mostra a relação dos tratamentos versus tipo de solo. Foi utilizado o delineamento em blocos inteiramente casualizados em esquema fatorial (5x4) + 1, com 16 repetições (4 por bloco).

**Tabela 5** Descrição dos tratamentos utilizados no ensaio de estabelecimento inicial de *Paspalum regnellii*

Sigla	Descrição
ASB	Semente inoculada com TSB controle (sem inoculo) plantada em Solo A
A5	Semente inoculada com inóculo bacteriano 5 ( <i>Acinetobacter</i> sp.) plantada em Solo A
A113	Semente inoculada com inóculo bacteriano 113 ( <i>Burkholderia</i> sp.) plantada em Solo A
A115	Semente inoculada com inóculo bacteriano 115 ( <i>Streptomyces</i> sp.) plantada em Solo A
A127	Semente inoculada com inóculo bacteriano 127 ( <i>Dyella</i> sp.) plantada em Solo A
A139	Semente inoculada com inóculo bacteriano 139 ( <i>Agrobacterium</i> sp./ <i>Rhizobium</i> sp.) plantada em Solo A
BSB	Semente inoculada com TSB controle (sem inoculo) plantada em Solo B
B5	Semente inoculada com inóculo bacteriano 5 ( <i>Acinetobacter</i> sp.) plantada em Solo B
B113	Semente inoculada com inóculo bacteriano 113 ( <i>Burkholderia</i> sp.) plantada em Solo B
B115	Semente inoculada com inóculo bacteriano 115 ( <i>Streptomyces</i> sp.) plantada em Solo B
B127	Semente inoculada com inóculo bacteriano 127 ( <i>Dyella</i> sp.) plantada em Solo B
B139	Semente inoculada com inóculo bacteriano 139 ( <i>Agrobacterium</i> sp./ <i>Rhizobium</i> sp.) plantada em Solo B

CSB	Semente inoculada com TSB controle (sem inoculo) plantada em Solo C
C5	Semente inoculada com inóculo bacteriano 5 ( <i>Acinetobacter</i> sp.) plantada em Solo C
C113	Semente inoculada com inóculo bacteriano 113 ( <i>Burkholderia</i> sp.) plantada em Solo C
C115	Semente inoculada com inóculo bacteriano 115 ( <i>Streptomyces</i> sp.) plantada em Solo C
C127	Semente inoculada com inóculo bacteriano 127 ( <i>Dyella</i> sp.) plantada em Solo C
C139	Semente inoculada com inóculo bacteriano 139 ( <i>Agrobacterium</i> sp./ <i>Rhizobium</i> sp.) plantada em Solo C
SSB	Semente inoculada com TSB controle (sem inoculo) plantada em Solo S
S5	Semente inoculada com inóculo bacteriano 5 ( <i>Acinetobacter</i> sp.) plantada em Solo S
S113	Semente inoculada com inóculo bacteriano 113 ( <i>Burkholderia</i> sp.) plantada em Solo S
S115	Semente inoculada com inóculo bacteriano 115 ( <i>Streptomyces</i> sp.) plantada em Solo S
S127	Semente inoculada com inóculo bacteriano 127 ( <i>Dyella</i> sp.) plantada em Solo S
S139	Semente inoculada com inóculo bacteriano 139 ( <i>Agrobacterium</i> sp./ <i>Rhizobium</i> sp.) plantada em Solo S

Após 30 dias da semeadura foram realizados o desbaste e uma segunda inoculação bacteriana, onde um volume de 6 mL de cada suspensão padronizada foi inoculado no solo próximo à raiz de cada planta, sendo o controle negativo apenas o caldo TSB estéril (figura 17).

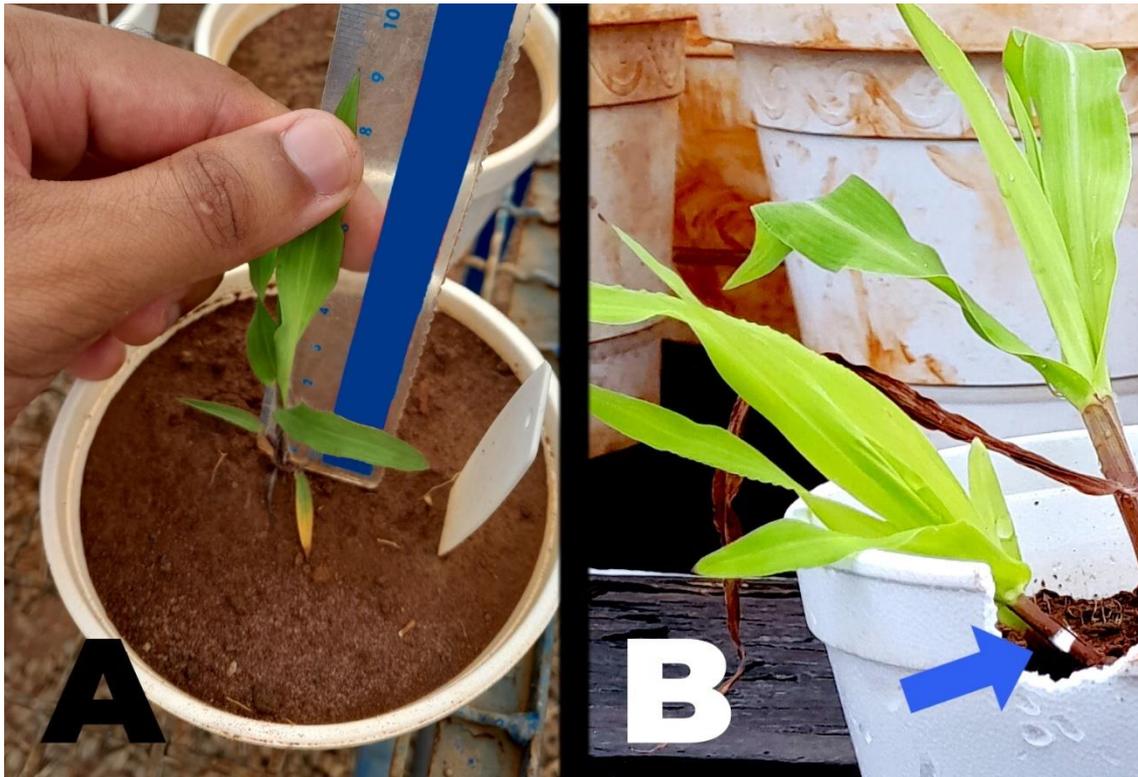
Após 60 dias da semeadura, foi realizada uma adubação mineral, aplicando-se em cada vaso próximo a raiz das plantas 25 mL de solução de sulfato de amônio (9,04 g/L ou 100 mg N.kg<sup>-1</sup>).



**Figura 17.** Segunda inoculação de solução bacteriana padronizada em *P. regnellii*. Fonte: próprio autor

#### 4.3.3 Avaliação de parâmetros agrônômicos

A avaliação das plantas foi performada conforme Beloni e colaboradores (2017), com modificações. Diariamente após a semeadura foi realizada a contagem de sementes emergidas até o momento do desbaste (30 dias após a semeadura). A taxa de emergência das sementes foi calculada dividindo-se o número de sementes emergidas dividido pelo número total de sementes plantadas. Após o desbaste, semanalmente até o momento da primeira coleta foram tomadas as medidas morfológicas de comprimento de maior folha esticada (AT) com auxílio de uma régua milimetrada (figura 18A), número de perfilhos (PF) e número de folhas totalmente expandidas (FTE) de um perfilho escolhido e marcado da planta (figura 18B), para avaliação do desenvolvimento vegetal visível.



**Figura 18.** A: medida de comprimento da maior folha esticada; B: detalhe da marcação no perfilho do qual foram contadas as folhas completamente expandidas. Fonte: próprio autor.

Após 90 dias da sementeira foi realizada a primeira coleta de um total de 4, espaçadas em 15 dias. Nas coletas as plantas foram retiradas dos vasos, as raízes lavadas e cortadas, sendo separadas da parte aérea. As folhas foram avaliadas em um integrador de área foliar (*Li-Cor 3100*) para mensuração da área foliar total (AF) e novamente agrupadas com as hastes para secagem em estufa por 120 h a 60 °C. As raízes foram colocadas sob um fundo branco com escala, para obtenção de imagens através de uma câmera full HD Samsung A13 de 50 MP, sob um suporte. Após isto as raízes também foram submetidas ao processo de secagem em estufa, conforme mencionado anteriormente. Estas imagens foram analisadas no software *ImageJ* e a área radicular (AR) foi estimada. Após os 5 dias de secagem foram mensurados o peso seco da parte aérea (PSPA) e o peso seco radicular (PSR) com o auxílio de uma balança digital.

#### **4.4 Biocontrole de *Colletotrichum* sp. em *Paspalum regnellii***

##### **4.4.1 Seleção de isolados bacterianos para o ensaio de biocontrole**

Foram selecionados 7 dos 8 isolados [17 (*Bacillus* sp.), 84 (*Kitasatospora* sp./*Streptomyces* sp.), 111 (*Amycolatopsis* sp.), 115 (*Streptomyces* sp.), 125 (*Paenibacillus* sp.), 133 (*Kitasatospora* sp./*Actinomycetia* sp.) e 135 (*Streptomyces* sp.)] que apresentaram atividade antagônica contra *Colletotrichum* sp. nos testes *in vitro*. Também para este ensaio optou-se por eliminar o isolado 141 (*Burkholderia* sp.) do teste, conforme citado anteriormente. O isolado fitopatogênico de *Colletotrichum* sp. utilizado neste experimento, isolado do próprio acesso 215 de *Paspalum regnellii* do BAG *Paspalum* (relato pessoal), foi gentilmente cedido pela Dra. Sônia Regina Nogueira Stephan, Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, onde o experimento foi conduzido em casa de vegetação com irrigação automática e controle de temperatura.

#### 4.4.2 Preparo das sementes e primeira inoculação bacteriana

As sementes de *Paspalum regnellii* (BGP 215) foram gentilmente cedidas pelo curador do BAG *Paspalum*, Dr. Marcelo Mattos Cavallari (<https://av.cenargen.embrapa.br/avconsulta/Passaporte/detalhesBanco.do?idb=77>). Essas sementes passaram por assepsia superficial, conforme De Moraes (2021) com modificações, sendo suspensas por 1 min em solução de hipoclorito de sódio 5 % (v/v), 30 s em etanol 70% e lavadas duas vezes em água destilada (figura 14). Após a desinfecção, as sementes foram submetidas à imersão nos tratamentos por 2 h. Os tratamentos consistiam dos inóculos bacterianos selecionados padronizados na concentração aproximada de  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml pela escala de McFarland, em meio de cultura líquido caldo de triptona de soja (TSB). O tratamento controle negativo foi feito apenas imergindo as sementes em meio de cultura líquido (TSB) estéril. Após a imersão nos tratamentos, as sementes foram plantadas em sementeiras (5,3 X 33,7 X 67,2 cm), com 162 células, de dimensões 3,5 X 3,5 cm e volume 31 cm<sup>3</sup>), uma semente por célula, 20 células por tratamento, com substrato comercial para plantas *Carolina Soil*<sup>®</sup> (*Carolina Soil do Brasil LTDA*) esterilizado.

#### 4.4.3 Preparo das mudas e segunda inoculação bacteriana

O preparo das mudas foi feito conforme De Paula e colaboradores (2022), com modificações. Após 30 dias da semeadura, as mudas foram retiradas da sementeira,

selecionadas de acordo com seu vigor e tamanho, totalizando doze mudas para cada tratamento. Então, tiveram suas raízes lavadas e passaram pela segunda inoculação com os tratamentos, por meio da imersão das raízes nas soluções bacterianas padronizadas e nas soluções controle, por 30 minutos (figura 19). Então, foram transplantadas em potes de isopor de 500 ml contendo uma mistura de solo esterilizado e substrato comercial para plantas *Carolina Soil*® (Carolina Soil do Brasil LTDA), na proporção 2:1. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com doze repetições.



**Figura 19.** Imersão das raízes das mudas de *Paspalum regnellii* nas soluções bacterianas padronizadas. Fonte: próprio autor.

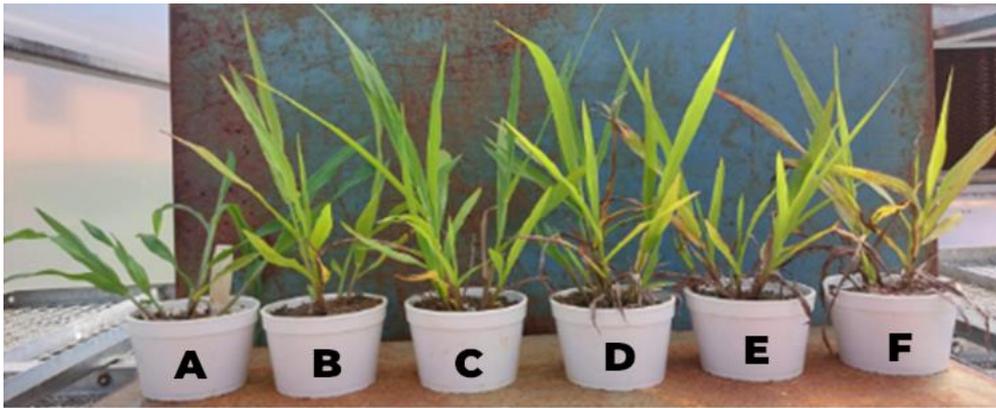
#### 4.4.4 Inoculação do fitopatógeno e análises de indução de doença

Após 30 dias do transplântio (60 dias da semeadura), as plantas foram inoculadas com uma suspensão de esporos de *Colletotrichum* sp., padronizada a  $1 \times 10^5$  conídios/mL (figura 20). Após a administração da suspensão de esporos, as plantas foram incubadas em câmara úmida, à temperatura ambiente, por 24 h. As avaliações quanto à incidência e severidade foram realizadas 30 dias após a inoculação do patógeno (90 dias após a semeadura). Foram avaliadas incidência e severidade da doença. Para incidência somente foi observada e anotada a presença visual dos sintomas típicos da doença (lesões necróticas de cor marrom-escura nas folhas). A avaliação da severidade da

doença foi feita utilizando-se uma visual de notas descrita por Rava (1984) adaptada, que varia de 1 a 6 quanto ao grau de intensidade, onde: 1 = corresponde à ausência de sintomas; 2 = sintomas da doença ocupando de 1-10 % da parte aérea da planta; 3 = sintomas da doença ocupando de 11-20 % da parte aérea da planta; 4 = sintomas da doença ocupando de 21-30 % da parte aérea da planta; 5 = sintomas da doença ocupando de 31-40 % da parte aérea da planta; 6 = sintomas da doença ocupando mais de 40 % da parte aérea da planta (figura 21).



**Figura 20.** Aspersão de solução padronizada com conídios de *Colletotrichum* sp. nas folhas de *Paspalum regnellii*, em câmara de nebulização. Fonte: próprio autor.



**Figura 21.** Escala de graus de intensidade de antracnose em *Paspalum regnellii*. **A:** nota 1 - ausência de sintomas; **B:** nota 2 - sintomas da doença ocupando 1-10% da parte aérea da planta; **C:** nota 3 - sintomas da doença ocupando de 11-20% da parte aérea da planta; **D:** nota 4 - sintomas da doença ocupando de 21-30% da parte aérea da planta; **E:** nota 5 - sintomas da doença ocupando de 31-40% da parte aérea da planta; **F:** nota 6 - sintomas da doença ocupando mais de 40% da parte aérea da planta. Fonte: próprio autor.

#### 4.5 Análise estatística

As análises de variâncias e comparações das médias através do teste de Tukey-Kramer foram realizadas no software *SAS® OnDemand for Academics* (SAS Institute Inc., 2024).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Efeito de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal em *Paspalum regnellii*

Os resultados dos descritores bromatológicos (análise nutritiva) e morfológicos (pesagem seca) dos tratamentos são apresentados na tabela 6.

