



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



**“POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA COMUNIDADE BACTERIANA  
ENDOFÍTICA ASSOCIADA A *Paspalum vaginatus* Swartz NA  
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL, BIOCONTROLE E  
SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO DE ROCHAS FOSFATADAS”**

**Ana Carolina Vasconcelos Fernandes**

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

***Orientador:***

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

***Coorientadora:***

Profa. Dra. Alessandra Pereira Fávero

**Bolsista (CAPES) - 88882.461700/2019-01**

**São Carlos - SP  
2025**

**ANA CAROLINA VASCONCELOS FERNANDES**

**“POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA COMUNIDADE BACTERIANA  
ENDOFÍTICA ASSOCIADA A *Paspalum vaginatum* Swartz NA  
PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL, BIOCONTROLE E  
SOLUBILIZAÇÃO DE FÓSFORO DE ROCHAS FOSFATADAS”**

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

***Orientador:***

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

***Coorientadora:***

Profa. Dra. Alessandra Pereira Fávero

São Carlos  
2025



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 dissertação de Mestrado da candidata Ana Carolina Vasconcelos Fernandes, realizada em 09/05/2025.

**Membros da comissão examinadora:**

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava (UFSCar)

Dr. Alberto Carlos de Campos Bernardi (Embrapa)

Prof. Dr. Danilo Manzani (USP)

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

Aos meus avôs Mário e Agostinho que  
foram exemplo de caráter e resiliência  
em minha vida. Sempre amarei vocês!

## AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Vitor Yoshida pelo companheirismo, apoio, paciência e amor. Obrigada por estar ao meu lado!

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

À Dr<sup>a</sup> Alessandra Pereira Fávero por me receber na Embrapa, por toda orientação e suporte.

Às minhas amigas Giovana Gulhote, Giulia Martins e Isadora Pedrino pela ajuda, por tantos momentos maravilhosos no laboratório e fora dele e pela amizade.

À minha família, pelo carinho e apoio. Especialmente minhas avós Eurípedes e Nair.

À Dra. Sônia Regina Nogueira, à Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna, ao Dr. Wilson Malagó Júnior, ao Dr. Alberto Bernardi, ao Dr. Waldomiro Barioni Junior e ao Dr. Marcelo Cavallari por todo o ensinamento e auxílio durante as etapas do projeto realizadas na Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP.

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

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

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 8882.461700/2019-

01

Fernandes, Ana Carolina Vasconcelos. **Diversidade e potencial biotecnológico para promoção de crescimento vegetal e biocontrole da comunidade bacteriana endofítica associada a *Paspalum vaginatum* Swartz.** 2024. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2024.

## RESUMO

Espécies de *Paspalum* são importantes constituintes nas pastagens nativas de regiões tropicais e subtropicais das Américas. *Paspalum vaginatum* é uma gramínea nativa de áreas litorâneas no Brasil e é amplamente utilizado em campos de golfe nos Estados Unidos devido sua robustez e tolerância a estresses abióticos como a seca, encharcamento e salinidade. As bactérias endofíticas presentes no interior dos tecidos vegetais podem estimular seu crescimento e atuar no controle biológico de organismos fitopatogênicos. O presente estudo objetivou avaliar a diversidade microbiana endofítica isolada de *Paspalum vaginatum* e determinar sua capacidade de promover o crescimento vegetal em condições *in vivo*, além de investigar o potencial biotecnológico desses microrganismos para o controle biológico fitopatogênico em laboratório *in vitro* e para a solubilização diferentes fontes de fósforo *in vitro* e *in vivo*. O gene 16S rDNA de 70 bactérias endofíticas isoladas de *Paspalum vaginatum* foi sequenciado para fins de identificação taxonômica. Foram realizados testes para avaliar o antagonismo contra *Colletotrichum* sp. e a capacidade de solubilização de diferentes fontes de fósforos como Rochas Araxá e Bayovar, fosfato de cálcio e superfosfato triplo *in vitro*. Experimentos em casa de vegetação foram conduzidos para estudar o estímulo ao crescimento nas espécies *Paspalum vaginatum* e *Paspalum maritimum* e de solubilização de fósforo *in vivo* em *Paspalum maritimum*. A análise molecular revelou a presença de 17 gêneros bacterianos, com destaque para *Bacillus* (34,3%), seguido por *Agrobacterium* e *Micrococcus* (10% cada). Os sete isolados bacterianos testados foram capazes de solubilizar as quatro diferentes fontes de fósforo, com destaque para a Bac 160, Bac 161 e Bac 179. Em relação a atividade antagônica contra *Colletotrichum* sp., foi identificado que 13 isolados demonstraram atividade antagônica ao fungo *Colletotrichum* sp. e apresentaram índice de inibição variando entre 12,9% e 43,1%. No experimento de promoção de crescimento vegetal em *Paspalum vaginatum* a matéria seca da parte aérea, comprimento das plantas e número de perfilhos basais os inoculantes comerciais BiomaPhos® e Biopasto® apresentaram resultados inferiores quando comparados aos demais tratamentos disponíveis. Ademais, o Biopasto® apresentou resultados inferiores quando comparados aos demais tratamentos disponíveis em relação ao número de perfilhos aéreos em *Paspalum vaginatum*. Em *Paspalum maritimum*, duas linhagens de *Pantoea* sp. contribuíram para um aumento significativo na matéria seca das raízes em comparação com o grupo de controle e o Biopasto® apresentou resultados inferiores quando comparados aos demais tratamentos disponíveis para matéria seca da parte aérea e da raiz. Os dados coletados apontam para o potencial biotecnológico das cepas bacterianas endofíticas identificadas em *Paspalum vaginatum*, indicando possíveis aplicações promissoras na agricultura sustentável tanto para estimular o crescimento das plantas quanto no combate biológico de organismos

fitopatogênicos. O experimento de solubilização de fósforo *in vivo* foi desenvolvido com os isolados Bac 160, Bac 161 e Bac 179. A Bac 161 apresentou resultados favoráveis para seu uso com fontes de fósforo insolúveis, como a rocha fosfatada Bayovar tanto para matéria seca da parte aérea como da raiz. Já a Bac 160 apresentou resultados favoráveis para uso em conjunto com uma fonte de fósforo solúvel no intuito de intensificar seu efeito.

**Palavras-chave:** Bactérias endofíticas, Paspalum, Promoção de crescimento vegetal, Biocontrole, Fósforo.

Fernandes, Ana Carolina Vasconcelos. **Diversity and biotechnological potential for promoting plant growth and biocontrol of the endophytic bacterial community associated with *Paspalum vaginatum* Swartz.** 2024. Dissertation (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2024.

## ABSTRACT

*Paspalum* species are important constituents of native pastures in tropical and subtropical regions of the Americas. *Paspalum vaginatum* is a native grass to coastal areas in Brazil and is widely used on golf courses in the United States due to its robustness and tolerance to abiotic stresses such as drought, waterlogging, and salinity. Endophytic bacteria present within plant tissues can stimulate their growth and act in the biological control of phytopathogenic organisms. The present study aimed to evaluate the endophytic microbial diversity isolated from *Paspalum vaginatum* and determine their ability to promote plant growth, in addition to investigating the biotechnological potential of these microorganisms for *in vitro* phytopathogenic biological control in the laboratory and for the solubilization of different phosphorus sources *in vitro* and *in plant*. The 16S rDNA gene of 70 endophytic bacteria isolated from *Paspalum vaginatum* was sequenced for taxonomic identification purposes. Tests were performed to evaluate antagonism against *Colletotrichum* sp. and the solubilization capacity of different phosphorus sources such as Rochas Araxá and Bayovar, calcium phosphate and triple superphosphate *in vitro*. In addition, greenhouse experiments were conducted to study the growth stimulation of the species *Paspalum vaginatum* and *Paspalum maritimum* and a phosphorus solubilizing experiment on *Paspalum maritimum*. Molecular analysis revealed the presence of 17 bacterial genera, with emphasis on *Bacillus* (34.3%), followed by *Agrobacterium* and *Micrococcus* (10% each). The seven bacterial isolates tested were able to solubilize the four different phosphorus sources, with emphasis on Bac 160, Bac 161 and Bac 179. Regarding the antagonistic activity against *Colletotrichum* sp., it was identified that 13 isolates demonstrated antagonistic activity to the fungus *Colletotrichum* sp. and presented inhibition index ranging from 12.9% to 43.1%. In the plant growth promotion experiment on *Paspalum vaginatum* shoot dry weight, plant height and number of basal tillers, the commercial inoculants BiomaPhos® and Biopasto® presented inferior results when compared to the other available treatments. Furthermore, Biopasto® presented inferior results when compared to the other available treatments in relation to the number of aerial tillers in *Paspalum vaginatum*. In *Paspalum maritimum*, two varieties of *Pantoea* sp. contributed to a significant increase in root dry weight compared to the control group, and Biopasto® presented inferior results when compared to the other available treatments for shoot and root dry weight. The collected data point to the biotechnological potential of the endophytic bacterial strains identified in *Paspalum vaginatum*, indicating possible promising applications in sustainable agriculture both to stimulate plant growth and in the biological control of phytopathogenic organisms. The *in plant* phosphorus solubilization experiment using *Paspalum maritimum* was conducted with the isolates Bac 160, Bac 161, and Bac 179. Bac 161 showed favorable results for its use with insoluble

phosphorus sources, such as Bayovar phosphate rock, both for shoot and root dry matter. Meanwhile, Bac 160 showed favorable results for use in combination with a soluble phosphorus source in order to enhance its effect.

**Keywords:** Endophytic bacteria, Paspalum, Plant growth promotion, Biocontrol, Phosphorus.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>página</b>
<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	
<b>Figura 1.1</b> Acesso 114 ( <i>Paspalum vaginatum</i> ) do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Pecuária Sudeste.	16
<b>Figura 1.2</b> Lígula e ponta da folha de <i>Paspalum vaginatum</i> .	16
<b>Figura 1.3</b> Exemplar de <i>Paspalum maritimum</i> cultivado em condições experimentais.	17
<b>Figura 1.4</b> Cadeia produtiva dos fertilizantes.	27
<b>Figura 1.5</b> Percentual das principais origens dos fertilizantes importados para o Brasil em 2022.	28
<b>Capítulo 2 – Materiais e Métodos</b>	
<b>Figura 2.1</b> Imersão das raízes de <i>Paspalum maritimum</i> em solução bacteriana padronizada.	38
<b>Figura 2.2</b> Mudanças de <i>Paspalum maritimum</i> transplantadas para vasos de isopor.	38
<b>Figura 2.3</b> Imersão das raízes de <i>Paspalum vaginatum</i> em solução bacteriana padronizada.	40
<b>Figura 2.4</b> Mudanças de <i>Paspalum vaginatum</i> transplantadas para vasos de isopor.	41
<b>Figura 2.5</b> Erlenmeyers contendo meio NIBRIP, diferentes fontes de fósforo e diferentes culturas bacterianas após 10 dias de incubação.	42
<b>Figura 2.6</b> Mudanças de <i>Paspalum maritimum</i> após retirar o substrato das raízes	45
<b>Figura 2.7</b> Mudanças de <i>Paspalum maritimum</i> transplantadas para vasos de isopor de 500 mL contendo uma mistura de 0,5kg de solo e sua respectiva fonte de fósforo.	45
<b>Figura 2.8</b> Adubação mineral em <i>Paspalum maritimum</i> .	46
<b>Figura 2.9</b> <i>Paspalum maritimum</i> após realização do primeiro corte.	47
<b>Figura 2.10</b> Representação de uma placa de petri com a metodologia para triagem de antagonismo in vitro de bactérias endofíticas associadas <i>Paspalum vaginatum</i> , em relação ao fungo fitopatogênico <i>Colletotrichum</i> sp..	48
<b>Figura 2.11</b> Representação de uma placa de Petri com a técnica de pareamento direto in vitro para avaliação do potencial antagonístico dos isolados endofíticos associados a <i>Paspalum vaginatum</i> , em relação ao fungo <i>Colletotrichum</i> sp..	48
<b>Figura 2.12</b> Representação esquemática do ensaio de pareamento direto in vitro utilizando duas placas de Petri, com os diâmetros utilizados para determinação da %inibição dos isolados endofíticos associados a <i>Paspalum vaginatum</i> , em relação ao fungo <i>Colletotrichum</i> sp..	49
<b>Capítulo 3 – Resultados e Discussão</b>	
<b>Figura 3.1</b> Proporção dos gêneros bacterianos endofíticos associados ao <i>Paspalum</i>	52

*vaginatum*.

<b>Figura 3.2</b>	Dendrograma da biodiversidade de bactérias endofíticas associadas à <i>Paspalum vaginatum</i> , com sequências de comparação.	56
<b>Figura 3.3</b>	Resultado gráfico do comprimento da parte aérea, número de perfilhos basais e número de perfilhos aéreos para os tratamentos em <i>P. vaginatum</i> ao longo das semanas.	61
<b>Figura 3.4</b>	Resultado gráfico do comprimento da parte aérea e número de perfilhos basais para os tratamentos em <i>P. maritimum</i> ao longo das semanas.	62
<b>Figura 3.5</b>	Curva padrão para quantificação de fósforo solúvel. Desenvolvido pelo autor.	64
<b>Figura 3.6</b>	Copos descartáveis contendo o mix de Murphy & Riley, água e o filtrado do sobrenadante do controle e das inoculações 160, 161, 179, 180, 184, 185, 198 em diferentes fontes de fósforo (rochas Araxá e Bayovar, fosfato de cálcio e superfosfato triplo).	65
<b>Figura 3.7</b>	Quantificação de fósforo solubilizado por isolados bacteriano endofíticos de acordo com quatro fontes de fósforo (rochas Araxá e Bayovar, fosfato de cálcio e superfosfato triplo).	66
<b>Figura 3.8</b>	Efeito da inoculação bacteriana e das fontes de fósforo no <i>Paspalum maritimum</i> .	68
<b>Figura 3.9</b>	Produção matéria seca da parte aérea (g) para o primeiro e segundo corte.	70
<b>Figura 3.10</b>	Produção de matéria seca total da parte aérea de <i>Paspalum maritimum</i> .	71
<b>Figura 3.11</b>	Produção de matéria seca da raiz de <i>Paspalum maritimum</i>	74
<b>Figura 3.12</b>	Exemplos de resultados dos ensaios de antagonismo in vitro entre o fungo fitopatogênico <i>Colletotrichum</i> sp. e bactérias endofíticas isoladas de <i>Paspalum vaginatum</i> .	77

## LISTA DE TABELAS

	página
<b>Capítulo 2 – Materiais e Métodos</b>	
<b>Tabela 2.1</b> Análise físico-química utilizada no ensaio.	43
<b>Capítulo 3 – Resultados e Discussão</b>	
<b>Tabela 3.1</b> Matéria seca (g) da parte aérea e da raiz de <i>Paspalum vaginatum</i> por tratamento.	57
<b>Tabela 3.2</b> Matéria seca (g) da parte aérea e da raiz de <i>Paspalum maritimum</i> por tratamento.	57
<b>Tabela 3.3</b> Produção matéria seca da parte aérea (g) para o primeiro e segundo corte.	69
<b>Tabela 3.4</b> Produção matéria seca da parte aérea (g) total.	72
<b>Tabela 3.5</b> Produção matéria seca da raiz (g).	73
<b>Tabela 3.6</b> Porcentagem de inibição de crescimento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp. pelos isolados endofíticos.	76

## SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	9
<b>Capítulo 1 - Introdução</b>	<b>13</b>
1.1. O gênero <i>Paspalum</i> .....	14
1.2. <i>Paspalum vaginatum</i> Swartz.....	15
1.3. <i>Paspalum maritimum</i> .....	17
1.4. Bactérias endofíticas.....	18
1.5. Promoção de crescimento vegetal.....	21
1.6. Solubilização de fósforo.....	23
1.7. Fertilizantes e rochas fosfatadas.....	26
1.8. Fungo fitopatígeno <i>Colletotrichum</i> sp., agente causal da antracnose.....	29
1.9. Objetivos .....	32
<b>Capítulo 2 – Materiais e Métodos</b>	<b>33</b>
2.1. Identificação taxonômica de bactérias endofíticas associadas ao <i>Paspalum vaginatum</i> .....	33
2.1.1. Extração de DNA bacteriano.....	33
2.1.2. Amplificação parcial do gene 16S do DNA ribossomal .....	34
2.1.3. Purificação do DNA amplificado, sequenciamento, edição e análise das sequências.....	34
2.2. Árvore filogenética .....	35
2.3. Ensaios <i>in vivo</i> de promoção de crescimento vegetal em casa de vegetação .....	36
2.3.1. <i>Paspalum maritimum</i> .....	36
2.3.2. <i>Paspalum vaginatum</i> .....	39
2.4. Ensaio <i>in vitro</i> de solubilização de fosfato inorgânico a partir de rochas fosfatadas .....	41
2.5. Experimento de solubilização de fósforo <i>in planta</i> em <i>P. maritimum</i> .....	43
2.5.1. Preparo do solo .....	43
2.5.2. Preparo das sementes e dos inóculos bacterianos.....	44
2.5.3. Cortes da parte aérea das plantas e avaliação de parâmetros agronômicos .....	46
2.6. Atividade antagonista a <i>Colletotrichum</i> sp. e pareamento direto <i>in vitro</i> .....	47
2.7. Metodologia estatística .....	50
2.7.1. Ensaio de promoção de crescimento vegetal <i>in vivo</i> .....	50
2.7.1.1. Dados de matéria seca de <i>P. vaginatum</i> e <i>P. maritimum</i> .....	50
2.7.1.2. Dados de comprimento e número de perfilhos, por semana, de <i>P. vaginatum</i> e <i>P. maritimum</i> .....	50
2.7.2. Ensaio de solubilização de fósforo <i>in vivo</i> .....	51
2.7.2.1. Dados de matéria seca total da parte aérea e da raiz .....	51
2.7.2.2. Dados da matéria seca considerando o efeito de corte .....	51
<b>Capítulo 3 – Resultados e Discussão</b>	<b>52</b>
3.1. Identificação dos isolados endofíticos e árvore filogenética.....	52
3.2. Promoção de crescimento vegetal em <i>Paspalum vaginatum</i> e <i>Paspalum maritimum</i> .....	56
3.2.1. Matéria seca da raiz e da parte aérea .....	56
3.2.2. Comprimento da planta, número de perfilhos basal e aéreo .....	60
3.1. Solubilização de rochas fosfatadas <i>in vitro</i> .....	64
3.2. Experimento de solubilização de fósforo <i>in planta</i> em <i>P. maritimum</i> .....	67
3.3. Antagonismo ao fitopatígeno <i>Colletotrichum</i> sp. ....	76
<b>Capítulo 4 – Conclusões</b>	<b>80</b>
<b>Referências</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE A – Identificação dos 70 isolados bacterianos endofíticos de <i>Paspalum vaginatum</i></b>	<b>97</b>
<b>APÊNDICE B – Resultados dos descritores de comprimento (COMP), número de perfilhos basais (NPB) e número de perfilhos aéreos (NPA) para os tratamentos em <i>P. vaginatum</i> ao longo das semanas</b>	<b>100</b>
<b>APÊNDICE C – Resultados dos descritores de comprimento (COMP) e número de perfilhos basais (PB) para os tratamentos em <i>P. maritimum</i> ao longo das semanas</b>	<b>101</b>

## Capítulo 1 - Introdução

O crescimento populacional global projetado para 9,7 bilhões de pessoas até 2050 demanda estratégias inovadoras para aumentar a produção agrícola de forma sustentável. Nesse contexto, as gramíneas desempenham um papel fundamental na agricultura e pecuária (BATISTA; GODOY, 2000; PRIMAVESI *et al.*, 2008; PEZZOPANE *et al.*, 2017; FAO, 2018). As gramíneas do gênero *Paspalum*, com grande diversidade de espécies distribuídas nas Américas, representam um importante recurso vegetal com potencial ainda não totalmente explorado, 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*) em que se destacam o *Paspalum vaginatum* e *Paspalum maritimum* (MATTA *et al.*, 2023). O primeiro é nativo de áreas litorâneas no Brasil e é amplamente utilizado em campos de golfe nos Estados Unidos devido sua robustez e tolerância a estresses abióticos como a seca, encharcamento e salinidade (DUNCAN; CARROW, 2000; LONARD; JUDD; STALTER, 2015). Já o segundo, destaca-se por seu potencial forrageiro e participa do programa de melhoramento da Embrapa Pecuária Sudeste. (DE CARVALHO FILHO; FONTES, 2004).

A busca por alternativas sustentáveis ao uso intensivo de agroquímicos e a dependência de importação de fertilizantes tem direcionado pesquisas para o estudo de microrganismos associados às plantas, especialmente microrganismos rizosféricos e endofíticos. Esses microrganismos, especialmente as bactérias endofíticas, que colonizam o interior dos tecidos vegetais, podem promover o crescimento vegetal por meio de mecanismos diretos, como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fósforo e produção de fitormônios, e indiretos, como o biocontrole de fitopatógenos (LACAVA, BOGAS, CRUZ, 2022). Esses microrganismos podem não apenas melhorar o crescimento das plantas, mas também ajudar na tolerância a condições adversas (VANDENKOORNHUYSE *et al.*, 2015). Nesse sentido, a investigação de bactérias

endofíticas emerge como uma abordagem estratégica para o desenvolvimento de bioinsumos, contribuindo para a sustentabilidade agrícola.