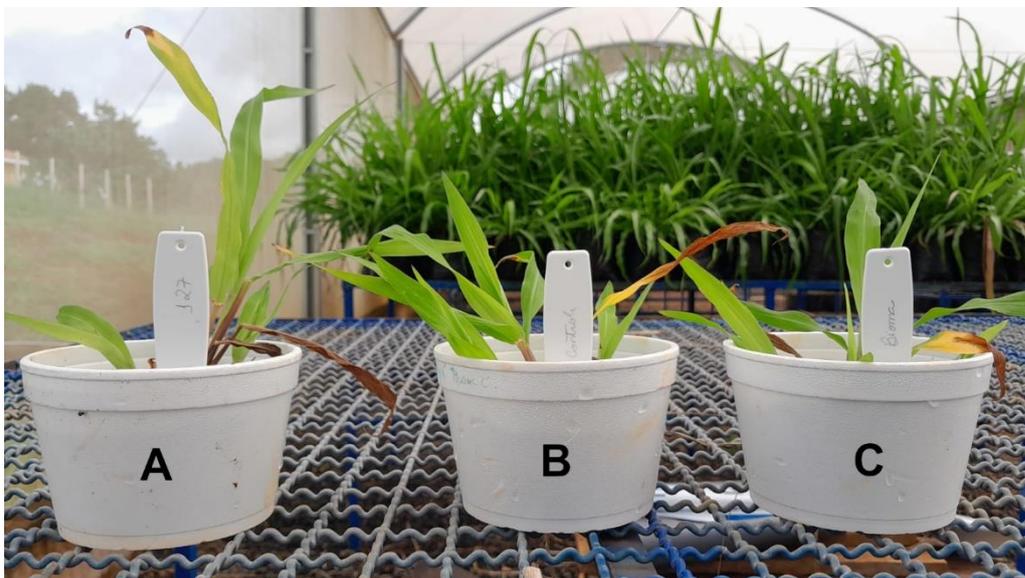
**Tabela 6** Resultados da análise nutritiva e da pesagem seca por tratamento em *P. regnellii*.

	29 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	34 ( <i>Priestia</i> sp./ <i>Bacillus</i> sp.)	115 ( <i>Streptomyces</i> sp.)	127 ( <i>Dyella</i> sp.)	139 ( <i>Agrobacterium</i> sp./ <i>Rhizobium</i> sp.)	BiomaPhos®	Controle
MS (%)	90,68a	92,04a	90,24a	91,47a	91,68a	91,24a	91,61a
MM (%)	8,23ab	7,82b	9,44a	8,08b	8,46ab	7,68b	7,94b
PB (%)	7,12a	7,54a	7,44a	7,46a	7,75a	7,28a	7,08a
FDN (%)	80,62a	78,76a	79,98a	79,45a	79,11a	80,81a	79,64a
FDA (%)	42,95a	42,92a	41,98a	43,19a	42,48a	42,93a	43,57a
LDA (%)	1,48a	3,36a	3,56a	2,89a	3,63a	1,26a	1,85a
DIVMS (%)	43,58a	45,97a	42,42a	44,39a	44,74a	44,27a	44,29a
Raíz (g)	4.70b	4.84b	3.70b	4.90b	4.26b	4.32b	8.03a
Folha (g)	0.52b	0.54ab	0.33c	0.53ab	0.37bc	0.41bc	0.71a
Haste (g)	0.49ab	0.45ab	0.33bc	0.47ab	0.23c	0.27c	0.52a
Material morto (g)	0.65a	0.58ab	0.60ab	0.54ab	0.48b	0.47b	0.55ab

MS = Matéria Seca; MM = Material morto; PB = Proteína bruta; FDN = Fibra em detergente neutro; FDA = Fibra em detergente ácido; LDA = Lignina em detergente ácido e DIVMS = Digestibilidade *in vitro*. Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer.

De modo geral, para os descritores morfológicos, o controle apresentou o melhor desempenho, apresentando maior média de peso de raiz (8.03 g) e de folhas (0,71 g). Também apresentou a maior média de peso de hastes (0,52 g), descritor pouco desejável em forrageiras devido a sua baixa digestibilidade, porém, essa média acaba sendo compatível com a média do peso de folhas produzida, visto sua função de

suporte. A média do peso seco de material morto (0,55 g) foi a quarta maior, mas não estatisticamente diferente dos outros tratamentos, o que é um fator positivo já que, por ter apresentado uma produção maior de biomassa seca, esperava-se um peso de material morto maior, característica não desejável devido a sua baixa quantidade de nutrientes. Quando comparamos as médias dos descritores morfológicos e bromatológicos do tratamento controle podemos presumir que os indivíduos deste se encontram em um estágio superior de desenvolvimento em relação aos outros tratamentos, possivelmente possuindo um sistema radicular e foliar mais avançado, indicado pela maior média de biomassa da raiz, o que gerou um melhor estabelecimento inicial da planta e favoreceu a maior produção de biomassa vegetal aérea pela melhor captação de água e nutrientes através do sistema radicular mais desenvolvido ao longo do experimento (DUNCAN & CARROW, 2005; TAIZ et al., 2017). Porém, a qualidade nutricional da forragem foi mantida globalmente no ensaio para todos os tratamentos de acordo com a análise por NIRS, apresentando apenas diferenças estatísticas pontuais que serão comentadas adiante.



**Figura 22** Ensaio de promoção de crescimento em *Paspalum regnellii* após 20 dias do plantio das sementes. **A:** tratamento com isolado 127 (*Dyella* sp.); **B:** controle negativo; **C:** controle positivo (BiomaPhos®).

Os tratamentos Bac 139 (*Agrobacterium* sp./*Rhizobium* sp.) e BiomaPhos® apresentaram desempenhos semelhantes estatisticamente, inferiores ao Controle, mas com menor média de peso seco de material morto (139 (*Agrobacterium* sp./*Rhizobium*

sp.) = 0,48 g; BiomaPhos® = 0,47 g; Controle = 0,55 g) em comparação com o isolado 29 (*Pseudomonas* sp.) e, também, apresentaram boa razão folhas/haste (139 (*Agrobacterium* sp./*Rhizobium* sp.) = 0,37/0,23 = 1,61; BiomaPhos® = 0,41/0,27 = 1,52; Controle = 0,71/0,52 = 1,37), um bom indicativo de produção de folhas com menor produção de hastes. Porém, estes indicadores podem ter sido influenciados pela quantidade de biomassa vegetal diminuída, se fazendo necessário estudos mais longos e em culturas onde o BiomaPhos®, apresentou bons resultados para confirmação do potencial destas bactérias. O BiomaPhos®, formulado com duas cepas de *Bacillus* solubilizadoras de fosfato, é um bioinoculante comercial validado para o uso em culturas de milho e soja (OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020; 2021; BRITO et al., 2022). Um ponto relevante sobre a introdução de microrganismos solubilizadores de fosfato no solo é que, devido ao seu mecanismo de ação (liberação de ácidos orgânicos que dissolvem o fosfato inorgânico ou formação de quelatos com cátions associados aos ânions fosfato), a quantidade de fósforo solubilizado seria apenas suficiente para suprir as necessidades dos próprios microrganismos, não sendo suficiente para aumentar de forma significativa a disponibilidade de fósforo para as plantas (KUCEY et al., 1989; RICHARDSON, 1994; 2001).

Os tratamentos 29 (*Pseudomonas* sp.), 34 (*Priestia* sp./*Bacillus* sp.) e 127 (*Dyella* sp.) apresentaram resultados idênticos do ponto de vista estatístico ao nível de significância  $p < 0.05$ , tanto na análise morfológica quanto na nutricional. O isolado 115 (*Streptomyces* sp.) apresentou a menor média de peso seco de folha (0,31 g) e de raiz (3,70 g). O solo é um ambiente extremamente complexo e também apresenta um poder tamponável em relação aos fatores bióticos, minimizando os efeitos da introdução de novos organismos (resiliência), principalmente os de vida livre, que devem ser inoculados em altas quantidades e ter o poder de se estabelecer rapidamente no nicho de interesse (MENDES & REIS-JÚNIOR, 2003).

Considerando todos os descritores da análise nutritiva, praticamente não houve diferença estatística ao nível de significância ( $p < 0.05$ ), exceto no teor de material morto, que foi maior no tratamento com o isolado 115 (*Streptomyces* sp.) em relação ao tratamento controle. Durante o ensaio foi observado que houve diminuição da emergência de plântulas em repetições tratadas com o isolado 115 (*Streptomyces* sp.).

Isso pode ser devido a um efeito deletério da bactéria sobre a planta, pois, por mais que tenha mostrado potencial em estudos *in vitro*, a interação planta-microrganismo é extremamente complexa sendo que essa relação pode ou não ser estabelecida e um mesmo microrganismo pode promover crescimento vegetal e ser neutro ou patogênico à planta e o gênero *Streptomyces* já foi descrito na literatura também como fitopatógeno (KLEINGESINDS & GALDEANO, 2012; LI et al., 2019).

Costa e colaboradores (1997) analisaram a qualidade nutritiva de *P. regnellii* BRA-0159 e encontraram um teor de PB de 9,60 %. Analisando o mesmo acesso de *P. regnellii* utilizado neste estudo, Batista e colaboradores (2005) obtiveram valores de 77,19 % para FDN, 39,84 % para FDA e 59,79 % para DIVMS. Barros e colaboradores (2022) obtiveram, também avaliando o mesmo acesso, valores de 74,9 % para FDN, 37,5 % para FDA e 54,57 % para DIVMS e 5,51 % para LDA. Esses valores são superiores aos observados no presente estudo; a menor digestibilidade, mesmo com maiores teores de fibra, pode estar associada principalmente às características morfofisiológicas, com lâminas foliares mais densas apresentando maior resistência à degradação ruminal (HUGHES et al., 2000).

O valor nutritivo de uma forragem é diretamente influenciado pelo estágio de maturidade da planta na colheita. Práticas como rebrotação, cortes e adubação podem alterar a composição química da planta, a proporção de componentes estruturais e sua digestibilidade (TERRY & TILEY, 1964; ANDRADE, 2003).

Segundo Paciullo (2002), os estudos anatômicos, principalmente das lâminas foliares, fornecem informações complementares sobre a qualidade das forrageiras, uma vez que a análise química e a digestibilidade nem sempre explicam todas as variações no estudo destas gramíneas. Adicionalmente, os estudos supracitados foram analisados após um tempo maior, em condições de campo, com correções de nutrientes através da aplicação de fertilizantes e práticas de corte e rebrotação, enquanto neste trabalho, nenhum dos tratamentos recebeu adubação nitrogenada ou algum tipo de correção e as plantas foram colhidas para análise em estágios anteriores de desenvolvimento. O *P. regnellii* apresenta problemas com germinação e estabelecimento inicial e são ainda escassos os estudos sobre os estágios iniciais sobre essa espécie, dificultando a comparação (BORTOLIN, 2016).

Na literatura é descrito que o gênero *Paspalum* possui alta diversidade de microrganismos associados, mas não apresenta especificidade com nenhuma linhagem (AMARAL et al., 2021). Já foi mostrado que bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) associadas a *P. vaginatum* aumentaram biomassa de raiz e parte aérea quando inoculadas em arroz e azevém (LIU et al., 2021). Neste contexto, faz-se interessante a exploração do efeito dos isolados em outras culturas de interesse econômico, visto que tiveram desempenho semelhante a um inoculante comercial, mostraram potencial de promoção de crescimento *in vitro* (figura 22).

## 5.2 Fosfato Quantitativo

Os resultados relativos ao ensaio quantitativo de solubilização de fosfato *in vitro* são apresentados na tabela 7.

**Tabela 7** Resultados da quantificação de fósforo solúvel de cada isolado em relação as fontes de fósforo utilizadas.

Tratamento	P Quantitativo (em mg P.L <sup>-1</sup> )			
	Fonte de P utilizada			
	AX	BYR	FC	ST
Bac 113 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	45,8	49,1	32,5	1,1
Bac 115 ( <i>Streptomyces</i> sp.)	25,7	44,6	2,5	2,4
Bac 127 ( <i>Dyella</i> sp.)	4,7	1,1	2,1	2,8
Bac 139 ( <i>Rhizobium</i> sp./ <i>Agrobacterium</i> sp.)	5,5	0,7	4,6	4,2
Bac 29 ( <i>Pseudomonas</i> sp.)	<0,1	<0,1	0,3	<0,1
Bac 34 ( <i>Priestia</i> sp./ <i>Bacillus</i> sp.)	<0,1	<0,1	0,8	<0,1
Bac 5 ( <i>Acinetobacter</i> sp.)	26,2	33,2	48,1	<0,1

Neste ensaio a rizobactéria Bac 5 (*Acinetobacter* sp.) solubilizou 26,2 mg P.L<sup>-1</sup> (segunda maior média), 33,2 mg P.L<sup>-1</sup> (terceira maior média) e 48,1 mg P.L<sup>-1</sup> (maior média) em fosfato natural Araxá (AX), fosfato reativo Bayovar (BYR) e em Fosfato de cálcio (FC), respectivamente. Bac 113 (*Burkholderia* sp.) solubilizou 45,8 mg P.L<sup>-1</sup> (maior média) em AX, 49,1 mg P.L<sup>-1</sup> em BYR (maior média), 32,5 mg P.L<sup>-1</sup> em FC (segunda maior média) e 1,1 mg P.L<sup>-1</sup> em ST (Super triplo fosfato). Bac 115 (*Streptomyces* sp.) solubilizou 25,7 mg P.L<sup>-1</sup> (terceira maior média) em AX, 44,6 mg P.L<sup>-1</sup> (segunda maior média) em BYR, 2,5 mg P.L<sup>-1</sup> em FC e 2,4 mg P.L<sup>-1</sup> em ST (terceira maior média). Bac 127 e Bac 139 apresentaram baixas médias de solubilização para AX (4,7 mg P.L<sup>-1</sup> e 5,5 mg P.L<sup>-1</sup>), BYR

(1,1 mg P.L<sup>-1</sup> e 0,7 mg P.L<sup>-1</sup>) e FC (2,1 mg P.L<sup>-1</sup> e 4,6 mg P.L<sup>-1</sup>), porém, obtiveram as maiores médias de solubilização em ST, com 2,8 mg P.L<sup>-1</sup> e 4,2 mg P.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Bac 29 (*Pseudomonas* sp.) e Bac 34 (*Bacillus* sp./*Priestia* sp.) tiveram desempenho nulo nos tratamentos com fontes de P oriundas de rochas fosfáticas e baixíssimos resultados em FC (0,3 mg P.L<sup>-1</sup> e 0,8 mg P.L<sup>-1</sup>, respectivamente) sendo, devido a isto, eliminadas do ensaio subsequente (Ensaio de estabelecimento inicial de *P. regnellii*). Já foi relatado em literatura que uma mesma linhagem bacteriana pode solubilizar P em meio sólido e não em meio líquido e vice-versa (SOUCHIE et al., 2007; DE AMARAL LEITE et al., 2020). Considerando o fato de que essas bactérias solubilizaram P em meio sólido, é aceitável supor uma maior dificuldade de estabelecimento desses isolados em meio líquido para realizar a biossolubilização.

Os tratamentos com ST apresentaram baixa ou nula solubilização no geral devido a este fertilizante ser altamente solúvel por si só em água, gerando alta concentração de P solúvel que, quando subtraída dos tratamentos conforme descrito na metodologia do experimento, mostrou pouca ou nula diferença.