Assim, evidencia-se a importância de ampliar o conhecimento sobre a diversidade microbiana associada a diversas espécies vegetais, incluindo gramíneas do gênero *Paspalum*. O presente trabalho investigou a diversidade e o potencial biotecnológico de bactérias endofíticas associadas a *Paspalum vaginatum*, com foco em sua capacidade de promover o crescimento vegetal, solubilizar fósforo e atuar no controle biológico de organismos fitopatogênicos.

### **1.1. O gênero *Paspalum***

O gênero *Paspalum* compreende mais de 310 espécies pertencentes à família Poaceae e à subfamília Panicoideae, englobando um grupo diversificado de gramíneas predominantemente encontradas em latitudes tropicais e subtropicais (CHASE, 1929; ZULOAGA & MORRONE, 2005). Esse gênero apresenta espécies distribuídas pelo continente americano, ocorrendo em todo Brasil, no leste da Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e Uruguai e há diversas espécies nativas do Brasil com um alto valor forrageiro e cobertura de solo (QUARIN *et al.*, 1997; CATANZARO *et al.*, 2015).

A Embrapa Pecuária Sudeste, localizada em São Carlos – SP (<https://www.embrapa.br/pecuaria-sudeste>), abriga um Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (BAG *Paspalum*), composto por mais de 450 acessos de cerca de 60 espécies distintas, que estão sendo avaliados para diferentes usos (DE PAULA *et al.*, 2022; ACUÑA *et al.*, 2019). Os bancos de germoplasma do Sistema Nacional de Germoplasma Vegetal dos EUA (USDA), Embrapa (Brasil) e IBONE (Argentina) preservaram o maior número de espécies com 48, 60 e 72, respectivamente (ACUÑA *et al.*, 2019).

O BAG *Paspalum* da Embrapa tem por objetivos o enriquecimento, a caracterização, a conservação, a documentação e a valoração de acessos de diferentes espécies do gênero para fins atuais e futuros. Estudos desenvolvidos na Embrapa Pecuária Sudeste mostram o grande potencial forrageiro (BATISTA *et al.*, 1999; BATISTA; GODOY, 2000), para fins de cobertura de solo e ornamental das espécies conservadas no Banco de Germoplasma (GONÇALVES, 2019; DINATO, 2020; DE OLIVEIRA *et al.*, 2020). São diversas

as espécies que compõe o BAG Paspalum, como o *Paspalum maritimum* e *Paspalum vaginatum* (GILBERTO, 2024).

### **1.2. *Paspalum vaginatum* Swartz**

Dentre as espécies de *Paspalum*, destaca-se o *Paspalum vaginatum* Swartz, também conhecido como seashore *Paspalum*, uma planta perene e rizomatosa (com rizomas, caules que crescem horizontalmente abaixo do solo), estolonífera (com estolões, caules rasteiros que enraízam nos nós) e heliófita (necessitando de alta exposição solar) (CHASE, 1929; ZULOAGA & MORRONE, 2005; DUNCAN; CARROW, 2000).

Nativo das Américas, o *P. vaginatum* Swartz foi disperso globalmente por navios com pessoas escravizadas e transportado por aves e correntes marítimas. Atualmente, é encontrado em áreas litorâneas, pântanos salobros, margens de manguezais, habitats adjacentes a riachos e locais sazonalmente inundados (DUNCAN; CARROW, 2000; LONARD; JUDD; STALTER, 2015). Esta gramínea é notável por sua resistência a condições de seca, podendo também suportar longos períodos de inundação e condições de hipersalinidade. Classificada como halófito, a espécie tolera a salinidade regulando a quantidade de sal na parte aérea enquanto retém água suficiente para ajustes osmóticos. Um mecanismo que facilita esse processo é o transporte do excesso de sal de folhas maduras para folhas senescentes (LONARD; JUDD; STALTER, 2015).

O *Paspalum vaginatum* (Figura 1.1) pode atingir até 65 cm de altura, com lâminas foliares variando de 4 a 19 cm de comprimento e 1 mm de diâmetro, apresentando alguns pelos nas margens próximas às lígulas, que são membranosas e medem de 0,5 a 2 mm de comprimento (Figura 1.2). As bainhas são glabras (sem pelos), sobrepostas e achatadas (CHASE, 1929; ZULOAGA & MORRONE, 2005; LONARD; JUDD; STALTER, 2015).



**Figura 1.1** Acesso 114 (*Paspalum vaginatum*) do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Pecuária Sudeste. Registrado pelo autor.



**Figura 1.2** Lígula e ponta da folha de *Paspalum vaginatum*. GURGEL, 2003.

Esta gramínea é amplamente utilizada e comercializada para campos de golfe, especialmente em regiões litorâneas dos Estados Unidos, devido à sua robustez (USDA & NRCS, 2024). Estudos também indicam seu potencial uso em telhados verdes, dada a sua

capacidade de ser irrigada com água salobra, águas residuais (água cinza) ou até água reciclada de chuva (NTOULAS; VARSAMOS, 2021). Além disso, o *P. vaginatum* mostrou-se promissor na fitorremediação de sedimentos contaminados com poluentes orgânicos (hidrocarbonetos de petróleo) e inorgânicos (metais pesados) (BIANCHI *et al.*, 2011; HUE *et al.*, 2002). A espécie também pode ser utilizada no combate e prevenção da erosão (BEGAM *et al.*, 2017). Pesquisas sobre a microbiota associada a essa gramínea são fundamentais tanto para a promoção do crescimento vegetal quanto para o combate a fungos fitopatogênicos e para o conhecimento da biodiversidade microbiana associada ao *P. vaginatum*.

### 1.3. *Paspalum maritimum*

O *Paspalum maritimum* Trind (Figura 1.3), conhecido como capim-gengibre, destaca-se por seu notável potencial forrageiro, revelando um crescimento que o qualificam como uma opção a ser avaliada para ambientes de baixa fertilidade do solo. Além disso, as características morfológicas dessa espécie conferem-lhe uma notável adaptabilidade ao pastejo (DE CARVALHO FILHO; FONTES, 2004).



**Figura 1.3** Exemplar de *Paspalum maritimum* cultivado em condições experimentais. Registrado pelo autor.

Gramínea perene e nativa, amplamente distribuída nas áreas baixas litorâneas e nos tabuleiros costeiros do Nordeste do Brasil, é conhecida por ser uma planta que se destaca pela alta capacidade de invasão de áreas na região amazônica. Suas características, como o crescimento rizomatoso e estolonífero, a alta capacidade de produção de sementes e a potencial adaptação a solos ácidos e de baixa fertilidade natural, proporcionam a essa espécie uma vantagem competitiva adicional em relação a outras espécies, facilitando sua expansão (DE CARVALHO FILHO; FONTES, 2004; SOUZA FILHO, 2006).

Atualmente, o *Paspalum maritimum* (BGP 210) é um material do programa de melhoramento da Embrapa Pecuária Sudeste, foi testado quanto a tolerância a sombreamento em casa de vegetação, demonstrando-se promissor (PEZZOPANE *et al.*, 2022). Também foi avaliado quanto à tolerância ao encharcamento do solo e se mostrou tolerante (SANTOS, *et al.*, 2021). A espécie está sendo testada em ambiente de integração lavoura-pecuária-floresta, mais especificamente pecuária-floresta, onde está sendo testada sob sombreamento de árvores nativas plantadas em renques na pastagem. Portanto, apesar do *P. maritimum* se apresentar como uma potencial opção de gramínea para uso como forragem, é importante aprofundar os estudos com informações sobre a qualidade bromatológica e se é bem aceito pelos animais.

#### **1.4. Bactérias endofíticas**

As plantas estabelecem interações complexas com diversos microrganismos em sua filosfera, rizosfera ou mesmo dentro de seus tecidos vegetais (endosfera) - os endófitos são um exemplo desses microrganismos benéficos que podem auxiliar no fornecimento de nutrientes e na proteção contra doenças das plantas hospedeiras (JIMTHA *et al.*, 2014; Rohini *et al.*, 2018). Em 1866, De Bary introduziu o conceito de "endófito", que foi posteriormente refinado por Hallmann e colaboradores, em 1997. Eles os descreveram como microrganismos que podem ser isolados de tecidos vegetais desinfetados superficialmente e capazes de sobreviver no sistema hospedeiro sem causar doenças (DE BARY, 1866; HALLMANN *et al.*, 1997; MARQUEZ-SANTACRUZ *et al.*, 2010; SHI *et al.*, 2014; MORENO-HAGELSIEB *et al.*, 2015).

As bactérias endofíticas são amplamente estudadas em diversos gêneros vegetais e sua interação próxima com as células vegetais pode trazer benefícios diretamente às plantas hospedeiras (ROSENBLUETH & MARINEZ-ROMERO, 2006). Diversas condições podem influenciar na diversidade da comunidade bacteriana endofítica de um vegetal, como a espécie e idade da planta hospedeira, o tipo de solo, a condição climática, condições do solo e estresse (HALLMANN; BERG, 2006; DING; MELCHER, 2016; ZIHONG *et al.* 1999; PEÑUELAS *et al.*, 2012; SICILIANO *et al.*, 2001). Os gêneros de endófitos comumente isolados de espécies vegetais são: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* (LACAVA; BOGAS; CRUZ, 2022; PAULA *et al.*, 2022; CRUZ *et al.*, 2021; CHATURVEDI; SINGH, 2016; HALLMANN *et al.*, 1997).

A interação entre plantas e endófitos é uma relação simbiótica. As bactérias endofíticas contribuem para a melhoria da absorção de nutrientes das plantas e estimulam seu crescimento por meio da produção de fitormônios, auxiliam na resistência às doenças através dos metabólitos que produzem, disputa por nichos ecológicos e ativação de resistência sistêmica (ISR). Por sua vez, as plantas fornecem um ambiente propício ao crescimento e à sobrevivência desses microrganismos (LACAVA; BOGAS; CRUZ, 2022; KUMAR; RADHAKRISHNAN, 2020). O uso de bactérias endofíticas como inoculantes é pautado em seus efeitos benéficos na germinação das sementes e promoção crescimento vegetal, o que corrobora no potencial de substituição de fertilizantes químicos objetivando um plantio e cultura sustentável (LACAVA; BOGAS; CRUZ, 2022; LACAVA; MACHADO; DE ANDRADE, 2021; AZEVEDO *et al.*, 2018).