Em ensaios de solubilização quantitativa de fósforo, Gomes e colaboradores (2014) encontraram linhagens de *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Streptomyces* solubilizando P de rocha fosfática Araxá nas concentrações médias de 23,74 mg P.L<sup>-1</sup>, 94,98 mg P.L<sup>-1</sup>, 92,78 mg P.L<sup>-1</sup> e 18,54 mg P.L<sup>-1</sup>, respectivamente. De Amaral Leite e colaboradores (2020) descreveram espécies de *Acinetobacter*, *Burkholderia* e *Pseudomonas* solubilizando P através de um biofertilizante à base de carvão enriquecido com rocha Bayovar, obtendo médias aproximadas de 30 mg P.L<sup>-1</sup>, 25 mg P.L<sup>-1</sup> e 22 mg P.L<sup>-1</sup>, respectivamente, quando subtraídas da média de P solúvel do controle.

Em todos estes estudos houveram bactérias que solubilizaram P tanto *in vitro* quanto *in vivo*, favorecendo o desenvolvimento das plantas. Segundo Bashan e colaboradores (2013), utilizar apenas o FC como fonte de fosfato para seleção de bactérias solubilizadoras de P é inadequado e gera muitos “falsos candidatos”, ou seja, bactérias que solubilizam P *in vitro*, mas não *in vivo*. Portanto, um estudo *in vitro* melhorado e mais adequado tanto em relação as fontes de P quanto ao solo ao qual a bactéria que será aplicada, pode selecionar melhor os potenciais inóculos a serem testados *in vivo*, com maiores chances de sucesso.

### 5.3 Ensaio de estabelecimento inicial em *Paspalum regnellii*

#### 5.3.1 Emergência das sementes

As porcentagens relativas à taxa de emergência das sementes de *Paspalum regnellii* em relação a bactéria utilizada, a fonte de fosfato e a cada tratamento estão expostos na tabela 8. A análise de covariância não indicou efeito de bloco ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 8** Proporções das emergências das sementes de *P. regnellii* em relação ao inóculo bacteriano, ao tipo de solo e aos tratamentos.

Inóculo	Taxa de emergência das sementes (%)
Controle	31,3a
5 ( <i>Acinetobacter</i> sp.)	31,6a
113 ( <i>Burkholderia</i> sp.)	19,1b
115 ( <i>Streptomyces</i> sp.)	34,7a
127 ( <i>Dyella</i> sp.)	27,8a
139 ( <i>Agrobacterium</i> sp./ <i>Rhizobium</i> sp.)	32,5a
Fonte P	Taxa de emergência das sementes (%)
Controle	32,9a
ST	24,0ab
AX	30,6a
BYR	30,4a
Tratamento	Taxa de emergência das sementes (%)
CSB	38,8b
C5	41,3ab
C113	12,5de
C115	45,0a
C127	20,0cd
C139	40,0ab
SSB	8,8e
S5	22,5bcd
S113	33,8bc
S115	26,3bcd
S127	28,8bc
S139	23,8bcd
ASB	36,3bc
A5	27,5bcd
A113	12,5de

A115	41,3ab
A127	31,3bc
A139	35,0bc
BSB	41,3ab
B5	35,0bc
B113	17,5cd
B115	26,3bcd
B127	31,3bc
B139	31,3bc

Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer.

As sementes de *P. regnellii* podem apresentar dormência endógena devido a mecanismos inibitórios do próprio embrião envolvendo os processos metabólicos (CARDOSO, 2004; BORTOLIN, 2016). Bortolin e colaboradores (2019) descreveram a correlação de peso das sementes com sua taxa de germinação em *P. regnellii*, elegendo uma classe “extra-leve” com média de 33 %. Neste estudo, encontramos taxas de emergência de plântulas em solos controle sem inóculos bacterianos (31,3 %) e sem adição de fontes de P (32,9 %) próximas à taxa de germinação do modelo proposto pelos autores, o que pode significar uma taxa de germinação de nosso estudo também próxima deste valor. Porém, estudos mais robustos e direcionados a germinação de sementes de *P. regnellii* devem ser realizados para a confiabilidade desta afirmação.

O ST é capaz de ativar a microbiota funcional em compostos húmicos (LEI et al., 2021; WANG et al., 2022). Porém, já foi relatado que ST, em variadas concentrações, pode inibir a germinação de sementes e emergência de plântulas de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, *Matricaria inodora* e *Galium aparine* (SARDI & BERES, 1996; WEYA et al., 2013). Soratto e colaboradores (2003) relatou a diminuição da germinação de sementes e emergência de plântulas de milho (*Pennisetum glaucum* L. R. Br.) gradualmente ao tempo de contato das mesmas com o ST. A utilização do ácido fosfórico na produção do ST deixa resíduos que influenciam negativamente a germinação (SORATTO et al., 2003). Por isso o ST, aplicado de forma isolada, pode ter prejudicado a emergência em *P. regnellii* (8,8 %), porém, pode ter favorecido as rizobactérias pela disponibilização de P no solo que, por sua vez, favoreceram essa emergência, gerando médias de taxas significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) em todos os tratamentos com solo ST e presença de rizobactérias.

Houve grande variação de taxas de emergência dentro dos tratamentos, o que pode ser devido à complexidade e interrelação de diversos fatores como produção de fitormônios pelos isolados, características físico-químicas dos tipos de solo utilizados, fatores genéticos dos embriões nas sementes, estabelecimento ou não de relações sementes-microrganismo, presença de fitopatógenos, competição por nutrientes, dentre outros (MENDES & REIS-JÚNIOR, 2003; CARDOSO, 2004; LAMICHHANE et al., 2017; WANG et al., 2018; XUE et al., 2021; LACAVA et al., 2022).

Dos métodos testados para aumento da taxa de germinação em *P. regnellii* por Bortolin (2016), o uso de um bioestimulante a base de ácido giberélico, ácido indolbutírico e cinetina obteve sucesso. Os reguladores vegetais, como a giberelina, citocininas e auxinas (um composto indólico) exercem um papel primordial na eliminação da dormência das sementes, promovendo hidrólise de reservas armazenadas na mesma através da estimulação de enzimas alfa-amilases e proteases e em outros processos de germinação, emergência e desenvolvimento (CROIZER et al. 2001; CARDOSO, 2004; TAIZ et al., 2017). Pérez-García e colaboradores (2023) relataram que rizobactérias pertencentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus* e *Pseudomonas* foram capazes de aumentar o teor total de compostos fenólicos e antioxidantes e promover o aumento da taxa de germinação e emergência em sementes de pepino.

Todos os isolados produziram compostos indólicos (5 (*Acinetobacter* sp.) = 4,52 mg.L<sup>-1</sup>; 113 (*Burkholderia* sp.) = 0,98 mg.L<sup>-1</sup>; 115 (*Streptomyces* sp.) = 27,16 mg.L<sup>-1</sup>; 127 (*Dyella* sp.) = 13,89 mg.L<sup>-1</sup> e 139 (*Agrobacterium* sp./*Rhizobium* sp.) = 57,38 mg.L<sup>-1</sup>) porém, é importante notar que altos níveis de auxinas como o ácido-3-indol acético podem originar efeitos adversos (DUCA et al., 2014) e ainda não se estabeleceu uma quantidade ótima de auxinas para *P. regnellii*.

Considerando o desempenho do isolado 113 (*Burkholderia* sp.) na emergência de sementes de *P. regnellii* podemos observar que os tratamentos com esta bactéria mostraram as menores taxas de emergência nos solos controle (12,5 %), AX (12,5 %) e BYR (17,5 %) que, teoricamente, possuem menores teores de P solúvel comparado ao solo ST, onde a taxa de emergência foi maior no tratamento contendo esta mesma bactéria (33,8 %). Stefan e colaboradores (2008) discutiram sobre rizobactérias inibindo a germinação de soja *in vitro*, justificada por uma possível competição por

nutrientes. É relatado também que as bactérias de solo competem com a planta pelo P disponível (MARGENOT et al., 2017). Portanto, é possível supor que o isolado 113 (*Burkholderia* sp.) pode ter exercido um efeito inibitório na emergência de *P. regnellii*, além de não ter conseguido auxiliar na quebra da dormência das sementes devido a sua baixa produção de compostos indólicos (0,98 mg.L<sup>-1</sup>) em solos mais pobres em P, mas mostrou efeito benéfico a planta quando em condições onde não necessitou competir por P.

O isolado 115 (*Streptomyces* sp.), em contraste com o efeito que gerou no ensaio anterior de promoção de crescimento vegetal em *P. regnellii*, apresentou a maior média global de taxa de emergência entre os inóculos (34,7 %), nos tratamentos com solo sem adição de fonte de P (45 %, significativamente diferente do controle ao nível de significância  $p < 0.05$ ) e em AX (41,3 %, não significativamente diferente do tratamento controle neste solo ao nível de significância  $p < 0.05$ ). Este fato pode ser explicado por sua possível modulação da germinação por produção de compostos indólicos (27,16 mg.L<sup>-1</sup>) e seu potencial de antagonismo a fungos fitopatogênicos pois, embora as sementes tenham sido tratadas, elas podem carregar esporos internos e o isolado pode ter contribuído na proteção contra fungos fitopatogênicos durante a emergência da plântula (BATISTA & GODOY, 1998; LACAVA et al., 2022). De fato, Batista e Godoy (1998) relataram uma taxa de germinação menor em sementes de diversas espécies de *Paspalum* sp. onde foram encontrados esporos de patógenos.

Vários estudos já mostraram a presença de rizobactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* sp., *Dyella* sp., *Enterobacter* sp., *Paraburkholderia* sp. e *Pseudomonas* sp., aumentando a taxa de germinação e emergência de plântulas em sementes de cacau, pimentão, cevadinha, tomate, pinheiro, entre outras (LIU et al., 2019; HARDIANSYAH et al., 2020; ASTORGA-ELÓ et al., 2021; DOMÍNGUEZ-CASTILLO et al., 2021; URECHE et al., 2021). É importante destacar que, para o ensaio de estabelecimento inicial em *P. regnellii*, ao contrário do ensaio de promoção de crescimento vegetal na mesma planta, foi realizada a calagem do solo, o que pode explicar a mudança de comportamento do isolado 115 (*Streptomyces* sp.). Esse processo traz vários benefícios às culturas, como eliminar ou reduzir significativamente a acidez do solo, aumentar a disponibilidade de nutrientes, favorecer a mineralização da matéria

orgânica (fonte de N, P, S, B e outros elementos), aumentar a eficiência da fixação simbiótica de N, melhorar a eficiência do uso de adubos fosfatados e melhorar a atividade microbiana do solo (HAVLIN et al., 1999).

Estudos mais aprofundados sobre a influência de rizobactérias e fertilizantes fosfatados na germinação de *P. regnellii* e seus mecanismos de quebra de dormência devem ser incentivados de modo a elucidar essa questão, promovendo uma opção sólida para o aumento da qualidade das sementes.

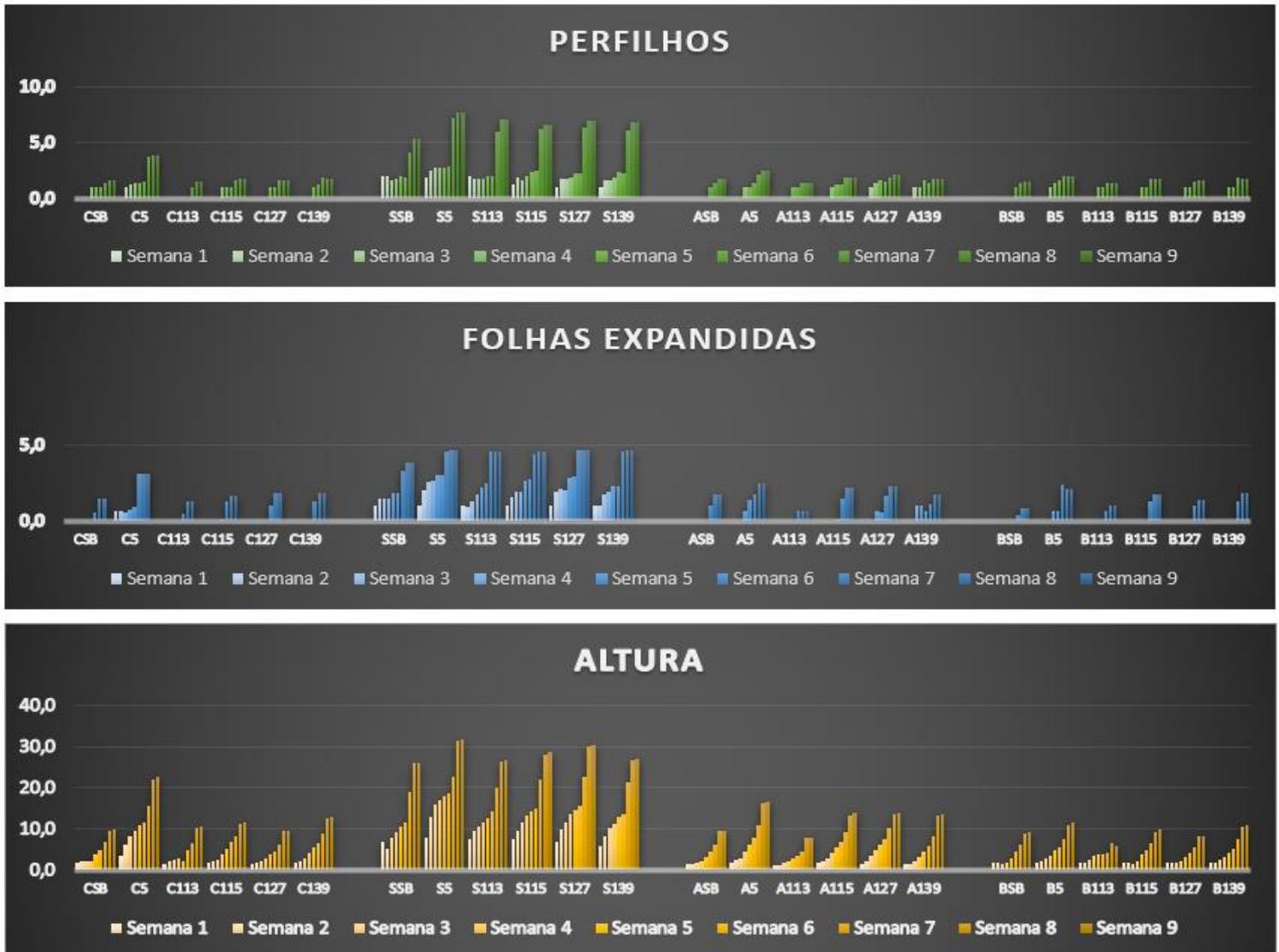
### 5.3.2 Altura, número de perfilhos e folhas totalmente expandidas

Os resultados dos descritores altura, número de perfilhos e folhas totalmente expandidas são mostrados na tabela 9 e apresentados graficamente na figura 23. A análise de covariância não indicou efeito de bloco ( $p < 0.05$ )

Em contraste com seus resultados na taxa de emergência (24 %), os tratamentos com solo ST demonstraram desenvolvimento de altura, perfilhamento e folhas expandidas antecipado em relação aos outros tipos de fontes de P, provavelmente devido a sua disponibilização rápida de P em formas absorvíveis no solo.

Na primeira semana somente os tratamentos ST apresentaram perfilhamento e folhas totalmente expandidas, sem diferença estatística entre as médias destes descritores ( $p < 0.05$ ). Em relação à altura, não houve diferença significativa entre as médias deste descritor entre os tratamentos ST com inóculos bacterianos, porém, houve diferença significativa em relação ao controle sem inóculo (SSB), com destaque para a média de altura para o tratamento ST5, que foi significativamente maior ( $p < 0.05$ ) que o tratamento SSB até a semana 5. A partir da semana 6, o tratamento ST5 apresentou diferença estatística nas médias de perfilhamento em relação ao controle SSB até a semana 9, quando foi novamente equivalente do ponto de vista estatístico. Essa equivalência na semana final pode ser explicada pela limitação espacial e nutritiva devido ao volume dos vasos utilizados no ensaio, evidenciada pelo platô de todos os descritores nas duas últimas semanas, como podemos observar na figura 23. O gênero *Acinetobacter*, inóculo em ST5, já foi descrito como produtor de giberelinas e outros compostos bioativos que promovem crescimento em plantas (INDIRAGANDHI et al., 2008; KANG et al., 2009). É plausível supor que a bactéria conseguiu estabelecer uma

relação sinérgica com a planta facilitando a absorção de nutrientes e produzindo fitormônios.

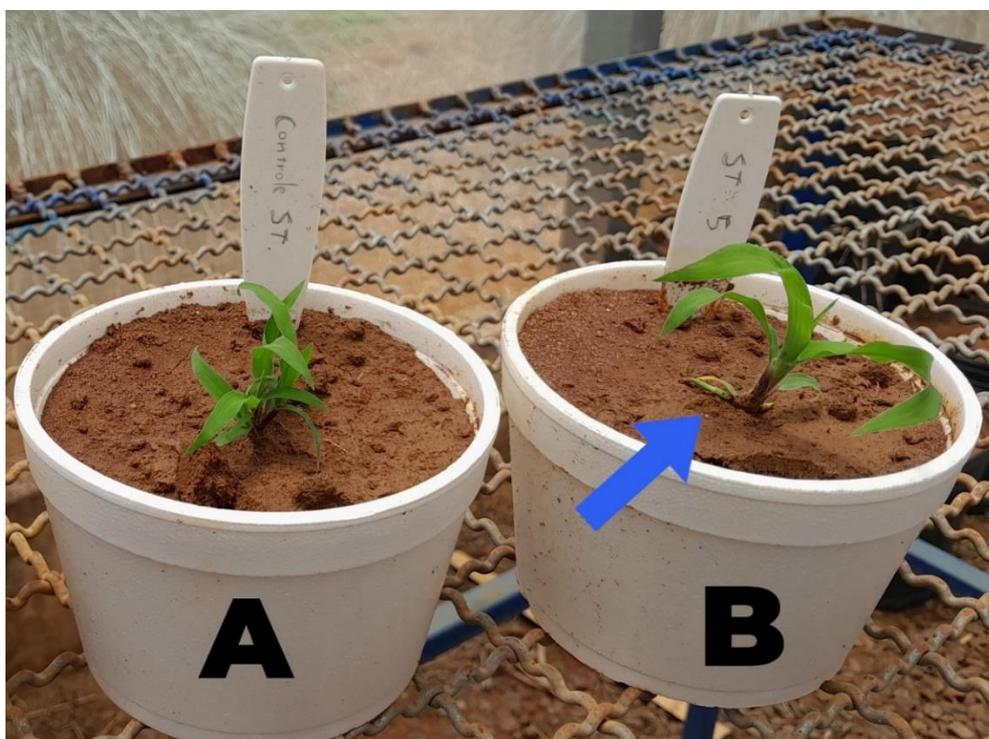


**Figura 23.** Resultado gráfico dos descritores altura (AT), número de perfilhos (PF) e número de folhas expandidas (FTE) para os tratamentos em *Paspalum regnellii* ao longo das semanas.

As plantas do tratamento SSB podem ter direcionado recursos fisiológicos para o perfilhamento em detrimento da altura (HERMANS et al. 2006) e, por isso, o atraso no desenvolvimento desse descritor e a maior média de perfilhamento (2,00) comparado aos outros tratamentos. Na segunda semana já não havia diferença significativa para o descritor altura em relação aos outros tratamentos, exceto para ST5, que teve sua média igualada estatisticamente na semana 5. Por outro lado, a presença das rizobactérias podem ter favorecido as maiores médias de altura no início do desenvolvimento da

planta devido a mecanismos de promoção de crescimento adicionais a solubilização de P inorgânico, como produção e regulação de fitormônios e fixação biológica de nitrogênio (IBIENE et al., 2012; DIAGNE et al., 2020; MAN et al., 2021; PAULUS & TOOY, 2024).

Considerando a evolução do ensaio ao longo do tempo apenas para solo com adição de ST, estatisticamente, os tratamentos apresentaram comportamento equivalente, com exceção do tratamento ST5, que em diversos momentos teve médias superiores e estatisticamente diferentes do tratamento controle SSB (figura 24).



**Figura 24.** Exemplo da diferença de perfilhamento entre tratamentos (indicada pela seta azul). A: tratamento SSB (solo com adição de ST e sem adição de inóculo rizobacterianos); B: tratamento S5 (solo com adição de ST + Bac 5 (*Acinetobacter* sp.)). Fonte: próprio autor.

Considerando as fontes de P aplicadas no ensaio, os tratamentos com adição de ST apresentaram as médias dos descritores avaliados superiores a todos os outros, com as maiores médias de altura e perfilhamento precoce em relação as outras fontes. De modo geral, os tratamentos AX, BYR e Controle apresentaram desempenho parecido, com alturas semelhantes e período de início de perfilhamento próximos. Porém, houve uma leve diferenciação (ainda que não estatística) nos descritores de altura nos

tratamentos com a presença de AX, o que pode ser explicado pela disponibilização gradual e tardia de P por este fertilizante.

A administração da solução nutritiva de sulfato de amônio entre as semanas 6 e 7 claramente afetou o desenvolvimento de *P. regnellii*, gerando um aumento exponencial em todos os descritores. Devido à sua lenta germinação e estabelecimento, *P. regnellii* não deve ser adubada com nitrogênio e potássio durante a semeadura. Esse tipo de adubação é recomendado apenas após 30 dias do plantio e sabe-se que em solos corrigidos com média ou alta disponibilidade de fósforo, espera-se uma alta resposta ao nitrogênio, provavelmente devida ao maior desenvolvimento do sistema radicular das plantas, permitindo que elas acessem uma maior quantidade de nutrientes disponíveis (CANTARELLA, 1994; PRIMAVESI et al., 2006). Isso evidencia a necessidade do manejo integrado de fertilizantes, de modo a alcançar o melhor rendimento da planta. Porém, apesar de elevar as médias dos descritores, esta ação não modificou os padrões de comportamento dos tratamentos em relação ao controle, como pode ser observado na tabela 9.

Os tratamentos em solo BYR não mostraram diferenças estatísticas ao nível de significância  $p < 0.05$  para os descritores morfológicos ao longo do ensaio. Porém, o tratamento B5 apresentou desenvolvimento de perfilhos anterior aos outros tratamentos neste solo, sendo o primeiro e único tratamento a apresentar a expansão total de folhas em um perfilhos até a semana 6 (3,00), com início de aparecimento do descritor na semana 4 (2,00). Novamente, a presença do isolado 5 (*Acinetobacter* sp.) mostrou efeitos benéficos a *P. regnellii*, provavelmente devido a sua produção de fitormônios e, também, pela solubilização e disponibilização de P a partir da rocha BYR.

Os tratamentos em solo AX não apresentaram diferenças significativas entre si, porém, o perfilhamento se iniciou na semana 3 em A127 e A139, na semana 4 em A115 e A5 e na semana 5 em A113, ao passo que só se iniciou na semana 6 no controle ASB. Isso pode ser explicado pelo estabelecimento mais rápido de relação com a planta e a combinação de diversos mecanismos diretos de promoção de crescimento, com destaque para fixação biológica de nitrogênio, visto que o perfilhamento se iniciou mais rapidamente em tratamentos com rizobactérias que mostraram potencial para FBN. Desde o início do ensaio o tratamento A113 apresentou desenvolvimento mais lento,

sendo significativamente menor no descritor altura em relação aos tratamentos A5, A115 e A127 a partir da administração da solução nutritiva de sulfato de amônio. Isto pode indicar uma limitação de captação de P e N posteriormente a aplicação da solução nutritiva) pelo sistema radicular menos desenvolvido em relação a estes outros tratamentos, que foram mais eficientes em utilizar os recursos disponíveis para seu crescimento, pois quanto mais desenvolvido este sistema melhor a captação de nutrientes (HALING et al., 2018).

Os tratamentos sem adição de P não apresentaram diferenças significativas para os descritores analisados em relação ao tratamento controle CSB, com exceção do tratamento C5 que, a partir da semana 2, mostrou aumento significativo no descritor altura, além de ter iniciado seu perfilhamento com 2 semanas de diferença para o controle CSB (figura 25). O tratamento C5 teve as maiores médias de altura, também, quando comparado aos outros tratamentos com inóculos bacterianos em solo sem adição de P. Novamente, a presença do isolado 5 (*Acinetobacter* sp.) se mostrou benéfica ao desenvolvimento de *P. regnellii*. Geralmente, 35-70 % do total do P presente no solo está em formas inorgânicas e de 30-65 % na forma orgânica (SHEN et al., 2011). Do total de fósforo orgânico, entre 3 % e 14 % está presente na biomassa microbiana, que é uma reserva importante devido à sua alta taxa de renovação e por impedir a fixação do fósforo em formas minerais de baixa solubilidade (REDDY et al., 2005). É relatado que *Acinetobacter* sequestra grandes quantidades de fosfato inorgânico e consegue solubilizá-lo, sendo um gênero de grande valor para a agricultura recente (MUJUMDAR et al, 2023). Gulati e colaboradores (2010) descreveram uma cepa rizosférica de *Acinetobacter* sp. que era influenciada pela fonte de fosfato mineral em relação a suas quantidades de ácidos orgânicos produzidos, além de recomendar sua aplicação como inoculante em solos pobres em P devido a sua capacidade de solubilização e promoção de crescimento em milho. Também já foi descrita a atividade de espécies rizosféricas de *Acinetobacter* sp. solubilizadoras de P promovendo crescimento em acelga-chinesa, cevada, *Glebionis coronária* (especiaria), grão-de-bico e pepino sem a adição de fertilizantes fosfatados ao solo (KANG et al., 2009; PEIX et al., 2009).



**Figura 25.** Exemplo da diferença de altura entre tratamentos. A: tratamento C5 (solo sem adição de fonte de P + Bac 5 (*Acinetobacter* sp.)); B: tratamento CSB (solo sem adição de fonte de P e sem adição de inóculo rizobacterianos). Fonte: próprio autor.

Para superar a baixa solubilidade das rochas fosfáticas é altamente recomendável que as plantas desenvolvam um sistema radicular robusto e ativo ou que o solo conte com a presença de microrganismos solubilizadores de P (ELHAISSOUFI et al., 2022). Portanto, a abordagem da aplicação de rochas fosfáticas em conjunto com bactérias solubilizadoras e fertilizantes fosfatados de maior solubilidade é uma ótima estratégia para melhorar a capacidade de estabelecimento em *P. regnellii*. Adicionalmente, de forma a aumentar ainda mais o potencial de formulação de inoculantes, pode ser considerada a possibilidade de utilização de nanomateriais em conjunto com as bactérias, visto que a nanotecnologia vem mostrando efeitos significativos no aumento do crescimento de RPCV, aumentando sua viabilidade e estabilidade em campo (DE MORAES et al., 2021; 2023).

**Tabela 9** Resultados dos descritores altura (AT), número de perfilhos (PF) e número de folhas expandidas (FTE) para os tratamentos em *P. regnellii* ao longo das semanas. Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer.

	Semana 1			Semana 2			Semana 3			Semana 4			Semana 5			Semana 6			Semana 7			Semana 8			Semana 9		
	AT	PF	FTE	AT	PF	FTE	AT	PF	FTE	AT	PF	FTE	AT	PF	FTE	AT	PF	FTE									
CSB	1,75c	-	-	2,05d	-	-	1,79d	-	-	2,63c	1,00a	-	3,85c	1,00c	-	4,99d	1,00c	-	6,73de	1,67ef	1,00d	9,52de	1,67e	2,00d	9,94de	2,00c	2,20cd
C5	3,4bc	-	-	6,00c	1,00a	1,50a	8,78c	1,20a	1,50a	10,43b	1,42a	2,00a	11,50b	1,40bc	1,75ab	12,07bc	1,50bc	2,25ab	15,64bc	3,70cd	3,44abc	22,00bc	3,82cd	3,78ab	22,72bc	4,44b	3,78ab
C113	1,48c	-	-	2,05d	-	-	2,60d	-	-	2,65c	1,00a	-	2,66c	-	-	4,65d	-	-	6,66de	1,00f	1,00d	10,10de	1,50e	1,67d	10,40de	1,50c	1,67d
C115	1,91c	-	-	1,99d	-	-	2,40d	-	-	3,79c	-	-	5,20c	1,00c	-	6,58d	1,00c	1,00b	7,68de	1,67ef	1,50d	11,10de	1,75de	2,00d	11,41de	1,75c	2,00d
C127	1,58c	-	-	1,66d	-	-	2,12d	-	-	2,83c	-	-	3,82c	1,00c	-	4,85d	1,00c	-	6,25de	1,67ef	1,50d	9,41de	1,57e	2,17bcd	9,51de	1,57c	2,17cd
C139	1,79c	-	-	2,21d	-	-	2,95d	-	-	4,19c	-	-	5,55c	1,00c	-	6,42d	1,25bc	-	8,78de	1,86def	1,80d	12,53de	1,70e	2,00d	12,90de	1,70c	2,00d
SSB	2,78c	2,00a	1,00a	6,98bc	2,00a	1,50a	10,42bc	1,67a	2,33a	12,10b	2,00a	2,00a	13,12ab	2,00b	3,00a	14,65ab	1,83b	3,00a	21,44ab	5,15bcd	3,44abc	28,82ab	5,89bc	3,86ab	29,12ab	6,00ab	4,75a
S5	7,83a	1,86a	1,00a	12,74a	2,46a	2,00a	15,92a	2,73a	2,55a	16,93a	2,73a	2,64a	17,02a	2,80a	3,28a	18,48a	2,83a	3,00a	23,90a	7,15a	4,60a	31,46a	7,69a	4,64a	31,85a	7,70a	4,83a
S113	7,56a	2,00a	1,00a	9,39b	1,75a	2,33a	10,55bc	1,70a	1,86a	11,69b	1,80a	1,89a	14,77ab	2,00b	2,44ab	14,11ab	2,00b	2,78a	19,86ab	6,00abc	4,60a	26,42ab	7,10ab	4,60a	26,73ab	7,10a	4,60a
S115	6,97a	1,25a	1,00a	9,53b	1,86a	2,20a	11,56bc	1,67a	2,13a	13,79ab	2,00a	1,89a	14,23ab	2,33ab	2,67ab	13,78ab	2,44ab	2,78a	21,16ab	6,20ab	4,40ab	28,14ab	6,60ab	4,60a	28,58ab	6,60a	4,60a
S127	6,28a	1,00a	1,00a	9,33b	1,78a	1,89a	12,16b	1,73a	2,30a	13,70ab	1,82a	2,00a	14,68ab	2,28ab	2,82a	15,41ab	2,28ab	2,91a	22,54a	6,28ab	4,64a	30,06ab	6,91ab	4,64a	30,25ab	6,91a	4,64a
S139	5,95ab	1,00a	1,00a	9,72b	1,57a	1,40a	11,98bc	1,60a	2,13a	13,13ab	1,90a	2,11a	14,77ab	2,30ab	2,30ab	13,20ab	2,28ab	2,20ab	21,41ab	6,09ab	4,55a	28,57ab	6,82ab	4,64a	28,84ab	7,20a	4,80a
ASB	1,41c	-	-	1,60d	-	-	1,75d	-	-	2,27c	-	-	3,17c	-	-	4,45d	1,00c	-	7,25de	1,43ef	1,40d	10,86de	1,75de	2,33bcd	10,98de	1,75c	2,33cd
A5	1,94c	-	-	2,39d	-	-	2,93d	-	-	4,58c	1,00a	-	6,20c	1,00c	1,00b	6,99cd	1,33bc	2,00ab	11,02cd	2,14def	2,00cd	16,17cd	2,43de	2,83bcd	16,44cd	2,43c	2,43cd
A113	1,03c	-	-	1,15d	-	-	1,63d	-	-	2,00c	-	-	2,83c	1,00c	-	3,16d	1,00c	-	4,53e	1,33ef	2,00cd	7,76de	1,33e	2,00d	7,92de	1,33c	2,00d
A115	1,92c	-	-	2,03d	-	-	2,89d	-	-	4,15c	1,00a	-	5,93c	1,25bc	-	7,09cd	1,29bc	1,00b	9,93cd	1,89def	1,63d	13,98cd	1,89de	2,22bcd	14,57cd	2,00c	2,22cd
A127	1,39c	-	-	1,98d	-	-	3,32d	1,00a	-	5,14c	1,33a	-	6,62c	1,60b	1,00b	7,53cd	1,44bc	1,25ab	10,19cd	1,92def	2,10bcd	15,20cd	2,17de	2,70bcd	15,78cd	2,00c	2,70cd
A139	1,46c	-	-	1,60d	-	-	2,00d	1,00a	-	3,33c	1,00a	1,00a	4,90c	1,67b	1,50ab	6,50cd	1,40bc	1,50ab	9,22de	1,80def	1,57d	13,30de	1,73de	2,11cd	13,69de	1,73c	2,11d
BSB	1,81c	-	-	1,66d	-	-	1,60d	-	-	2,10c	1,00a	-	3,10c	1,00c	-	4,15d	1,00c	-	6,31de	1,38ef	1,50d	9,33de	1,45e	2,00d	9,54de	1,45c	2,00d
B5	1,86c	-	-	2,42d	-	-	2,94d	-	-	3,53c	1,20a	2,00a	4,66c	1,33bc	2,00ab	5,23d	1,60bc	3,00a	7,49de	2,40def	2,40bcd	11,00de	2,40de	2,83bcd	11,44de	2,00c	2,83bcd
B113	1,82c	-	-	1,80d	-	-	2,47d	-	-	3,43c	-	-	4,74c	1,00c	-	3,28d	1,00c	-	5,20de	1,33ef	1,00d	6,49e	1,33e	1,50d	6,77e	1,33c	1,50d
B115	1,70c	-	-	1,71d	-	-	1,65d	-	-	2,25c	-	-	3,48c	1,00c	-	4,96d	1,00c	-	6,04de	1,71ef	1,80d	10,42de	1,71e	2,40bcd	10,85de	1,71c	2,40cd
B127	1,69c	-	-	1,84d	-	-	1,65d	-	-	2,21c	-	-	3,44c	1,00c	-	4,75d	1,00c	-	5,89de	1,50ef	1,50d	8,68de	1,63e	1,83d	8,88de	1,63c	1,83d
B139	1,73c	-	-	1,89d	-	-	2,41d	-	-	2,97c	-	-	4,10c	1,00c	-	5,45d	1,00c	-	7,49de	1,88def	1,67d	10,65de	1,80de	2,25bcd	10,92de	2,00c	2,25cd