Comunidades microbianas endofíticas são normalmente vistas como uma parte da população que vive perto das raízes das plantas, na rizosfera, pois estas foram capazes de se estabelecer na região rizosférica e posteriormente colonizar o interior vegetal. A colonização bem-sucedida de bactérias endofíticas em plantas envolve três estágios principais: quimiotaxia, aderência à superfície da raiz da planta, e penetração e colonização nas partes internas da planta (LACAVA; BOGAS; CRUZ, 2022; KANDEL *et al.*, 2017; HARDOIM *et al.*, 2015). A quimiotaxia é o fenômeno responsável pela motilidade

bacteriana em direção à planta, onde as bactérias são atraídas pelos exsudatos produzidos pela raiz e vários rizodépósitos que facilitam a interação de microrganismos benéficos com as plantas (LANGNER *et al.*, 2018; MORENO-HAGELSIEB *et al.*, 2015; COMPANT *et al.*, 2010). Os exsudatos radiculares são compostos orgânicos de baixo peso molecular liberados de forma passiva pelas raízes. Eles incluem materiais provenientes das células da raiz e mucilagens associadas à superfície radicular. Trata-se de uma mistura complexa de substâncias orgânicas solúveis, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos, enzimas e outros compostos. Assim como a composição dos exsudatos pode variar, o pH destes também (KOO *et al.*, 2005).

As bactérias aderem às raízes das plantas formando biofilmes que consistem em comunidades bacterianas envoltas em uma matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares que protegem as bactérias contra condições adversas. Elementos da superfície bacteriana (como pili e flagelos) e compostos extracelulares (como lipopolissacarídeos e exopolissacarídeos) juntamente com sinais químicos desempenham um papel crucial nesse processo (DAVEY & O'TOOLE, 2000; SAUER & CAMPER, 2001).

Já o processo de entrada e colonização dos tecidos das plantas por bactérias endofíticas ocorre por meio da rizofagia - um fenômeno no qual os endófitos aderidos liberam enzimas que degradam a parede celular vegetal (SINGH *et al.*, 2017; PAUNGFOO-LONHIENE *et al.*, 2013). Essas enzimas atacam a xilulose, celulose e as pectinas para facilitar a quebra da parede celular vegetal e possibilitam que as bactérias se espalhem e colonizem toda a planta. As bactérias endofíticas podem entrar no tecido vegetal por várias rotas, incluindo a zona da raiz, partes aéreas, caules, folhas, flores e cotilédones (ZINNIEL *et al.*, 2002), com preferência por locais com superfícies finas, como pelos radiculares ou a zona de alongamento do meristema apical da raiz (COMPANT *et al.*, 2005; REINHOLD-HUREK *et al.*, 2006; NAVEED *et al.*, 2014). Segundo Yaron e Römmling (2014), na colonização da filosfera, as bactérias primeiro se fixam na superfície da folha e podem entrar no tecido foliar através de aberturas naturais, como estômatos e hidatódios.

Contudo, o ambiente vegetal também pode ser colonizado por bactérias fitopatogênicas. Estas, ao contrário das bactérias endofíticas benéficas, estabelecem

interações antagônicas que podem se manifestar de diversas formas, como produção de toxinas e enzimas que matam células vegetais e produção de reguladores de crescimento que comprometem o desenvolvimento e a saúde da planta (RANALLI, ZANARDINI, SARTINI, 2009).

Para identificar os microrganismos associados às plantas em termos de gênero e espécie de forma mais precisa e detalhada foram desenvolvidas várias técnicas independentes de cultivo. Estas incluem a análise do gene 16S rRNA e de regiões específicas do genoma vegetal por meio do sequenciamento comparativo com bases de dados já existentes (SESSITSCH *et al.*, 2012; TAGHAVI *et al.*, 2009; IKEDA *et al.*, 2010; TURNER *et al.*, 2013).

### **1.5. Promoção de crescimento vegetal**

Bactérias endofíticas podem proporcionar diversos efeitos benéficos para o vegetal, seja direta ou indiretamente (AFZAL *et al.*, 2019). O primeiro pode ser exemplificado pela fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico e produção de hormônios vegetais, como o ácido 3-indolacético, auxiliando as plantas na obtenção de nutrientes e na melhora do seu crescimento em condições usuais ou de estresse (LACAVA; BOGAS; CRUZ, 2022; SHAH *et al.*, 2021; AZEVEDO *et al.*, 2018). Já o segundo se dá quando tais endófitos diminuem ou impedem efeitos deletérios de algum organismo fitopatogênico pela produção de substâncias tais como antibióticos, toxinas entomopatogênicas, enzimas líticas e indução da resistência sistêmica induzida (ZICCA *et al.*, 2020; AFZAL *et al.*, 2019; MUTHUKUMAR *et al.*, 2017).

O nitrogênio é um dos principais fatores limitantes no crescimento das plantas, ele compõe diversos aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos (RNA e DNA) e a clorofila. (ZHU *et al.*, 2023; NELSON & COX, 2022). No entanto, grande parte do nitrogênio não está disponível para as plantas, mas sim na sua forma gasosa  $N_2$ , quimicamente inerte (HUNGRIA & NOGUEIRA, 2022; CARDOSO; ANDREOTE, 2016). Cerca de 78% do ar atmosférico é composto por nitrogênio, apesar de muito abundante as plantas não são capazes de utilizar o nitrogênio em sua forma gasosa, mas sim na forma de amônio ( $NH_4^+$ )

e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (ZHU *et al.*, 2023; HUNGRIA & NOGUEIRA, 2022; CARDOSO; TSAI; NEVES, 1992). Bactérias diazotróficas de vida livre presentes na endosfera contribuem significativamente para a entrada de nitrogênio no ecossistema terrestre e para o ciclo global do nitrogênio (ZHU *et al.*, 2023).

Microrganismos denominados diazotróficos (ou fixadores de nitrogênio), comumente encontrados na natureza, reduzem o nitrogênio gasoso ( $\text{N}_2$ ) em amônia ( $\text{NH}_3$ ) ou íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) que se depositam no solo ou em solução, disponibilizando o nitrogênio para a planta. Tal processo é denominado fixação biológica de nitrogênio e tem sido utilizado como uma alternativa para minimização do uso de fertilizantes nitrogenados (HUNGRIA & NOGUEIRA, 2022; HOWARD; REES, 1996; EADY; POSTGATE, 1974). Esses fertilizantes apresentam alto custo de produção e podem gerar problemas ambientais pela lixiviação do nitrato, que tende a permanecer em solução no solo, tornando-o propenso ao processo de lixiviação e à consequente contaminação de águas subterrâneas. Além disso, há a sublimação da amônia e a grande quantidade de produção de  $\text{CO}_2$  (gás de efeito estufa) na fabricação do fertilizante (ZHANG, 2017).

O fósforo (P) é um macronutriente abundante nos solos tropicais e se faz presente em moléculas de DNA e RNA, bem como participa de reações metabólicas e de transferência de energia, além de ter importante papel estrutural (importante componente da bicamada lipídica) (TISDALE, 1993; NELSON & COX, 2022).

O fósforo também é um macronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento dos vegetais. O solo é um reservatório substancial de fosfato inorgânico, no entanto, a concentração de fósforo solúvel no solo é baixa. Assim, microrganismos solubilizadores de fosfato têm sido relatados no decorrer dos últimos anos como tendo a capacidade de solubilizar o fósforo insolúvel e torná-lo disponível para as plantas. (KUMAR; RADHAKRISHNAN, 2020).

Os hormônios são moléculas produzidas por células que modulam processos celulares em outras células. A maioria dos hormônios vegetais (fitormônios) é capaz de ativar respostas na célula alvo em baixas concentrações. Os principais fitormônios são: auxinas,

giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, brassinosteroides, jasmonatos, ácido salicílico e estrigolactonas (TAIZ *et al.*, 2017; DUCA; GLICK, 2020).

O ácido 3-indolacético (AIA) é o principal hormônio vegetal do tipo auxina, esse grupo hormonal é responsável por induzir diversos efeitos nas plantas como divisão celular, aumento, extensão e diferenciação celular. Também pode apresentar efeito na fotossíntese, regulando o crescimento vegetativo, indução da raiz lateral e adventícia, aumentam a taxa de funcionamento do xilema e podem atuar em vários processos metabólicos (KUMAR; RADHAKRISHNAN, 2020; RAVEN *et al.*, 2014).

As bactérias utilizadas no presente estudo foram isoladas e caracterizadas para promoção de crescimento vegetal por Fernandes e colaboradores (2023). No estudo, dentre as 70 bactérias isoladas, 41 fixaram nitrogênio atmosférico (58,6%), 26 solubilizam fosfato inorgânico (37,1%), 68 produziram AIA (97,1%). Ademais, sete isolados foram capazes de solubilizar fosfato (com índice de solubilização de fósforo maior que 3), fixar nitrogênio e produzir AIA simultaneamente.

### **1.6. Solubilização de fósforo**

O fósforo (P) é um macronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, ele está presente em moléculas de DNA e RNA, bem como participa de reações metabólicas e de transferência de energia, além de ter importante papel estrutural visto que compõe os fosfolipídeos (importante componente da bicamada lipídica) (NELSON & COX, 2022). Direta ou indiretamente, a nutrição de P nas plantas afeta a área da superfície da raiz, o rendimento e a qualidade da cultura, a formação de sementes, a maturidade da cultura, a resistência do caule e a resistência a patógenos vegetais (KISHORE; PINDI; RAM REDDY, 2015).

O P está presente nos solos na forma orgânica e inorgânica, o primeiro refere-se ao fósforo presente em compostos de origem biológica, já o segundo refere-se ao fósforo presente no solo na forma de minerais. O P pode estar presente em menores ou maiores quantidades no solo, porém mesmo quando abundante ele geralmente não está

disponível para as plantas, ou seja, encontra-se insolúvel (KISHORE; PINDI; RAM REDDY, 2015; SARMAH & SARMA, 2023).

As plantas são capazes de absorver o fósforo presente no solo em solução nas formas de íons monobásicos ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) e dibásicos ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ). Como resultado da imobilização do P em diferentes complexos e adsorventes, apenas aproximadamente 0,1% dele fica disponível para assimilação pelas plantas no solo. Na tentativa de suprir a demanda de P no solo, fertilizantes fosfatados são utilizados rotineiramente em campos agrícolas. Todavia, as plantas absorvem pequena proporção dos fertilizantes que são rapidamente convertidos em sua forma insolúvel no solo (ZOU; BINKLEY; DOXTADER, 1992; AHEMAD; KIBRET, 2014; LI *et al.*, 2020; SARMAH & SARMA 2023). Dessa forma, estima-se que mais de 70% do fósforo que é adicionado no solo por meio de fertilizantes permanece no solo em formas não disponíveis para as plantas (PAVINATO *et al.*, 2020). As perdas de P por lixiviação são significativas em solos muito arenosos, em solos orgânicos e também em solos que recebem altas taxas de fertilizantes orgânicos. Solos tropicais e subtropicais são predominantemente ácidos e frequentemente deficientes em P (SHARPLEY *et al.* 1999; SHARMA 1992; SHRIVASTAVA; SRIVASTAVA; D'SOUZA, 2018; PANG *et al.*, 2024).