### 5.3.3 *Peso seco e área superficial*

Os resultados obtidos para os descritores área foliar (AF), área radicular (AR), peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco radicular (PSR) são mostrados na tabela 10 e graficamente na figura 26.

Considerando os gráficos, podemos observar que houve proporcionalidade direta entre AF e PSPA e entre AR e PSR. A análise de covariância indicou o efeito de bloco ( $p < 0.05$ ) nas variáveis, o que pode explicar a diminuição das médias dos descritores na coleta 3, em contraste ao esperado que seriam médias intermediárias entre coleta 2 e coleta 4 devido ao desenvolvimento da planta ao longo do tempo. Esse efeito pode ser explicado por uma vasta gama de fatores, como diferença da área de sombreamento nos blocos, irrigação desuniforme, dentre outros fatores. Porém, pouco influenciou o comportamento geral dos tratamentos (figura 26).

Os tratamentos seguiram um comportamento semelhante ao mostrado pelos descritores anteriores (altura, número de perfilhos e número de folhas totalmente expandidas). No solo sem adição de P, o tratamento C5 teve médias significativamente maiores ( $p < 0.05$ ) em relação ao tratamento controle CSB em todos os descritores em todas as coletas (figura 27). Na coleta 2, mostrou médias de AF, AR, PSPA e PSR equivalentes estatisticamente a tratamentos com solo ST. Os outros tratamentos não mostraram diferença estatística ao controle CSB em nenhum dos descritores e em nenhuma das coletas.

Os tratamentos com adição de ST apresentaram as maiores médias para todos os descritores em relação as outras fontes de P e ao solo sem adição de fonte de P, evidenciando a importância de P disponível no solo para desenvolvimento do sistema aéreo e radicular. A deficiência de P em forrageiras pode gerar crescimento lento, pouco perfilhamento e pouco desenvolvimento do sistema radicular (WERNER, 1986). Na coleta 1, apenas o tratamento S5 apresentou médias de AF, PSPA e PSR significativamente maiores em relação ao controle. Na coleta 2, o tratamento S5 apresentou médias de AF, PSPA e PSR significativamente maiores em relação ao controle SSB e o tratamento S139 apresentou médias de AF e PSPA significativamente maiores em relação ao controle SSB. Na coleta 3, apenas o tratamento S5 apresentou médias significativamente diferentes ao tratamento controle SSB, em todos os descritores. Na

coleta 4, o tratamento S5 apresentou médias significativamente maiores em relação ao controle SSB em todos os descritores e o tratamento S127 apresentou médias de PSPA e PSR significativamente maiores em relação ao controle SSB.

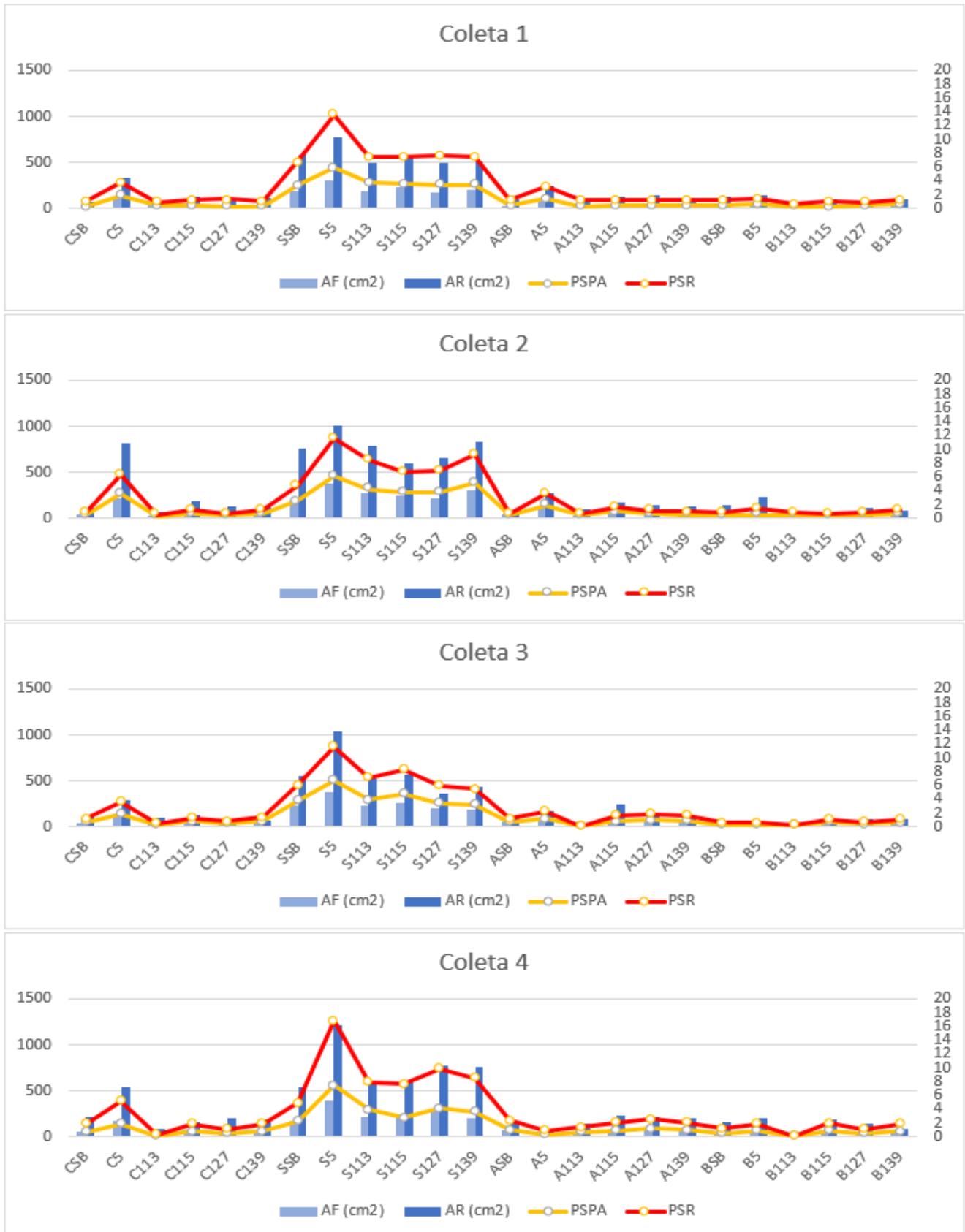
No solo com adição de AX, nas coletas 1 e 2, somente o tratamento A5 apresentou médias significativamente diferentes ao tratamento controle ASB, em todos os descritores. Na coleta 3, o tratamento A5 apresentou média de PSPA significativamente maior em relação ao controle ASB e o tratamento A115 apresentou média AR significativamente maior em relação ao controle ASB. Devido à baixa taxa de germinação do tratamento A113, não houve repetições deste tratamento neste bloco para serem coletadas. Na coleta 4, o tratamento A5 apresentou o pior desempenho dos tratamentos em solo AX, apresentando médias significativamente menores que os tratamentos A115, A127 e A139 nos descritores AF e AR, provavelmente devido a um efeito de bloco.

No solo com adição de BYR, não houve diferença significativa das médias dos descritores entre nenhum dos tratamentos. Porém, na coleta 1, o tratamento B5 apresentou as maiores médias em todos os descritores. Na coleta 2, apresentou as melhores médias em AF, AR e PSR.

Considerando o comportamento dos tratamentos ao longo do ensaio, o efeito de bloco parece ter sido mais proeminente nas coletas 3 e 4, gerando algumas alterações incomuns e inesperadas. Outra hipótese possível é que estas coletas mostram um platô nas médias dos descritores, indicando um esgotamento espacial dos vasos e nutritivo do solo, assim, gerando as alterações devido as respostas adotadas pelas plantas frente a estes estresses.

**Tabela 10** Resultados dos descritores área superficial foliar (AF), área superficial radicular (AR), peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco radicular (PSR) para os tratamentos em *Paspalum regnellii* nas quatro coletas realizadas. Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer.

	Coleta 1				Coleta 2				Coleta 3				Coleta 4			
	AF (cm <sup>2</sup> )	AR (cm <sup>2</sup> )	PSPA (g)	PSR (g)	AF (cm <sup>2</sup> )	AR (cm <sup>2</sup> )	PSPA (g)	PSR (g)	AF (cm <sup>2</sup> )	AR (cm <sup>2</sup> )	PSPA (g)	PSR (g)	AF (cm <sup>2</sup> )	AR (cm <sup>2</sup> )	PSPA (g)	PSR (g)
CSB	16,70f	63,90f	0,20e	0,8e	40,77d	119,00de	0,43ef	0,50ef	48,10de	124,53efg	0,70ef	0,53ef	50,70fg	213,70de	0,70fgh	1,13ef
C5	115,33cde	334,93bcde	1,87cd	1,93cd	221,75bc	810,90bc	3,50bcd	2,90bcd	143,60c	286,20cd	1,90cd	1,65cd	166,70bcde	532,05bc	1,90cde	3,25cd
C113	38,00ef	67,40f	0,40de	0,5e	27,65d	65,50e	0,25f	0,25f	22,20e	92,40efg	0,30f	0,20f	40,40fg	87,20ef	0,10h	0,10f
C115	38,75ef	131,85def	0,45de	0,78e	52,30d	192,33de	0,63ef	0,53ef	57,60de	122,50efg	0,85ef	0,45ef	67,80efg	159,23ef	0,83fgh	1,00ef
C127	26,80ef	89,97f	0,30e	1,05e	44,00d	124,60de	0,40ef	0,20f	44,30e	66,30fg	0,50f	0,35ef	54,48fg	200,98de	0,48gh	0,65ef
C139	33,03ef	114,47f	0,30e	0,67e	59,65d	134,60de	0,70ef	0,45ef	54,97de	75,73efg	0,80ef	0,53ef	58,27fg	180,93de	0,77fgh	1,00ef
SSB	186,50bc	578,31ab	3,30bc	3,5bc	208,00bc	751,80ab	2,50cde	2,30bcd	227,00bc	552,80b	3,80bc	2,40bcd	168,30bcde	737,05b	2,30cde	2,55cd
S5	298,83a	770,02a	5,87a	7,7a	376,50a	1009,70a	6,15a	5,50a	382,60a	1034,00a	6,70a	4,90a	388,30a	1415,60a	7,50a	9,30a
S113	185,75bc	499,23abcd	3,75b	3,65b	270,67ab	782,39ab	4,23abc	4,23ab	230,03bc	530,87b	3,97bc	3,20b	210,00bc	682,50b	3,95bc	3,95bcd
S115	231,50ab	575,60ab	3,50b	3,95b	242,38bc	592,40abcde	3,70bcd	3,03bc	259,80b	564,30b	4,75b	3,60ab	216bc	635,45bc	2,80bcde	4,80bc
S127	173,50bc	488,30abcde	3,45b	4,2b	217,60bc	661,50abc	3,75bcd	3,05bc	205,40bc	361,40bc	3,35c	2,65bc	276,25ab	879,45b	4,20b	5,65b
S139	196,67bc	506,42abc	3,43b	4,13b	310,67a	836,20ab	5,10ab	4,10ab	182,03bc	440,47bc	3,17c	2,30bcd	202,60bcde	755,55b	3,60bcd	4,95bc
ASB	23,00f	93,05f	0,35e	0,8e	40,40d	62,30e	0,35f	0,30ef	52,15de	101,10efg	0,70ef	0,55ef	67,50efg	147,40ef	1,00fgh	1,35ef
A5	84,25def	250,40bcdef	1,45cd	1,7cd	131,85cd	279bcde	1,85de	1,65cd	71,00de	176,80cde	1,25cd	1,05de	23,10g	51,05f	0,30gh	0,6ef
A113	28,00ef	112,00f	0,30e	0,9e	32,00d	101,60de	0,40ef	0,30ef	-	-	-	-	60,90efg	143,60ef	0,70fgh	0,80ef
A115	40,25ef	125,50ef	0,50de	0,75e	70,30d	276,40bcde	0,95ef	0,65ef	79,25de	245,70cd	0,85ef	0,81ef	77,60def	226,27de	0,87fgh	1,17ef
A127	44,85ef	143,65cdef	0,45de	0,75e	50,97d	150,00de	0,68ef	0,45ef	79,33de	148,6efg	1,02d	0,83ef	97,40def	219,70de	1,20efg	1,30ef
A139	33,67ef	115,67f	0,40de	0,83e	47,85d	124,15de	0,50ef	0,48ef	68,03de	109,20efg	0,87ef	0,80ef	85,05def	203,60de	0,95fgh	1,15ef
BSB	24,67ef	128,28def	0,40de	0,77e	35,10d	139,05de	0,43ef	0,43ef	23,00e	50,60fg	0,30f	0,30ef	35,52ef	155,73ef	0,48gh	0,80ef
B5	38,67ef	150,27cdef	0,63de	0,8e	73,43d	309,47bdce	0,50ef	0,97def	17,80e	42,00fg	0,30f	0,25f	67,50efg	206,60de	0,90fgh	1,00ef
B113	20,00f	54,20f	0,30e	0,3f	37,70d	51,20e	0,50ef	0,30ef	8,10e	12,20g	0,20f	0,10f	-	-	-	-
B115	30,67ef	103,73f	0,27e	0,67e	20,20d	68,60e	0,37f	0,23f	47,50de	59,07fg	0,63ef	0,47ef	74,20def	190,35de	0,90fgh	1,05ef
B127	34,05ef	82,06f	0,35e	0,55ef	52,50d	114,00de	0,50ef	0,40ef	27,67e	78,40efg	0,40f	0,33ef	48,70fg	136,10ef	0,50gh	0,60ef
B139	35,93ef	99,87f	0,60de	0,63e	61,35d	85,60e	0,70ef	0,50ef	40,38e	84,35efg	0,55f	0,53ef	38,67fg	87,50ef	0,77fgh	1,00ef



**Figura 26.** Resultado gráfico dos descritores área superficial foliar (AF) e área superficial radicular (AR), em barras relativas ao eixo esquerdo (cm<sup>2</sup>), e de peso seco de parte aérea (PSPA) e peso seco radicular (PSR), em linhas relativas ao eixo direito (g) dos tratamentos em *Paspalum regnellii* nas quatro coletas realizadas.



**Figura 27.** Exemplo da diferença de AF e AR entre tratamentos. A: tratamento C5 [solo sem adição de fonte de P + Bac 5 (*Acinetobacter* sp.)]; B: tratamento CSB (solo sem adição de fonte de P e sem adição de inóculo rizobacterianos). Fonte: próprio autor.

#### **5.4 Controle biológico de *Colletotrichum* sp.**

Os resultados relativos ao grau de severidade (GS) da doença antracnose em *Paspalum regnellii* para cada tratamento estão expostos na tabela 11.

**Tabela 11** Resultados do biocontrole de antracnose em *P. regnellii* pelo descritor grau de severidade da doença (GS), mostrando a variação de GS antes e após a inoculação do agente etiológico.

Tratamento	GS	Tratamento	GS	Varição GS
17 ( <i>Bacillus</i> sp.)	2,6def	17 + <i>Colletotrichum</i> sp.	4,55a	1,95
84 ( <i>Kitasatospora</i> sp./ <i>Streptomyces</i> sp.)	2,4ef	84 + <i>Colletotrichum</i> sp.	3,73abcd	1,33
111 ( <i>Amycolatopsis</i> sp.)	2,42ef	111 + <i>Colletotrichum</i> sp.	3,17bcdef	0,75
115 ( <i>Streptomyces</i> sp.)	2,00f	115 + <i>Colletotrichum</i> sp.	3,83abcd	1,83
125 ( <i>Paenibacillus</i> sp.)	2,58def	125 + <i>Colletotrichum</i> sp.	3,5abcde	0,92
133 ( <i>Kitasatospora</i> sp./ <i>Actinomycetia</i> sp.)	2,67cdef	133 + <i>Colletotrichum</i> sp.	4,2ab	1,53
135 ( <i>Streptomyces</i> sp.)	3,67abcde	135 + <i>Colletotrichum</i> sp.	3,92abc	0,25
Controle	2,00f	<i>Colletotrichum</i> sp.	4,67a	2,67

Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade ( $p < 0.05$ ) pelo teste de Tukey-Kramer

Apenas o tratamento com a Bac 111 (*Amycolatopsis* sp.) teve efeito significativo ( $p < 0.05$ ) no descritor GS da doença (3,17) em relação as médias do controle *Colletotrichum* (4,67) (figura 28). O gênero *Amycolatopsis* está entre os gêneros mais importantes do filo *Actinobacteria*, em termos biotecnológicos, devido à produção de antibióticos e compostos com atividade antifúngica (DOBASHI et al., 1988). García-López e colaboradores (2024) identificaram a produção de equinosporina, um composto antifúngico, em uma cepa de *Amycolatopsis* sp. que protegeu plantas de milho da colonização por *Fusarium graminearum*. Já foi relatado *Amycolatopsis* sp. exercendo efeito antagonista *in vivo* em maçã (SADEGHIAN et al., 2016). Porém, são poucos os estudos avaliando *Amycolatopsis* sp. como antagonista a *Colletotrichum* sp. e, até onde sabemos, este é o primeiro estudo explorando o potencial de actinobactérias como agentes de biocontrole do *Colletotrichum* sp. em *P. regnellii*.



**Figura 28** Exemplo de resultado do ensaio de biocontrole de *Colletotrichum* sp. em *Paspalum regnellii*, após 25 dias. **A:** tratamento com a inoculação do fungo fitopatogênico + Bac 111 (*Amycolatopsis* sp.); **B:** tratamento com a inoculação apenas do fungo fitopatogênico.

Dentre os tratamentos sem inoculação do fungo fitopatogênico, o tratamento Bac 135 (*Streptomyces* sp.) apresentou médias de GS (3,67) significativamente diferentes do controle sem inoculação de microrganismos (GS 2,00), indicando uma possível relação deletéria com a planta. Novamente, vale destacar a complexidade das interações planta-microrganismo, sendo que o mesmo microrganismo pode ser benéfico ou neutro a uma espécie vegetal e causar danos a outra do mesmo gênero e o gênero *Streptomyces* pode produzir tanto compostos com atividade antifúngica auxiliando a planta no combate a fitopatógenos quanto fitotoxinas, como a taxtomina, que gera lesões em tecidos de plantas (KLEINGESINDS & GALDEANO, 2012; LI et al., 2019). Porém, a taxa de variação entre as médias do descritor GS foi a menor no tratamento Bac 135 (*Streptomyces* sp.), um indício de seu potencial de controle do *Colletotrichum* sp., *in vivo*. Li e colaboradores (2021) descreveram uma cepa de *Streptomyces* sp., produzindo 8 compostos químicos com atividade antifúngica e antioxidante que foram capazes de controlar uma espécie de *Colletotrichum* sp. causando diminuição da taxa de germinação dos esporos do fungo *in vitro* e colapso em suas células *in vivo*. De fato, o gênero *Streptomyces* é muito conhecido por seu potencial de controle biológico e já foi estudado como agente de controle biológico de *Colletotrichum* sp. em morango, pimenta, inhame, pimentão, tomate-cereja e diversas outras culturas de interesse econômico (PALANIYANDI et al., 2011; KIM et al., 2014; HENG et al., 2015; LI et al., 2021; WANG et al., 2023). Como a

relação entre microrganismo-planta pode variar entre espécies vegetais para o mesmo microrganismo, sugere-se o estudo do controle biológico de *Colletotrichum* sp. por Bac 135 (*Streptomyces* sp.) em outras plantas.

Os tratamentos com Bac 17 (*Bacillus* sp.), Bac 84 (*Kitasatospora* sp./*Streptomyces* sp.), Bac 115 (*Streptomyces* sp.), Bac 125 (*Paenibacillus* sp.) e Bac 133 (*Kitasatospora* sp./*Actinomyces* sp.) não apresentaram efeitos significativos, embora tenham mostrado potencial de atividade antagônica a *Colletotrichum* sp. *in vitro*. Diversos estudos já relataram a diferença de concentrações de extratos bacterianos para inibição de *Colletotrichum* sp. *in vitro* e *in vivo* (JI et al., 2018; LI et al., 2021). A variação na atividade antifúngica pode estar ligada às diferentes condições de crescimento microbiano *in vitro* e *in vivo*, que podem variar em termos de fonte de carbono, nutrientes, pH e outros fatores, bem como aos métodos de inoculação (XU et al., 2018). Além disso, os fitopatógenos podem se adaptar melhor ao ambiente de crescimento nas plantas hospedeiras *in vivo*, levando a necessidade de uma maior produção de metabólitos bacterianos para inibir seu crescimento (GONG et al., 2016).

## 6 CONCLUSÕES

As rizobactérias associadas a *P. vaginatum*, 29 (*Pseudomonas* sp.), 34 (*Priestia* sp./*Bacillus* sp.), 115 (*Streptomyces* sp.), 127 (*Dyella* sp.) e 139 (*Agrobacterium* sp./*Rhizobium* sp.), assim como o inoculante BiomaPhos®, não promoveram aumento de biomassa seca em *P. regnellii* em condições de ausência de fertilização em solo misturado a substrato, sem calagem.

O isolado 115 (*Streptomyces* sp.) apresentou efeitos deletérios sobre a produção de biomassa seca de raiz e folhas em *P. regnellii* em condições de ausência de fertilização em solo misturado a substrato, sem calagem.

Os isolados 5 (*Acinetobacter* sp.), 113 (*Burkholderia* sp.) e 115 (*Streptomyces* sp.) foram capazes de solubilizar fosfato *in vitro* a partir de rocha fosfática Araxá, rocha fosfática Bayovar e fosfato de cálcio.

O isolado 115 (*Streptomyces* sp.) aumentou significativamente a taxa de emergência de *P. regnellii* em solo calcariado.

A inoculação dos isolados 5 (*Acinetobacter* sp.), 113 (*Burkholderia* sp.), 115 (*Streptomyces* sp.), 127 (*Dyella* sp.) e 139 (*Agrobacterium* sp./*Rhizobium* sp.) em conjunto com a adição de fertilizante supertríplo fosfato mitigou o efeito deletério do fertilizante na taxa de emergência das sementes de *P. regnellii*.

O isolado 113 (*Burkholderia* sp.) aumentou significativamente a taxa de emergência de *P. regnellii* em solo com adição de supertríplo fosfato, mas gerou efeitos deletérios significativos em solos sem adição de fontes de P ou com adição de rocha Araxá e rocha Bayovar.

O isolado 5 (*Acinetobacter* sp.) aumentou significativamente altura, número de perfilhos e número de folhas totalmente expandidas, área foliar, área radicular, peso seco de parte aérea e peso seco radicular no crescimento inicial de *P. regnellii* em solo sem adição de fonte de P e solo com adição de supertríplo fosfato, acelerando o perfilhamento e desenvolvimento da planta.

O isolado 111 (*Amycolatopsis* sp.) foi capaz de mitigar significativamente o grau de severidade da antracnose causada por *Colletotrichum* sp. em *P. regnellii*.

## 7 REFERÊNCIAS

ABIEC (2022) Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. Beef report: Perfil da pecuária no Brasil. <https://www.abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2022/>.

ACUÑA, C.A., MARTÍNEZ, E.J., ZILLI, A.L., BRUGNOLI, E.A., ESPINOZA, F., MARCÓN, F., URBANI, M.H., QUARIN, C.L. (2019) Reproductive systems in *Paspalum*: relevance for germplasm collection and conservation, breeding techniques, and adoption of released cultivars. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1377. doi: 10.3389/fpls.2019.01377.

ADHIKARI, A., KHAN, M. A., LEE, K. E., KANG, S. M., DHUNGANA, S. K., BHUSAL, N., & LEE, I. J. (2020) The halotolerant rhizobacterium—*Pseudomonas koreensis* MU2 enhances inorganic silicon and phosphorus use efficiency and augments salt stress tolerance in soybean (*Glycine max* L.). *Microorganisms*, 8(9), 1256. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091256>

AFANADOR-KAFURI, L., GONZÁLEZ, A., GAÑÁN, L., MEJÍA, J. F., CARDONA, N., & ALVAREZ, E. (2014) Characterization of the *Colletotrichum* species causing anthracnose in Andean blackberry in Colombia. *Plant Disease*, 98(11), 1503-1513. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0752-RE>

AMARAL, M. B., RIBEIRO, T. G., ALVES, G. C., COELHO, M. R. R., MATTA, F. D. P., BALDANI, J. I., & BALDANI, V. L. D. (2021) The occurrence of rhizobacteria from *Paspalum* genotypes and their effects on plant growth. *Scientia Agricola*, 79. <https://doi.org/10.1590/1678-992X-2020-0240>

ANDERSON, W. F., GATES, R. N., HANNA, W. W., BLOUNT, A. R., MISLEVY, P., EVERS, G. (2009) Recurrent Restricted Phenotypic Selection for Improving Stand Establishment of Bahiagrass. *Crop Science*, 49(4), 1322-1327. Doi:10.2135/cropsci2008.09.0556.

ANDRADE, F. M. E. D. (2003) Produção de forragem e valor alimentício do capim-marandu submetido a regimes de lotação contínua por bovinos de corte. Tese, Universidade de São Paulo.

ARAÚJO, A. Á. DE. (1971) Principais gramíneas do Rio Grande do Sul (agrostologia rio-grandense). *Sulina*. 251p.

ASTORGA-ELÓ, M. et al. (2021) Rhizobacteria from ‘flowering desert’ events contribute to the mitigation of water scarcity stress during tomato seedling germination and growth. *Science Reports* 11, 13745. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93303-8>

BARRETO, N. D. S., DUDA, G. P., OLIVEIRA, C. J., ALMAIDA JÚNIOR, A. B., MENDES, A. M. S. (2007) Uso de fosfatos com diferentes solubilidades no conteúdo de macronutrientes da cultura do milho em dois ciclos de cultivo. XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 1, 1–5.

BARRO, R. S. (2011) Respostas morfofisiológicas e produtivas de genótipos forrageiros nativos em diferentes condições de luminosidade. Tese, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

BARRO, R. S. et al. (2012) Forage yield and nitrogen nutrition dynamics of warm-season native forage genotypes under two shading levels and in full sunlight. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(7), 1589–1597. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000700006>

BARROS, J. D. S. et al. (2022) Correlation of shear strength and physicochemical properties as a criterion for the selection of accessions of *Paspalum* grasses. *Acta Scientiarum Agronomy*, 45, e56280. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v45i1.56280>

BASHAN, Y., KAMNEV, A.A. & DE-BASHAN, L.E. (2013) Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. *Biology and Fertility of Soils* 49, 465–479. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0737-7>

BATISTA, L. A. R. & GODOY, R. (1998) Capacidade de produção de sementes em acessos do gênero *Paspalum*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 27(5), 841-847.

BATISTA, L., MEIRELLES, P. D. L., & GODOY, R. (2005) Produção e qualidade da forragem em acessos selecionados de " *Paspalum*" na região Central do Estado de São Paulo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 42, Goiânia. A Produção animal e o foco no agronegócio: anais. Goiânia: SBZ..

BECH, J., SUAREZ, M., REVERTER, F., TUME, P., SÁNCHEZ, P., BECH, J., LANSAC, A. (2010) Selenium and other trace elements in phosphate rock of Bayovar–Sechura (Peru). *Journal of Geochemical Exploration*, 107(2), 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2009.08.004>

BELONI, T., PEZZOPANE, C.D.G., ROVADOSCKI, G.A., FÁVERO, A.P., DIAS-FILHO, M.B., SANTOS, P.M. (2017) Morphological and physiological responses and the recovery ability of *Paspalum* accessions to water deficit and waterlogging. *Grass and Forage Science*, 72(4), 840-850. <https://doi.org/10.1111/gfs.12281>

BORTOLIN, G. S. (2016) Estudo da promoção da germinação de sementes e desenvolvimento inicial em *Paspalum regnellii* Mez. Dissertação. Universidade Federal de Santa Maria.

BORTOLIN, G. S., FACCO, F. B., OLIVEIRA, J. C. P., KÖPP, M., & DA SILVA, A. C. F. (2015) Influência de métodos de superação de dormência na germinação de sementes de *Paspalum regnellii* Mez. XIX SEPE: Simpósio de Pesquisa e Extensão.