A dinâmica do fósforo (P) no solo é influenciada por três processos fundamentais que modulam sua concentração na solução do solo. Primeiramente, temos as reações de dissolução e precipitação, que envolvem o equilíbrio entre as formas minerais de P. Em segundo lugar, ocorrem as interações de sorção e dessorção, nas quais o P em solução interage com as superfícies sólidas do solo. Por fim, os processos de mineralização e imobilização, mediados por microrganismos, promovem a conversão do P entre suas formas orgânicas e inorgânicas. Os microrganismos são essenciais em todos esses processos do ciclo do P no solo (SIMS & PIERZYNSKI, 2005).

Em solos ácidos, argilas retêm P por troca aniônica em superfícies carregadas positivamente. Ademais, o P pode se complexar com óxidos, principalmente de alumínio e ferro. Quando retidos na superfície dos óxidos, devido ao caráter anfotérico dos óxidos, o P permanece em equilíbrio rápido com o fósforo presente na solução do solo e é chamado de P lábil, ou seja, o fósforo está mais facilmente disponível para as plantas. Porém,

quando dois íons metálicos dos óxidos se ligam fortemente ao  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  por meio da troca de ligantes, o P é denominado não lábil e é mais difícil de ser disponibilizado para as plantas (SHRIVASTAVA; SRIVASTAVA; D'SOUZA, 2018).

Já em solos calcários, geralmente alcalinos, o fósforo é retido na superfície do  $\text{CaCO}_3$  por meio da substituição do íon  $\text{CO}_3^{2-}$  por fosfato, quando este está em baixa concentração. Quando as concentrações de P são mais elevadas ocorre a precipitação superficial de fosfato de cálcio na superfície do  $\text{CaCO}_3$  (YIN *et al.*, 1989). Inicialmente o fosfato de cálcio formado é amorfo; entretanto com o passar do tempo transforma-se em uma estrutura cristalina de baixa solubilidade (PARFITT, 1978). Além do carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), óxidos encontrados nos solos calcários também ajudam na fixação do fósforo (SHRIVASTAVA; SRIVASTAVA; D'SOUZA, 2018).

Diversos gêneros bacterianos, como *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Azospirillum*, *Serratia*, *Flavobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Microbacterium* e *Rhizobium* já foram relatados como solubilizadores de fosfato (FERNANDES *et al.*, 2023; LACAVA; MACHADO, DE ANDRADE, 2021; DE ABREU *et al.*, 2017; OTEINO *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2010; ZAIDI *et al.*, 2009;).

As bactérias que solubilizam fosfato desempenham um papel fundamental na disponibilização de P para as plantas por meio de diversos mecanismos, como a produção de ácidos orgânicos e inorgânicos, produzir sulfeto de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{S}$ ), liberar prótons de  $\text{NH}_4^+$  (amônio), sintetizar sideróforos e exopolissacarídeos (EPS). Os ácidos orgânicos secretados por microrganismos atuam quelando cátions ligados ao fosfato ou liberando  $\text{H}^+$  para reduzir o pH do solo (ZHANG *et al.*, 2020). Exemplos de ácidos orgânicos são ácido glucônico, cítrico, succínico, acético, oxálico, propiônico, láctico, fumárico, málico, tartárico, malônico, piruvato e chiquímico (GOLDSTEIN, 1995; VYAS & GULATI, 2009; WALPOLA & YOON, 2012). Esses ácidos orgânicos causam acidificação de células microbianas e ambientes circundantes na rizosfera, liberando ânions de fosfato advindo do fosfato mineral ao substituir  $\text{Ca}_2^+$  por  $\text{H}^+$  (GOLDSTEIN, 1994). Tian *et al.* (2021) explicam que o  $\text{CO}_2$  produzido pela respiração microbiana, ao se dissolver, gera ácido carbônico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ). Dessa forma, os prótons liberados por esse ácido são capazes de dissolver a

apatita de cálcio, liberando fosfato (SHRIVASTAVA; SRIVASTAVA; D'SOUZA, 2018; LI *et al.*, 2023; PANG *et al.*, 2024).

O íon amônio  $\text{NH}_4^+$  e sua subsequente nitrificação podem reduzir o pH do meio, promovendo ainda mais a liberação de íons fosfato (Khan *et al.*, 2007 e Zhu *et al.*, 2018). Já os exopolissacarídeos (EPS) apresentam grupos funcionais aniônicos capazes de quelar diversos íons metálicos, conforme a ordem de afinidade (Alumínio > Cobre > Zinco > Ferro > Magnésio > Potássio). Ao formar estruturas queladas mais estáveis, os exopolissacarídeos reduzem o número de cátions de fosfato fixos no solo, melhorando assim a disponibilidade de íons de fosfato para as plantas (SHRIVASTAVA; SRIVASTAVA; D'SOUZA, 2018; LI *et al.*, 2023; PANG *et al.*, 2024).

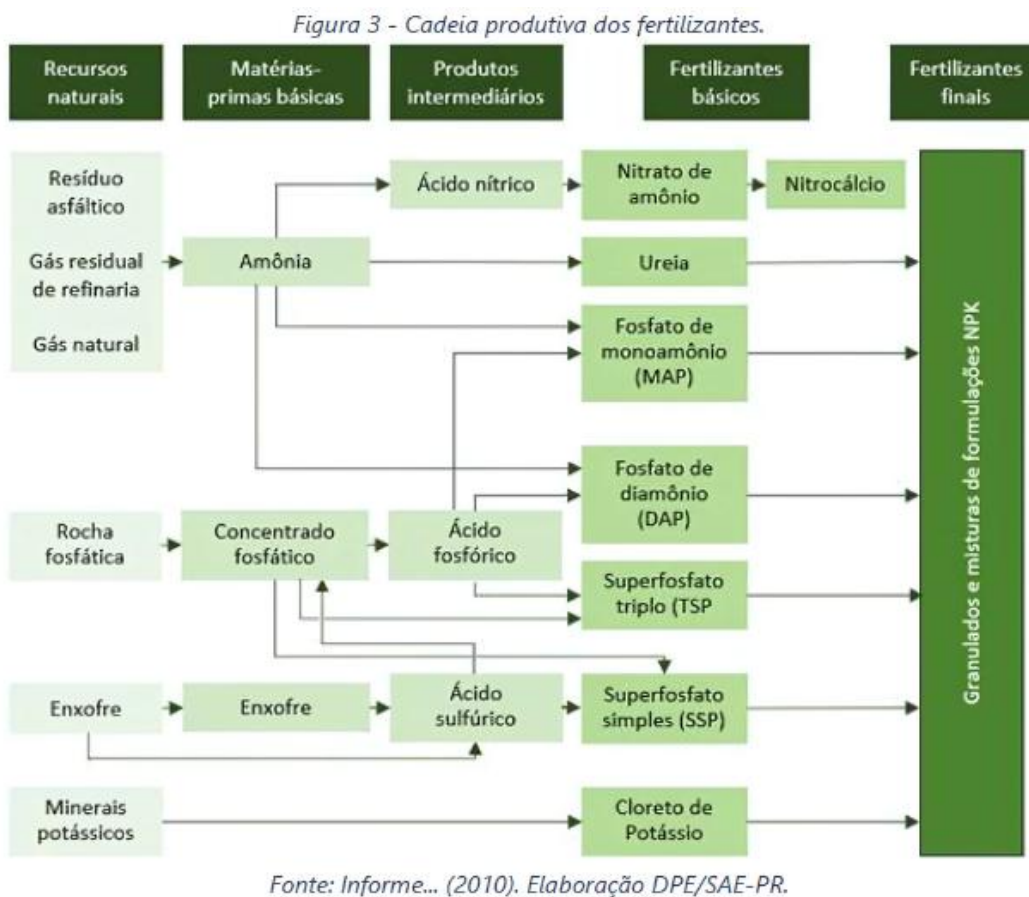
Embora os ácidos orgânicos sejam os principais agentes na solubilização de fosfato, outros compostos também desempenham papéis relevantes nesse processo. Os ácidos inorgânicos, ainda que menos eficientes, contribuem para a solubilização de P (ILLMER e SCHINNER, 1995; KIM *et al.*, 1997; TIAN *et al.*, 2021). Ademais, Sharma *et al.* (2013) destacam um mecanismo alternativo envolvendo  $\text{H}_2\text{S}$ , que reage com fosfato férrico para formar sulfato ferroso, liberando fosfato inorgânico no processo. Assim, os mecanismos de solubilização de fosfato por meio das bactérias ressaltam a importância desses microrganismos da ciclagem do fósforo (SHRIVASTAVA; SRIVASTAVA; D'SOUZA, 2018; LI *et al.*, 2023; PANG *et al.*, 2024).

### **1.7. Fertilizantes e rochas fosfatadas**

O uso excessivo de fertilizantes fosfatados e as consequências advindas desse processo se deve à baixa eficiência desse produto de apenas 20 a 25% e pode chegar a menos de 10% em algumas hortaliças sob manejo intensivo (NOTHOLT; SHELDON; DAVIDSON, 2005; ROY *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2023). Isso se deve ao processo de transferência de tecnologia das práticas agrícolas e de fertilização de solo de países de clima temperado para países de clima tropical, como o Brasil (Brasil, 2021). Assim, a baixa eficiência do fertilizante fosfatado representa um maior custo para a produção agrícola. A alteração das propriedades biológicas, químicas e físicas do solo que impactam na sua

qualidade também são consequências do uso indiscriminado dos fertilizantes fosfatados (BLANCO-VARGAS *et al.*, 2020; AJAR *et al.*, 2017).

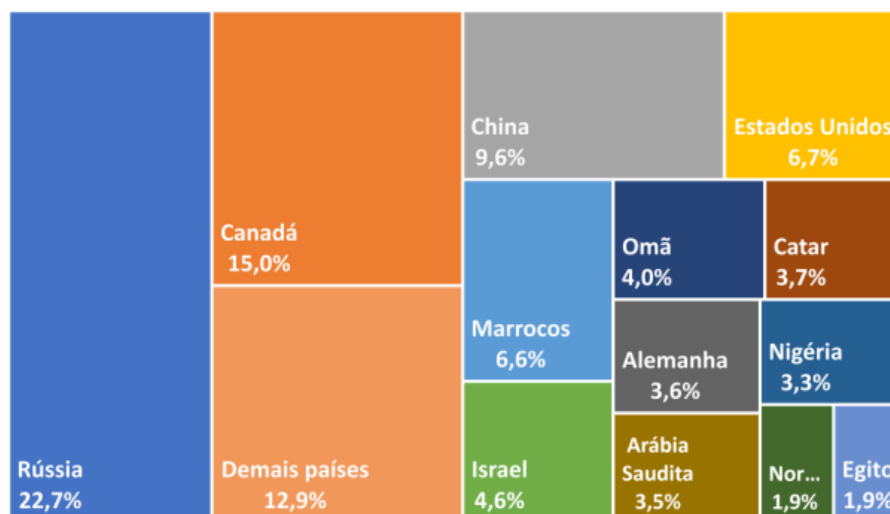
A matéria prima fundamental para produção dos fertilizantes fosfatados são as rochas fosfatadas, além do envolvimento do enxofre e da amônia (Figura 1.4). As principais fontes de rochas fosfatadas são de origem sedimentar, como em Marrocos, seguidos por rochas de origem ígneas, como no Brasil. Esses depósitos de origem magmática geralmente apresentam teores de  $P_2O_5$  mais baixos (4% a 16%) que os sedimentares. Ademais, um fator limitante na cadeia de produção dos fertilizantes fosfatados é a produção de fosfogesso como resíduo da fabricação de ácido fosfórico, para produção de 1 tonelada de ácido fosfórico são produzidas cinco toneladas de fosfogesso (KHOSHURU *et al.*, 2023; BRASIL, 2021).



**Figura 1.4** Cadeia produtiva dos fertilizantes. Brasil, 2021.

De acordo com o plano nacional de fertilizantes, o Brasil é o quarto maior consumidor de fertilizantes, responsável por 8% do consumo mundial. No ano de 2020, ele também ocupou o terceiro lugar para o consumo de fertilizantes fosfatados, sendo que o fósforo é o segundo nutriente mais aplicado no Brasil (33%). No entanto, mais de 80% dos fertilizantes utilizados no País são importados (Associação Nacional para Difusão de Adubos, 2021). Tal conjuntura expõe a vulnerabilidade e dependência do setor agrícola e, conseqüentemente, da economia brasileira nas oscilações do mercado nacional de fertilizantes (BRASIL, 2021).

Em 2022, o embargo comercial decretado pelos países ocidentais às transações russas e bielorrussas, devido à invasão da Rússia na Ucrânia, desestabilizou a oferta de nutrientes empregados na preparação dos fertilizantes e evidenciou a dependência econômica brasileira visto que em 2022 os principais exportadores de fertilizantes para o Brasil foram a Rússia, Canadá, China, Estados Unidos, Marrocos, Israel, Omã, Catar, Alemanha, Arábia Saudita e Nigéria (Figura 1.5) (VEGRO; ANGELO, 2023).



**Figura 1.5** Percentual das principais origens dos fertilizantes importados para o Brasil em 2022. VEGRO, 2023.

Assim, métodos químicos, físicos e biológicos podem ser utilizados para aumentar a dissolução da rocha fosfatada. No âmbito dos métodos biológicos encontram-se os microrganismos capazes de solubilizar o fósforo inorgânico presente no solo e também presente nas rochas fosfatadas. Possibilitando, assim, a utilização da rocha fosfatada e do

microrganismo diretamente na agricultura. Tal prática dispensa o complicado processo industrial de fabricação de fertilizantes, permitindo que as rochas brasileiras sejam aproveitadas em seu estado bruto (KHOSHURU *et al.*, 2023; BRASIL, 2021).

Há anos, os recursos biológicos tem sido estudados para uso na agropecuária brasileira. Em 2020 foi lançado o Programa nacional de Bioinsumos com o intuito de aproveitar o potencial da biodiversidade brasileira para reduzir a dependência dos produtores rurais em relação aos insumos importados e ampliar oferta de matéria-prima para setor (BRASIL, 2020). Tal documento esclarece os conceitos no ramo dos Bioinsumos, sendo este definido como:

“... 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.”

No documento, foi descrito como “biofertilizante”:

“... produto que contém componentes ativos ou substâncias orgânicas, obtido de microrganismos ou a partir da atividade destes, bem como seus derivados de origem vegetal e animal, capaz de atuar direta ou indiretamente sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, no aumento de sua produtividade ou na melhoria de sua qualidade, incluídos os processos e tecnologias derivados desta definição.”

Nesse âmbito, foi também conceituado o “inoculante” como “produto, processo ou tecnologia que contém microrganismos com atuação favorável ao desenvolvimento de plantas (BRASIL, 2020).” Dessa forma, é importante frisar que o que é comumente denominado como *Biofertilizers* nos Estados Unidos, no Brasil é denominado “Inoculante”.

### **1.8. Fungo fitopatígeno *Colletotrichum sp.*, agente causal da antracnose**

A promoção indireta do crescimento de plantas por bactérias ocorre pela supressão de microrganismos fitopatogênicos (LACAVA; MELO; PEREIRA, 2018). A supressão de fitopatógenos ocorre de forma direta por meio da produção de compostos antimicrobianos, enzimas e competição por nutrientes. Já a forma indireta ocorre pela

indução de resistência sistêmica (LACAVA; BOGAS; CRUZ, 2022; MUSHTAQ, 2020; ASWANI; VIPINA VINOD; ASHITHA, 2020; LACAVA & AZEVEDO, 2013).

De acordo com o Programa Nacional de Bioinsumos, agente biológico de controle é definido como “organismo, assim considerado microrganismo e inimigo natural, de ocorrência natural, introduzido no ambiente para o controle de uma população ou de atividade biológica de outro organismo vivo considerado nocivo” (Brasil, 2020). O padrão de colonização semelhante e a associação próxima aos fitopatógenos fazem com que as bactérias endofíticas sejam potencialmente usadas na agricultura como uma forma de biocontrole (SANTOYO *et al.*, 2016; SUROVY *et al.*, 2024).

Os fungos são responsáveis por grande parte das doenças em vegetais, existem mais de 19 mil espécies de fungos fitopatogênicos capazes de infectar e causar algum tipo de prejuízo nas plantas, o que acarreta perda na produção alimentar e grande prejuízo econômico em todo o mundo (LI *et al.*, 2017; JAIN *et al.*, 2019; PENG *et al.*, 2021).

As doenças causadas por *Colletotrichum* sp., conhecidas coletivamente como antracnose, afetam uma ampla gama de culturas economicamente importantes em todo o mundo. Essas infecções são registradas em culturas tão diversas quanto feijão, manga, banana, anonáceas (como graviola e pinha), café, citros, algodão, milho, cana-de-açúcar, mamão, cebola, cacau, soja, videira, mirtilo, caqui, mandioca, kiwi, nogueiras, romãzeiras, oliveira, maracujá, goiaba, nêspera, amoreira, palmeiras, juta, pinhão-manso, lentilha, espinafre, cajueiro, inhame-d'água, sorgo e diversas espécies vegetais de uso ornamental. A complexidade desse gênero fúngico é evidenciada pelo fato de que uma única espécie de *Colletotrichum* sp. pode infectar múltiplas espécies vegetais, enquanto uma única espécie vegetal pode ser suscetível a várias espécies de *Colletotrichum* sp. Por exemplo, existem 26 espécies de *Colletotrichum* associadas à antracnose da manga (TALHINHAS *et al.*, 2023). Essa versatilidade do patógeno, combinada com sua distribuição global, torna o controle da antracnose um desafio significativo para agricultores e pesquisadores, com algumas culturas sofrendo perdas de até 90% da produção em casos severos (NTUI *et al.*, 2021).

Os fungos do gênero *Colletotrichum* sp. são responsáveis por uma série de sintomas em diversas culturas agrícolas. Esses patógenos causam lesões necróticas em folhas, caules, flores e frutos, muitas vezes resultando em manchas marrons ou escuras, deprimidas e com bordas bem definidas. Em alguns casos, as lesões podem apresentar halos cloróticos ou massas de esporos alaranjados. A severidade dos sintomas varia de acordo com a espécie vegetal afetada, podendo incluir desfolhação, morte de brotos, podridão de frutos, queda prematura de frutos e até mesmo a morte da planta inteira em situações extremas (TALHINHAS *et al.*, 2023). Além disso, sintomas específicos incluem queima das flores, necrose da coroa e da raiz em morangos (BARONCELLI *et al.* 2015); torção e descoloração das folhas em cebolas (ALBERTO *et al.*, 2019); lesões encharcadas de água nas folhas de espinafre e cajueiro (TALHINHAS *et al.*, 2023; VELOSO *et al.*, 2021); morte de brotos em citros (PERES *et al.* 2008); e lesões aquosas de formato irregular evoluindo para necroses com centros cinza em folhas de kiwi (TALHINHAS *et al.*, 2023). Em frutos, os sintomas podem variar desde pequenas lesões marrons em maçãs jovens até lesões afundadas com anéis circulares em pêssegos (TURECHEK, 2004; HU *et al.*, 2015). Em casos severos, como na antracnose do inhame, a doença pode afetar todas as partes da planta, levando a perdas significativas na produção (NTUI *et al.*, 2021). Ademais, a antracnose é a doença mais importante em manga (TALHINHAS *et al.*, 2023).

O *Colletotrichum* sp. demonstra uma notável versatilidade, tendo sido identificado em diversos gêneros da família Poaceae. Entre os hospedeiros afetados, destacam-se várias espécies de *Paspalum* sp. (CROUCH *et al.*, 2009), com uma ocorrência recente observada no BAG *Paspalum* da Embrapa Pecuária Sudeste, especificamente em indivíduos de *P. regnellii* (BGP 215). Nos últimos anos, a comunidade científica tem dedicado atenção ao biocontrole do gênero *Colletotrichum*, devido sua importância econômica, explorando o potencial de bactérias pertencentes a diversos gêneros como *Amycolatopsis*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* e *Streptomyces*, entre outros. Esses estudos abrangem diversas culturas agrícolas de relevância econômica (HAN *et al.*, 2015; SADEGHIAN *et al.*, 2016;

JISHA *et al.*, 2018; TEKINER, TOZLU, KOTER, 2019; SANDANI *et al.*, 2019; PUPAKDEEPAN *et al.*, 2023).

O estabelecimento rápido de pastagens oferece benefícios significativos, incluindo uma maior resistência a insetos-pragas e doenças (DIAS FILHO, 1987; VECHIATO & APARECIDO, 2008). Este aspecto ganha particular relevância em espécies vegetais caracterizadas por germinação e crescimento inicial lentos, como é o caso do *P. regnellii* (PRIMAVESI *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2013; BORTOLIN *et al.*, 2015). Nesse contexto, torna-se crucial a adoção de estratégias que minimizem o impacto dos fitopatógenos. O controle biológico emerge como uma abordagem promissora, merecendo investigação aprofundada como alternativa aos métodos convencionais de manejo de doenças em pastagens.

## **1.9. Objetivos**

### **1.9.1. Objetivos gerais**

Estudar a diversidade de bactérias endofíticas associadas à *Paspalum vaginatum*, seu potencial de promoção de crescimento vegetal em *P. vaginatum* e *P. maritimum*, seu potencial como antagonista ao fitopatógeno *Colletotrichum* sp. e como solubilizador de rochas fosfatadas *in vitro* e ao inocular em *Paspalum maritimum*.