BORTOLIN, G. S., SARI, B. G., OLIVEIRA, J. C. P., KOPP, M. M., VEY, R. T., PEDROSO, C. E. da S., DAL'COL LÚCIO, A., SILVA (2019) Nonlinear modeling proposal for the germination performance of *Paspalum regnellii* seeds: a species with forage potential in Brazil. *Australian Journal of Crop Science*, 13(8), 1244-1250. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.755349093215837>

BRASIL. MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL - DNPM. (2018) Sumário Mineral Brasileiro 2018. Disponível em: <http://www.anm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/sumário-mineral/sumario-mineral-brasileiro-2018>, acessado em maio de 2024.

BRITO, L. E. M., DA MATA REZENDE, A. L. A., DA SILVA, C. O. C., DA SILVA, H. D., DA SILVA, C. D. R., & DA LUZ, J. H. S. (2022) Desenvolvimento e nutrição inicial do milho com inoculação do BiomaPhos® associado a fontes fosfatadas. *Agri-environmental sciences*, 8(2), 12-12. <https://doi.org/10.36725/agries.v8i2.7926>

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

CANTARELLA, H. et al. (1994) Lime effect on soil N availability indexes as measured by plant uptake. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 25(7-8), 989-1006. <https://doi.org/10.1080/00103629409369093>

CARDOSO, V. J. (2004) Dormência: estabelecimento do processo. In *Germinação: Do básico ao Aplicado*; Ferreira, A.G., Borghetti, F., Eds. Porto Alegre: Artmed, 95-108.

CORDELL, D., DRANGERT, J.O., WHITE, S. (2009) The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292-305. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>.

COSTA, N. D. L., TOWNSEND, C. R., MAGALHÃES, J. A., & PEREIRA, R. D. A. (1997) Avaliação agrônômica de genótipos de *Paspalum* em Rondônia. *Embrapa Rondônia, Comunicado Técnico 141*, 1-4. ISSN: 0103-9458.

CROIZER, A. et al. (2001) Biosynthesis of hormones and elicitor molecules. In: BUHANAN, B. B., GUISSEM, W., RUSSEL, L. J. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 850-929.

CROUCH JA, CLARKE BB, WHITE JF JR, HILLMAN BI. (2009) Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. *Mycologia*, 101, 717–732. <https://doi.org/10.3852/08-230>

CROUCH, J. A., & BEIRN, L. A. (2009) Anthracnose of cereals and grasses. *Fungal Diversity*, 39, 19.

CROUCH, J. A., CLARKE, B. B., WHITE, J. F. Jr., HILLMAN, B. I. (2009) Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses. *Mycologia*, 101, 717–732. <https://doi.org/10.3852/08-230>

CRUZ, G. M. et al. (2006) Produção de forragem e desempenho de bovinos em pastagens de “*Paspalum regnellii*” submetidas ao manejo intensivo. In: *Anais da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 43ª. João Pessoa, PB.

CUNHA, M.K. (2015) Estabelecimento de pastagens cultivadas no Cerrado brasileiro: uma visão sistêmica do processo. 1ª ed. Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas. 62p. ISSN: 2318-1400.

DE AMARAL LEITE, A. et al. (2020) Selected bacterial strains enhance phosphorus availability from biochar-based rock phosphate fertilizer. *Annals of Microbiology*, 70, 6. <https://doi.org/10.1186/s13213-020-01550-3>

DE MORAES, A. C. P., LISBOA, P. H. G., DA SILVA RIBEIRO, L., DE CAMARGO, E. R., & LACAVALA, P. T. (2023) Plant growth-promoting microbes and nanoparticles: Biotechnological potential in agrobiological systems. In *Microbial Inoculants*, Academic Press, 183-206. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99043-1.00014-1>

DE MORAES, A. C. P., RIBEIRO, L. da S., DE CAMARGO, E. R., & LACAVALA, P. T. (2021) The potential of nanomaterials associated with plant growth-promoting bacteria in agriculture. *3 Biotech*, 11(7). doi:10.1007/s13205-021-02870-0

DE PAULA, A.F. et al. (2022) Endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and its potential for plant growth promotion with different phosphate sources. *Frontiers in plant science*, 13, 884716. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.884716>

DIAGNE, N. et al. (2020) Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) on salt stress tolerance of *Casuarina obesa* (Miq.). *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4, 601004. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.601004>

DIAS FILHO, M.B. (1987) Espécies forrageiras e estabelecimento de pastagens na Amazônia. Embrapa CPATU, Documentos, 46. ISSN: 0101-2835.

DIAS, E.G., LAJOLO, R.D. (2010) O meio ambiente na produção de fertilizantes fosfatados no Brasil. In: *Agrominerais para o Brasil*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 105–124. ISBN 978-85-61121-61-7.

DOBASHI, K., MATSUDA, N., HAMADA, M., NAGANAWA, H., TAKITA, T., & TAKEUCHI, T. (1988) Novel antifungal antibiotics octacosamicins A and B I. taxonomy, fermentation and isolation, physico-chemical properties and biological activities. *The Journal of Antibiotics*, 41(11), 1525-1532. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.41.1525>

DOMÍNGUEZ-CASTILLO, C. et al. (2021) Potential seed germination-enhancing plant growth-promoting rhizobacteria for restoration of *Pinus chiapensis* ecosystems. *Journal of forestry Research*, 32, 2143-2153. <https://doi.org/10.1007/s11676-020-01250-3>

DUCA, D. et al. (2014) Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 106, 85-125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>

DUNCAN, R. R., & CARROW, R. N. (2005) Managing seashore paspalum greens. *Golf Course Management*, 73(2), 114-118.

ELHAISOUI, W., GHOULAM, C., BARAKAT, A., ZEROUAL, Y., & BARGAZ, A. (2022) Phosphate bacterial solubilization: a key rhizosphere driving force enabling higher P use efficiency and crop productivity. *Journal of Advanced Research*, 38, 13-28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.08.014>

FINK, J. R., INDA, A. V., BAVARESCO, J., BARRÓN, V., TORRENT, J., BAYER, C. (2016) Adsorption and desorption of phosphorus in subtropical soils as affected by management system and mineralogy. *Soil and Tillage Research*, 155, 62-68. <https://doi.org/10.1016/j.still.2015.07.017>

GARCÍA-LÓPEZ, H. et al. (2024) Proteomic and metabolomic analysis reveals that *Amycolatopsis* sp. BX17 synthesizes antifungal metabolites against *Fusarium graminearum* through the shikimate pathway. *Biological Control*, 189, 105445. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2024.105445>

GERHARDSON, B. (2002) Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*, 8, 338–343. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02021-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02021-8)

GOEDERT, W. J. (1983) Management of the cerrado soils of Brazil: a review. *Journal of Soil Science*, 34(3), 405–428. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.1983.tb01045.x>

GOMES, E. A., SILVA, U. D. C., MARRIEL, I. E., DE OLIVEIRA, C. A., & LANA, U. G. D. P. (2014) Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. *Revista brasileira de Milho e Sorgo*, 13(1), 69-81. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v13n1p69-81>

GOMES, M. J. I. R. (1995) Estudos taxonomicos no genero *Paspalum* L., grupos "Virgata" e "Quadrifaria" no Brasil. Tese. Universidade Estadual de Campinas.

GONG, L., TAN, H., CHEN, F., LI, T., ZHU, J., JIAN, Q., YUAN, D., XU, L., HU, W., & JIANG, Y. (2016) Novel synthesized 2, 4-DAPG analogues: antifungal activity, mechanism and toxicology. *Science Reports*, 6, 32266. <https://doi.org/10.1038/srep32266>.

GRAHAM, P.H., VANCE, C.P. (2003) Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, 131: 872-877. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.017004>.

GUARNACCIA, V., MARTINO, I., GILARDI, G., GARIBALDI, A., & GULLINO, M. L. (2021) *Colletotrichum* spp. causing anthracnose on ornamental plants in northern Italy. *Journal of Plant Pathology*, 103, 127-137. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00684-2>

GULATI, A. et al. (2010) Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Archives of Microbiology* 192, 975–983. <https://doi.org/10.1007/s00203-010-0615-3>

HALING, R. E. et al. (2018) Differences in nutrient foraging among *Trifolium subterraneum* cultivars deliver improved P-acquisition efficiency. *Plant Soil* 424: 539–54. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3511-7>.

HAN, J. H., SHIM, H., SHIN, J. H., & KIM, K. S. (2015) Antagonistic activities of *Bacillus* spp. strains isolated from tidal flat sediment towards anthracnose pathogens *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in South Korea. *The Plant Pathology Journal*, 31(2), 165. doi: [10.5423/PPJ.OA.03.2015.0036](https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.03.2015.0036)

HARDIANSYAH, M. Y. et al. (2020) Bio-priming seeds with PGPR of bamboo rhizosphere in cocoa (*Theobroma cacao* L.) seeds germination. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences* Vol, 7(3). ISSN: 2347-7520.

HAVLIN, J. et al. (1999) Soil fertility and fertilizers: an introduction nutrient management. Upper Saddle River: Prentice Hall. 499p. ISBN: 9780429445552.

HE, D., & WAN, W. (2021) Phosphate-solubilizing bacterium *Acinetobacter pittii* gp-1 affects rhizosphere bacterial community to alleviate soil phosphorus limitation for growth of soybean (*Glycine max*). *Frontiers in Microbiology*, 12, 737116. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737116>

HENG, J. L. S., SHAH, U. K., RAHMAN, N. A. A., SHAARI, K., & HAMZAH, H. (2015) *Streptomyces ambofaciens* S2—A potential biological control agent for *Colletotrichum gloeosporioides* the causal agent for anthracnose in red chilli fruits. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* S, 1(2). <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.S1-006>

HERMANS, C. et al. (2006) How do plants respond to nutrient shortage by biomass allocation? *Trends in Plant Science*, 11, 610–617. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.10.007>

HUGHES, N. R. G., VALLE, C. B., SABATEL, V. O., BOOCK, J., JESSOP, N. S., & HERRERO, M. (2000) Shearing strength as an additional selection criterion for quality in *Brachiaria* pasture ecotypes. *The Journal of Agricultural Science*, 135(2), 123-130. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859699008084>

LI, H. P. et al. (2023) Roles of phosphate-solubilizing bacteria in mediating soil legacy phosphorus availability. *Microbiological Research*, 127375. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127375>

IBIENE, A. A., AGOGBUA, J. U., OKONKO, I. O., & NWACHI, G. N. (2012) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as biofertilizer: Effect on growth of *Lycopersicon esculentus*. *Journal of American Science*, 8(2), 318-324. ISSN: 1545-1003

INDIRAGANDHI, P. et al. (2008) Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of Diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: *Plutellidae*). *Current Microbiology*, 56, 327-333. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9086-4>

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) (2017) Censo agropecuário 2017. Rio de Janeiro: IBGE, 108 p. Disponível em: [https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo\\_agro/resultadosagro/index.html](https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/index.html)

JEGER, M., & PLUMBLEY, R. A. (1990) The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. *Plant Pathology*, 39, 343-366.

Jl, D., CHEN, T., MA, D., LIU, J., XU, Y., TIAN, S. (2018) Inhibitory effects of methyl thujate on mycelial growth of *Botrytis cinerea* and possible mechanisms. *Postharvest Biology and Technology* 142, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.04.003>

JISHA, M. S., LINU, M. S., & SREEKUMAR, J. (2018) Induction of systemic resistance in chilli (*Capsicum annum* L.) by *Pseudomonas aeruginosa* against anthracnose pathogen *Colletotrichum capsici*. *Journal of Tropical Agriculture*, 56(2). Disponível em: <https://jtropag.kau.in/index.php/ojs2/article/view/586>

KANG, S.M. et al. (2009) Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnology Letters*, 31, 277-281. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9867-2>

KIM, H. J., LEE, E. J., PARK, S. H., LEE, H. S., & CHUNG, N. (2014) Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in pepper and cherry tomato by *Streptomyces* sp. A1022. *Journal of Agricultural Science*, 6(2), 54. <http://dx.doi.org/10.5539/jas.v6n2p54>

KIM, Y., JORDAN, D., MCDONALD, G. A. (1998) Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*, 26, 79–87. <https://doi.org/10.1007/s003740050347>

KIST, B.B., SANTOS, C.E., CARVALHO, C., BELING, R.R. (2019) Anuário brasileiro de sementes 2019. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul, Brazil. Disponível em: [https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2019/08/SEMENTES\\_2019.pdf](https://www.editoragazeta.com.br/sitewp/wp-content/uploads/2019/08/SEMENTES_2019.pdf). Acesso em maio de 2024.

KLEINGESINDS, C. K., & GALDEANO, D. M. (2012) Microrganismos x Planta: guerra ou parceria? In: *Botânica no Inverno 2013 / Org. de Alejandra Matiz Lopez... [et al.]*. – São Paulo : Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 42-51. ISBN 978-85-85658-36-6.

KUCEY, R. M. N., JANZEN, H. H., & LEGGETT, M. E. (1989) Microbially mediated increases in plant-available phosphorus. *Advances in agronomy*, 42, 199-228. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60525-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60525-8)

LACAVAL, P. T., MACHADO, P. C., DE ANDRADE, MARQUES, P. H. (2021) Phosphate solubilization by endophytes from the tropical plants. In: Sustainable Development and Biodiversity. 26ed. Springer Nature Switzerland AG: Springer International Publishing, 3, 207-226. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-65447-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-65447-4_9)

LACAVAL, P.T., BOGAS, A.C, CRUZ, F.P.N. (2022) Plant Growth Promotion and Biocontrol by Endophytic and Rhizospheric Microorganisms From the Tropics: A Review and Perspectives. *Frontiers In Sustainable Food Systems*, 6, 796113. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2022.796113>

LAMICHHANE, J. R., DÜRR, C., SCHWANCK, A. A., ROBIN, M.-H., SARTHOU, J.-P., CELLIER, V., ET AL. (2017) Integrated management of damping-off diseases. a review. *Agronomy for Sustainable Development*. 37, 1–25. doi: 10.1007/s13593-017-0417-y

LEI, L. et al. (2021) Microbial succession and molecular ecological networks response to the addition of superphosphate and phosphogypsum during swine manure composting. *Journal of Environmental Management*, 279, 111560. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111560>

LI, X., JING, T., ZHOU, D., ZHANG, M., QI, D., ZANG, X., et al. (2021) Biocontrol efficacy and possible mechanism of *Streptomyces* sp. H4 against postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae* on strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 175, 111401. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111401>

LI, Y., LIU, J., DÍAZ-CRUZ, G., CHENG, Z., & BIGNELL, D. R. (2019) Virulence mechanisms of plant-pathogenic *Streptomyces* species: an updated review. *Microbiology*, 165(10), 1025-1040. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000818>

LIU, X. et al. (2019) A newly discovered ageing-repair bacterium, *Pseudomonas geniculata*, isolated from rescuegrass (*Bromus cartharticus* Vahl) promotes the germination and seedling growth of aged seeds. *Botany*, 97(3), 167-178. <https://doi.org/10.1139/cjb-2018-0151>

MAN, J., TANG, B., DENG, B., LI, J.-H., HE, Y.-J., ZHANG, J.-L. Isolation, screening and beneficial effects of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in the rhizosphere of *Leymus chinensis*. *Acta Prataculturae Sin.* 2021, 30, 59–71. Doi:[10.11686/cyxb2020321](https://doi.org/10.11686/cyxb2020321)

MARGENOT A, SINGH BR, RAO IM & SOMMER R. (2012) Phosphorus fertilization and management in soils of Sub-Saharan Africa. *Soil Phosphorus*. CRC Press 2017, 151–208. doi: <https://doi.org/10.1201/9781315372327-9>.