### **1.9.2. Objetivos específicos**

- Analisar a diversidade genética a partir da análise do sequenciamento do gene 16S rDNA de 70 isolados bacterianos endofíticos oriundos de *Paspalum vaginatum* (Fernandes *et al.*, 2023);
- Selecionar isolados bacterianos endofíticos associados a *P. vaginatum*, previamente identificados como promissores em experimentos *in vitro* por Fernandes *et al.* (2023), e avaliar, em experimentos *in vivo* conduzidos em casa de vegetação, o potencial de promoção de crescimento vegetal em *Paspalum maritimum* e *P. vaginatum*
- Selecionar bactérias endofíticas associadas ao *P. vaginatum* com alto valor de índice de solubilização de fósforo e avaliar quantitativamente o potencial destas

em solubilizar fosfato inorgânico *in vitro* a partir de diferentes fontes de fósforo (rochas fosfatadas);

- Avaliar a influência de isolados endofíticos, selecionados no ensaio quantitativo *in vitro* de solubilização de fosfato inorgânico, em experimento *in vivo* (casa-de-vegetação) utilizando diferentes fontes de fósforo (rochas fosfatadas), em *P. maritimum*;
- Avaliar, *in vitro*, o potencial antagônico frente ao fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. de isolados bacterianos endofíticos de *P. vaginatum*, previamente selecionados com base em resultados obtidos em experimentos *in vitro* descritos por Fernandes *et al.* (2023).

## Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Os isolados bacterianos utilizados no presente estudo são oriundos do trabalho prévio realizado por Fernandes e colaboradores (2023) em que 70 bactérias endofíticas foram isoladas de *P. vaginatum* e caracterizadas *in vitro* para testes de promoção de crescimento vegetal, sendo eles fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, produção de ácido 3-indolacético e antagonismo ao fungo fitopatógeno *Bipolaris* sp..

### 2.1. Identificação taxonômica de bactérias endofíticas associadas ao *Paspalum vaginatum*

#### 2.1.1. Extração de DNA bacteriano

As colônias bacterianas endofíticas foram cultivadas em tubos com TSB a 28°C por 48 horas sob agitação constante a 150 rpm (FERNANDES *et al.*, 2023). Após a centrifugação das culturas por 10 minutos a 10.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet encaminhado para a Embrapa Pecuária Sudeste para extração de DNA. Os DNAs dos isolados foram extraídos com o uso do Bacteria DNA Preparation Kit (Cellco Biotec do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil), conforme as especificações do fabricante.

### **2.1.2. Amplificação parcial do gene 16S do DNA ribossomal**

A amplificação da região entre V3 e V6 do gene 16S do DNA ribossomal foi realizada por PCR (Reação em cadeia da polimerase) em termociclador programado para desnaturação inicial de cinco minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C, 1 minuto a 72°C e uma extensão final de cinco minutos a 72°C finalizado com 4°C para conservação do DNA. O volume final da reação foi 25 µL (200µM de cada dNTP, 10ng de DNA molde, 1,25 U de Taq DNA polimerase (Cellco), 2,5µL de tampão de Taq DNA polimerase (10x) e 0,4µM de cada primer V3F(5'CCAGACTCCTACGGGAGGCAG-3') e V6R(5'ACATTTCAACACGAGCTGACGA-3')) (CHAKRAVORTY *et al.*, 2007). Após a reação de PCR, a confirmação da amplificação do fragmento foi analisada por meio da eletroforese em gel 1,5% de agarose corado com azul de bromofenol e comparação com o marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder RTU (KASVI).

### **2.1.3. Purificação do DNA amplificado, sequenciamento, edição e análise das sequências**

O DNA amplificado foi submetido à purificação com o uso do QIA quick PCR purification kit (QIAGEN), conforme as especificações do fabricante. Em seguida, as amostras foram analisadas novamente por meio da eletroforese em gel 1,5% de agarose e encaminhadas para sequenciamento no LMseq (Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica) na UNESP Jaboticabal. As sequências forward e reverse, obtidas a partir do gene 16S rDNA, de cada amostra foram editadas utilizando o software BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.2.5) (HALL, 1999) para eliminação das regiões com baixa qualidade de sequenciamento. Posteriormente as sequências forward e reverse foram alinhadas e obtidas as sequências consenso no software AliView (versão 1.8) (LARSSON, 2014). Para identificação do gênero dos isolados bacterianos, as sequências consenso foram submetidas a comparação com sequências depositadas no banco GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) por meio da ferramenta BLASTn (ZHANG *et al.*, 2000; MORGULIS *et al.*,

2008). As sequências consenso também foram submetidas ao banco de dados 16S-Based ID da plataforma EzBioCloud (YOON *et al.*, 2017) para fins de comparação com o resultado obtido a partir do BLASTn, pois se trata de um banco específico do gene 16S rDNA. Todas as sequências obtidas do gene 16S dos isolados neste trabalho foram submetidas ao GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

## 2.2. Árvore filogenética

Por meio do BioEdit Sequence Alignment Editor (versão 7.2.5) (HALL, 1999) foi feito o alinhamento das sequências através da ferramenta ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994). Em seguida, o alinhamento foi transferido para o Molecular Evolutionary Genetics Analysis - MEGA - (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021), 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. Foi utilizado o modelo de substituição Tamura 3, com distribuição gama para modelar a heterogeneidade das taxas de substituição entre diferentes posições no alinhamento. Além das sequências obtidas no presente estudo, foram utilizadas as sequências das seguintes linhagens de referência depositadas no GenBank para efeito de comparação: *Rhodococcus qingshengii* strain djl-6-2 (NR\_115708.1), *Psychrobacillus vulpis* strain Z8 (NR\_180209.1), *Neobacillus mesonae* strain FJAT-13985(NR\_133976.1), *Myroides odoratimimus* strain CCUG 39352 (NR\_042354.1), *Jeotgalicoccus halotolerans* strain YKJ-101 (NR\_025643.1), *Delftia lacustris* strain 332 (NR\_116495.1), *Curtobacterium albidum* strain DSM 20512 (NR\_115035.1), *Lysinibacillus xylanilyticus* strain XDB9 (NR\_116698.1), *Stenotrophomonas geniculata* (NR\_024708.1), *Pantoea deleyi* strain LMG 24200 (NR\_116114.1) , *Staphylococcus aureus* strain S33 R(NR\_037007.2), *Enterobacter sichuanensis* strain WCHECL1597 (NR\_179946.1), *Micrococcus endophyticus* strain YIM 56238 (NR\_044365.1), *Agrobacterium larrymoorei* strain AF3.10 (NR\_026519.1), *Paenibacillus pabuli* strain HSCC 492 (NR\_040853.1), *Pseudomonas palmensis* strain BBB001(NR\_181427.1), *Bacillus amyloliquefaciens* strain BCRC 11601 (NR\_116022.1), *Bacillus pumilus* strain ATCC 7061 (NR\_043242.1), *Bacillus mycoides* strain DSM 11821 (NR\_024697.1). Dessa forma, foram usadas sequências

referência (RefSeq) de espécies dos gêneros encontrados no presente estudo, sendo pelo menos 1 RefSeq para cada gênero. O gênero *Halobacterium* (NR\_113428.1) foi escolhido como outgroup no dendograma por se tratar de uma Archea.

### **2.3. Ensaios *in vivo* de promoção de crescimento vegetal em casa de vegetação**

Os experimentos *in vivo* foram conduzidos na Embrapa Pecuária Sudeste (21°57'42" S, 47°50'9;28" W, 860m), em São Carlos, SP.

#### **2.3.1. *Paspalum maritimum***

O acesso de *P. maritimum* (BGP 210) foi escolhido para o presente estudo pois é um material do programa de melhoramento da Embrapa Pecuária Sudeste, detalhes do acesso podem ser encontrados no Alelo vegetal, um sistema da Embrapa que gerencia dados e informações sobre recursos genéticos vegetais, disponível em <<https://av.cenargen.embrapa.br/avconsulta/Passaporte/detalhes.do?ida=45175>>.

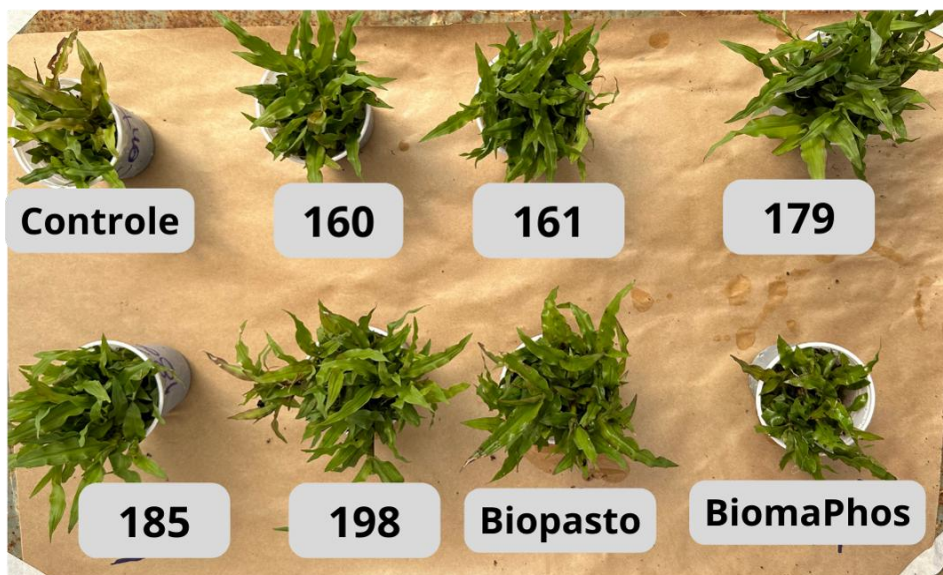
Os gêneros bacterianos endofíticos de *Pantoea* sp. (isolados 160, 179 e 198) e *Enterobacter* sp. (161 e 185) foram selecionados a partir dos resultados obtidos previamente por Fernandes e colaboradores (2023). Assim, todos os isolados apresentaram alto índice de solubilização de fosfato *in vitro* e também foram capazes de fixar nitrogênio e produzir ácido indol-acético.

As sementes de *Paspalum maritimum* provenientes do Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Pecuária Sudeste 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>).