MARRA, L. M. et al. (2021) Biological nitrogen fixation and fosfato solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and Soil*, 357(1-2), 289-307. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1157-z>

MARIN-FELIX Y. et al. (2017) Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology*, 86, 99–216. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>

MARSCHNER, H. (1995) Rhizosphere pH effects on phosphorus nutrition. Genetic manipulation of crop plants to enhance integrated nutrient management in cropping systems, 1, 107-115.

MEIRELLES, P. D. L., BATISTA, L. A. R., COSTA, C., DA SILVA, M. G. B., FACTORI, M. A., DA SILVEIRA, J. P. F., CAVASANO, F. A. (2013) Germplasm of *Paspalum* genus with production potential for foraging. *Bioscience Journal*, 29 (Supplement 1), 1587-1595. ISSN: 1981-3163.

MELAMED, R., GASPAR, J.C., MIEKELEY, N. (2009) Pó-de-rocha como fertilizante alternativo para sistemas de produção sustentáveis em solos tropicais. In: LAPIDO-LOUREIRO, F.E., MELAMED, R., FIGUEIREDO NETO, J. (Eds.) Fertilizantes agroindústria e sustentabilidade. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 385–395.

MENDES, I. D. C., & DOS REIS JÚNIOR, F. B. (2003) Microorganismos e disponibilidade de fósforo (P) nos solos: uma análise crítica. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados: Documentos, 85, 26 p. ISSN: 1517-5111.

MENDOZA-ARROYO, G. E. et al. (2020) Inorganic phosphate solubilization by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and its application potential as biofertilizer. *Agriculture*, 10(9), 383. <https://doi.org/10.3390/agriculture10090383>

MUJUMDAR, S. et al. (2023) *Acinetobacter*: A versatile plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). In *Plant-Microbe Interaction-Recent Advances in Molecular and Biochemical Approaches*, Academic Press, 327-362. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91875-6.00009-8>

MURPHY J., RILEY J.P. (1962) A modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Analytical Chemistry Acta*, 27, 31-36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)

NAUTIYAL, C. S. (1999) An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 170, 265-270. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>

NOVAIS, R. F. et al. (2007) Fósforo. In: NOVAIS, R. F. et al. (Eds.). *Fertilidade do solo*. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 471-550.

NOVO, P.E., et al. (2016) Interspecific hybrids between *Paspalum plicatulum* and *P. oteroi*: a key tool for forage breeding. *Scientia Agricola*, 73, 356–362. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0218>

OLIVEIRA, C. M. B., GATIBONI, L. C., ERNANI, P. R., BOTT, G., BRUNETTO, G. (2015) Capacidade de predição da disponibilidade de fósforo em solo com aplicação de fosfato solúvel e natural. *Científica*, 413–419. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2015v43n4p413-419>

OLIVEIRA, J. C. P., BORTOLIN, G. S., KOPP, M. M. (2013) Metodologia para testes de germinação de *Paspalum regnellii* Mez. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 18, Florianópolis. Anais, São Paulo: Informativo Abrates.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. (2020) Viabilidade técnica e econômica do BiomaPhos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja. *Embrapa Milho e Sorgo. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, 210. 20p. ISSN 1679-0154.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. (2021) Validação da recomendação para o uso do inoculante BiomaPhos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) na cultura de soja. *Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica*, 279. 18p. ISSN 1679-1150.

OMOTE, H. de S.G., CASTRO, L.M. de, GRACIANO, V.A., SANTOS, R.C. dos, SOUZA, J.D.F. de, VAZ, A.P.A., ARAUJO, A.R. de, SALMAN, A.K.D., BUENO, L.G., KOPP, M.M., ANTONIO, R.P., EUCLIDES, V.P.B., GUARDA, V.D.A., SANTOS, P.M. (2021) Monitoramento tecnológico de cultivares de forrageiras no Brasil. *Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos*, 139. 34 p. ISSN: 1980-6841.

ORTIZ, J.P.A., PUPILLI, F., ACUÑA, C.A., LEBLANC, O., PESSINO, S.C. (2020) How to become an apomixis model: the multifaceted case of *Paspalum*. *Genes*, 11, 974. doi: 10.3390/genes11090974.

OWEN, D., WILLIAMS, A., GRIFFITH, G., WITHERS, P. (2015) Use of commercial bioinoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology*, 86, 41-54. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>.

PACIULLO, D. S. C. (2002) Características anatômicas relacionadas ao valor nutritivo de gramíneas forrageiras. *Ciência Rural*, 32, 357-364. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782002000200029>

PALANIYANDI, S. A. et al. (2011) Biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in yam by *Streptomyces* sp. MJM5763. *Journal of applied microbiology*, 111(2), 443-455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05048.x>

PAULUS, J. M., & TOOY, D. (2024) Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Growth and Yield of Soybean. *Journal of Agriculture*, 3(01), 30-38. <https://doi.org/10.47709/joa.v3i01.3613>

PEIX, A. et al. (2009) *Acinetobacter* strains IH9 and OCI1, two rhizospheric phosphate solubilizing isolates able to promote plant growth, constitute a new genomovar of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Systematic and applied microbiology*, 32(5), 334-341. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2009.03.004>

PÉREZ-GARCÍA, L. A. et al. (2023) Plant-growth-promoting rhizobacteria improve germination and bioactive compounds in cucumber seedlings. *Agronomy*, 13(2), 315. <https://doi.org/10.3390/agronomy13020315>

PRIMAVESI, A. C. et al. (2006) Nutrientes na fitomassa de capim-marandu em função de fontes e doses de nitrogênio. *Ciência e Agrotecnologia*, 30, 562-568. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000300024>

PRIMAVESI, O., PRIMAVESI, A.C., BATISTA, L.A.R., GODOY, R. (2008) Adubação e produção de *Paspalum* em dois níveis de fertilidade de Latossolo Vermelho-Amarelo: estabelecimento e manutenção. *Ciência e agrotecnologia*, 32, 242-250. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000100035>

PROCHNOW, L. I., QUISPE, J. F. S., FRANCISCO, E. A. B., BRAGA, G. (2006) Effectiveness of phosphate fertilizers of different water solubilities in relation to soil phosphorus adsorption. *Scientia Agricola*, 63, 333-340. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000400004>

PUPAKDEEPAN, W., TERMSUNG, N., RUANGWONG, O. U., & KUNASAKDAKUL, K. (2023) Plant growth promoting and colonization of endophytic *Streptomyces albus* CINv1 against strawberry anthracnose. *Horticulturae*, 9(7), 766. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9070766>

RAVA C.A. (1984) Patogenicidade de isolamentos de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 19, 445-448.

REDDY, K. R. et al. (2005) Biogeochemistry of phosphorus in wetlands. *Phosphorus Agric. Environ.* John Wiley & Sons, Ltd, 263–316. Doi:10.2134/agronmonogr46.c9.

REIS, H. P. G. et al. (2022) Role of slow-release phosphate nanofertilizers in forage nutrition and phosphorus lability. *ACS Agricultural Science & Technology*, 2(3), 564-572. <https://doi.org/10.1021/acsagscitech.2c00012>

RESENDE, A.V., FURTINI NETO, A.E., ALVES, V.M.C., MUNIZ, J.A., CURTI, N., LAGO, F.J. (2006) Resposta do milho a fontes e modos de aplicação de fósforo durante três cultivos sucessivos em solo da região do cerrado. *Ciência e Agrotecnologia*, 30(3): 458–466. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542006000300011>

RICHARDSON, A. E. (2001) Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Functional Plant Biology*, 28(9), 897-906. <https://doi.org/10.1071/PP01093>

RICHARDSON, A.E. (1994) Soil microorganisms and phosphorus availability. In *Soil Biota: Management in Sustainable Farming Systems*, CSIRO Information Services: Melbourne, Australia, 50–62. ISBN: 978-0-643-05599-5.

SADEGHIAN, M., BONJAR, G. H. S., & SIRCHI, G. R. S. (2016) Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne *Actinomyces* and molecular identification of the active antagonist. *Postharvest Biology and Technology*, 112, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.09.035>

SANDANI, H. B. P., RANATHUNGE, N. P., LAKSHMAN, P. L. N., & WEERAKOON, W. M. W. (2019) Biocontrol potential of five *Burkholderia* and *Pseudomonas* strains against *Colletotrichum truncatum* infecting chilli pepper. *Biocontrol Science and Technology*, 29(8), 727-745. <https://doi.org/10.1080/09583157.2019.1597331>

SARDI, K. & BERES, I. (1996) Effects of fertilizer salts on the germination of corn, winter wheat, and their common weed species, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 27(5-8), 1227-1235. doi: 10.1080/00103629609369628

SAS/STAT (2024) Release: 3.81 (Enterprise Edition). SAS on Demand for Academics. SAS Institute Inc.

SCHRAUF, G. E., CORNAGLIA, P. S., DEREGIBUS, V. A., RISSOLA, M. G. (1995) Improvement in germination behaviour of *Paspalum dilatatum* Poir. seeds under different pre-conditioning treatments. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 38, 501-509. <https://doi.org/10.1080/00288233.1995.9513152>

SCHUELER, T. A., DOURADO, M. L., RIZZO, A. C. L. (2019) Processos biotecnológicos para a solubilização de rochas fosfáticas: o estado da arte. CETEM/MCTIC, Rio de Janeiro, 45p. ISBN 978-85-8261-105-0.

SHEN, J. et al. (2011) Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant physiology*, 156(3), 997-1005. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175232>

SILVA, U. C., CUADROS-ORELLANA, S., SILVA, D. R., FREITAS-JÚNIOR, L. F., FERNANDES, A. C., LEITE, L. R., OLIVEIRA, C.A & DOS SANTOS, V. L. (2021) Genomic and phenotypic insights into the potential of rock phosphate solubilizing bacteria to promote millet growth *in vivo*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 574550. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.574550>

SORATTO, R. P. et al. (2003) Millet seeds mixed with phosphate fertilizers. *Scientia Agricola*, 60, 573-579. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162003000300024>

SOUCHIE, E. L., ABOUD, A. C. D. S., & CAPRONI, A. L. (2007) Solubilização de fosfato *in vitro* por microorganismos rizosféricos de guandu. *Biosci. J., Uberlândia*, 23(2), 53-60.

SOUSA, D. M. G. de, & LOBATO, E. (2004) Cerrado: correção do solo e adubação. 2ed. Brasília, DF: Embrapa Cerrados, 416p. ISBN: 8573832304.

SOUZA, A. E., FONSECA, D. S. (2009) Fosfato Série Estatística e Economia Mineral - Mineração para o Agronegócio Agência Nacional de Mineração. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/dnpm/publicacoes/serie-estatisticas-e-economia-mineral/outras-publicacoes-1/7-2-fosfato>. Acesso em 20 de maio de 2024.

STEFAN, M. et al. (2008) Plant growth promoting rhizobacteria can inhibit the *in vitro* germination of *Glycine max* L. seeds. *Journal of Experimental and Molecular Biology*, 9(3).

STRAATEN, P. VAN. (2010) Rochas e minerais como fertilizantes alternativos na agricultura: uma experiência internacional. In: *Agrominerais para o Brasil*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 52, 235–264. ISBN: 978-85-61121-61-7.

TAIZ, L., ZEIGER, E., MØLLER, I.M., MURPHY, A. (2017) *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Porto Alegre, RS, Artmed Editora. 858p.

TERRY, R. A., & TILLEY, J. M. A. (1964) The digestibility of the leaves and stems of perennial ryegrass, cocksfoot, timothy, tall fescue, lucerne and sainfoin, as measured by an *in vitro* procedure. *Grass and Forage Science*, 19(4), 363-372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.1964.tb01188.x>

THAKUR, R. P. et al. (1998) Pathogenic and genetic characterization of six Indian populations of *Colletotrichum sublineolum*, the causal agent of sorghum anthracnose. *Indian Phytopathology*, 51(4), 338-348. Disponível em: <http://oar.icrisat.org/id/eprint/1722>

URECHE, M. A. L. et al. (2021) Rhizobacteria improve the germination and modify the phenolic compound profile of pepper (*Capsicum annum* L.). *Rhizosphere*, 18, 100334. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100334>

VAN RAIJ, B., QUAGGIO, J. A., SILVA, N. M. (1986) Extraction of phosphorus, potassium, calcium, and magnesium from soils by an ion-exchange resin procedure. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 17(5), 547–566. <https://doi.org/10.1080/00103628609367733>

VARELLA, A. C. et al. (2009) Screening native and cultivated tropical pastures for silvipastoral systems in Southern Brazil. In: *CONGRESO NACIONAL DE SISTEMAS SILVOPASTORILES*, 1., 2009, Posadas. Actas... Buenos Aires: INTA, 363-367.

VECHIATO, H.M., APARECIDO, C.C. (2008) Fungos em sementes de gramíneas forrageiras: restrição fitossanitária e métodos de detecção. São Paulo: Instituto Biológico. Comunicado técnico, 89.

WANG, Y., CUI, Y., HU, G., WANG, X., CHEN, H., SHI, Q., ET AL. (2018) Reduced bioactive gibberellin content in rice seeds under low temperature leads to decreased sugar consumption and low seed germination rates. *Plant Physiology and Biochemistry*. 133, 1–10. doi: 10.1016/j.plaphy.2018.10.020

WANG, G. et al. (2022) Superphosphate, biochar, and a microbial inoculum regulate phytotoxicity and humification during chicken manure composting. *Science of the Total Environment*, 824, 153958. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153958>

WANG C, PAN G, LU X & QI W (2023a) Phosphorus solubilizing microorganisms: potential promoters of agricultural and environmental engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1181078. doi: 10.3389/fbioe.2023.1181078

WANG, J., WANG, R., GAO, J., LIU, H., TANG, W., LIU, Z., & LI, X. (2023b) Identification of three *Streptomyces* strains and their antifungal activity against the rubber anthracnose fungus *Colletotrichum siamense*. *Journal of General Plant Pathology*, 89(2), 67-76. <https://doi.org/10.1007/s10327-022-01109-x>

WERNER, J.C. (1986) Adubação de pastagens. Nova Odessa: Instituto de Zootecnia, Boletim Técnico, 18, 49p.

WEYA, B. A. et al. (2013) Effect of seed priming on germination of common bean and lablab in Nandi South District, Nandi County. 11th African Crop Science Proceedings, Sowing innovations for sustainable food and nutrition security in Africa. Entebbe, Uganda. 175-181 ref. 22.

WHARTON, P. S., & DIÉGUEZ-URIBEONDO, J. (2004) The biology of *Colletotrichum acutatum*. In: *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 61(1), 3-22. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2004.v61.i1.61>

XU, D., DENG, Y., XI, P., ZHU, Z., KONG, X., WAN, L., SITU, J., LI, M., GAO, L., & JIANG, Z. (2018) Biological activity of pterostilbene against *Peronophythora litchii*, the litchi downy blight pathogen. *Postharvest Biology and Technology*. 144, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.05.011>.

XU, S. J., AKTARUZZAMAN, M., KIM, B. S., KIM, J. Y., & SHIN, H. D. (2018) First report of anthracnose caused by *Colletotrichum fioriniae* on eggplant fruits in Korea. *Plant Disease*, 102(12), 2642-2642. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0711-PDN>

XUE, X., DU, S., JIAO, F., XI, M., WANG, A., XU, H., ET AL. (2021) The regulatory network behind maize seed germination: Effects of temperature, water, phytohormones, and nutrients. *Crop Journal*, 9, 718–724. doi: 10.1016/j.cj.2020.11.005

ZHAO, Y. et al. (2021) The application of *Bacillus megaterium* alters soil microbial community composition, bioavailability of soil phosphorus and potassium, and cucumber growth in the plastic shed system of North China. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 307, 107236. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107236>