As sementes foram desinfestadas superficialmente, conforme De Moraes (2021) com modificações, sendo suspensas em hipoclorito de sódio 5% (v/v) por 1 minuto, etanol 70% por 30 segundos e lavadas duas vezes em água destilada. Em seguida, as sementes foram embebidas na cultura bacteriana por 2 horas e plantadas em sementeiras com substrato previamente autoclavado. As culturas bacterianas foram previamente padronizadas 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 controle negativo foi feito apenas imergindo as raízes das mudas em meio de cultura líquido (TSB) esterilizado. Além disso, foram utilizados dois produtos comerciais como controle positivo, o BiomaPhos® e o Biopasto®. O BiomaPhos® é um inoculante solubilizador de fósforo desenvolvido pela Embrapa em parceria com a empresa Simbiose/Bioma e contém as estirpes *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *B. megaterium* (CNPMS B119), sendo utilizado 100mL/kg de semente (OLIVEIRA-PAIVA, 2021). O Biopasto é um inoculante multifuncional para pastagens como Braquiárias, desenvolvido pela Embrapa em parceria com a empresa Biotrop, é composto por *Pseudomonas fluorescens* (8mL/kg de semente), *Azospirillum brasilense* de (8mL/kg de semente) e aditivo protetor (4mL/kg de semente) (HUNGRIA & NOGUEIRA, 2021). Em seguida, as sementes foram plantadas em sementeiras contendo substrato comercial para plantas *Carolina Soil*® (Carolina Soil do Brasil LTDA) esterilizado.

Após 30 dias, o preparo das mudas foi realizado de acordo com De Paula e colaboradores (2022), com modificações. As mudas foram retiradas do substrato, selecionadas de acordo com seu vigor e tamanho (totalizando 12 mudas por tratamento), suas raízes cortadas parcialmente e embebidas nas culturas bacterianas padronizadas em  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL e nas soluções controle por 30 minutos (Figura 2.1). Posteriormente, as mudas foram transplantadas para vasos de isopor de 500 mL contendo uma mistura de solo autoclavado advindo da Embrapa Pecuária Sudeste e substrato comercial para plantas *Carolina Soil*® (Carolina Soil do Brasil LTDA), na proporção 2:1 (Figura 2.2). Após 30 dias foi realizada a terceira inoculação bacteriana, dessa vez por deposição bacteriana no solo que consiste no depósito de 6 mL de cultura bacteriana padronizadas em  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Foi realizada a avaliação das plantas, durante 6 semanas, na qual foram analisadas as seguintes características: a) número de perfilhos, b) comprimento da planta. Durante todo o processo, as mudas foram mantidas em casa-de-vegetação telado. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com doze repetições.



**Figura 2.1** Imersão das raízes de *Paspalum maritimum* em solução bacteriana padronizada. Registrado pelo autor.



**Figura 2.2** Mudas de *Paspalum maritimum* transplantadas para vasos de isopor. Registrado pelo autor.

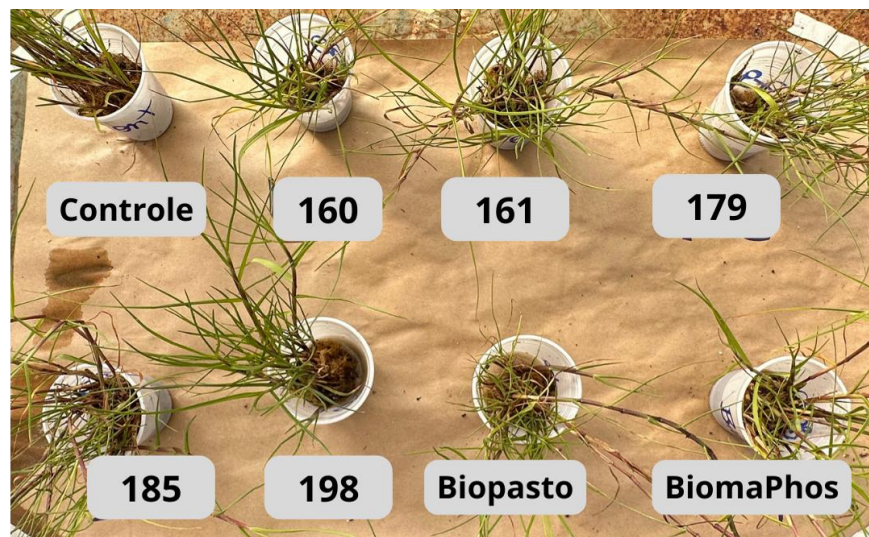
Ao final do experimento, as plantas foram retiradas dos vasos, lavadas com água corrente e a parte aérea foi separada da raiz. As partes vegetais citadas foram armazenadas em sacos de papel e encaminhadas para secagem por 120 h em estufa a 60

°C. A análise da matéria seca das plantas foi realizada por meio de pesagem da parte aérea e raiz da planta, conforme De Paula e colaboradores (2022), com modificações.

### **2.3.2. *Paspalum vaginatum***

De acordo com Reis (2007) é incomum a espécie de *Paspalum vaginatum* produzir flores, portanto, para este ensaio de promoção de crescimento em casa-de-vegetação não foram utilizadas sementes de *P. vaginatum* para a produção das mudas e sim foram coletadas mudas diretamente do acesso BGP 114 de *P. vaginatum* provenientes do BAG da Embrapa Pecuária Sudeste. As mudas foram plantadas em sementeiras com substrato para plantas Carolina Soil® (Carolina Soil do Brasil LTDA), previamente autoclavado, por 30 dias.

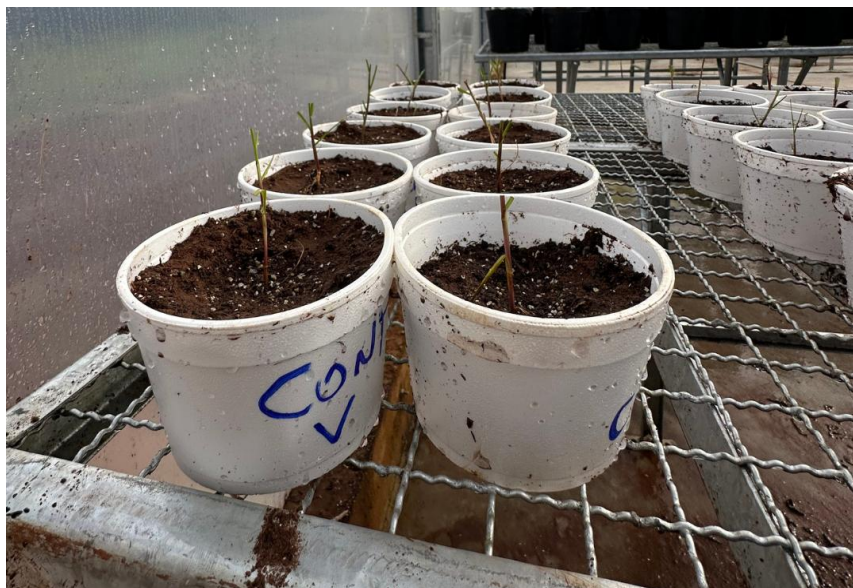
As mudas foram retiradas do substrato, selecionadas de acordo com seu vigor e tamanho (totalizando 12 mudas por tratamento), suas raízes cortadas parcialmente e embebidas nas culturas bacterianas padronizadas em  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL e nas soluções controle por 30 minutos (Figura 2.3). O controle negativo foi feito apenas imergindo as raízes das mudas em meio de cultura líquido (TSB) esterilizado. Além disso, foram utilizados dois produtos comerciais como controle positivo, o BiomaPhos® e o Biopasto®. O BiomaPhos® é um inoculante solubilizador de fósforo desenvolvido pela Embrapa em parceria com a empresa Simbiose/Bioma e contém as estirpes *Bacillus subtilis* (CNPMS B2084) e *B. megaterium* (CNPMS B119), sendo utilizado 100mL/kg de semente (OLIVEIRA-PAIVA, 2021). O Biopasto é um inoculante multifuncional para pastagens como Braquiárias, desenvolvido pela Embrapa em parceria com a empresa Biotrop, é composto por *Pseudomonas fluorescens* (8mL/kg de semente), *Azospirillum brasilense* de (8mL/kg de semente) e aditivo protetor (4mL/kg de semente) (HUNGRIA & NOGUEIRA, 2021).



**Figura 2.3** Imersão das raízes de *Paspalum vaginatum* em solução bacteriana padronizada. Registrado pelo autor.

Posteriormente, as mudas foram transplantadas para vasos de isopor de 500 mL contendo uma mistura de solo autoclavado advindo da Embrapa Pecuária Sudeste e substrato comercial para plantas *Carolina Soil*<sup>®</sup> (Carolina Soil do Brasil LTDA), na proporção 2:1 (Figura 2.4). Após 30 e 60 dias foram realizadas a segunda e terceira inoculação bacteriana, dessa vez por deposição bacteriana no solo que consiste no depósito de 6 mL de cultura bacteriana padronizadas em  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Foi realizada a avaliação das plantas, durante seis semanas, a qual contabilizaram-se três características: comprimento da planta, número de perfilhos aéreos e número de perfilhos basais. Durante todo o processo, as mudas foram mantidas em telado. Foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado com doze repetições.

Ao final do experimento, as plantas foram retiradas dos vasos, lavadas e a parte aérea foi separada da raiz, as partes vegetais citadas foram armazenadas em sacos de papel e encaminhadas para secagem por 120 h em estufa a 60 °C. A análise das plantas foi realizada por meio de pesagem da massa seca da parte aérea e raiz da planta, conforme De Paula e colaboradores (2022), com modificações.



**Figura 2.4** Mudanças de *Paspalum vaginatum* transplantadas para vasos de isopor. Registrado pelo autor.

#### **2.4. Ensaio *in vitro* de solubilização de fosfato inorgânico a partir de rochas fosfatadas**

Dentre os 70 isolados bacterianos, foram selecionados sete isolados que apresentaram índice de solubilização de fosfato (VERMA; LADHA; TRIPATHI, 2001) maior que 3 (SILVA FILHO; VIDOR, 2000), de acordo com Fernandes e colaboradores (2023), sendo quatro pertencentes ao gênero *Pantoea* sp. (isolados 160, 179, 180, e 198) e três pertencentes ao gênero *Enterobacter* sp. (isolados 161, 184 e 185). Todos estes isolados estão depositados na coleção de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas (LaMiB) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Para quantificar o fósforo (F), solubilizado pelos isolados bacterianos endofíticos, oriundo 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). Os sete isolados bacterianos foram padronizados em  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL pela escala de McFarland, sendo 0,5 mL inoculados em frascos *erlenmeyer* de 125 mL contendo 50mL de meio líquido NBRIP suplementado com uma das quatro fontes de fósforo: rocha fosfatada Araxá (29,93 % de  $P_2O_5$  total e 5,74 % solúvel em ácido cítrico a 2 %), rocha fosfatada

Bayovar (28,9 % de  $P_2O_5$  total e 14,8 % solúvel em ácido cítrico a 2 %), superfosfato triplo granulado (46 % de  $P_2O_5$  total e 41 % solúvel em ácido cítrico a 2 %) e fosfato de cálcio (45,8% de  $P_2O_5$  total) ( $Ca_3(PO_4)_2$ ). 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. Os frascos foram incubados a 28 °C, sob agitação de 180 rpm por 10 dias.

Após o período de incubação (Figura 2.5), alíquotas foram removidas para avaliar a concentração de P solubilizado pelo método colorimétrico azul de molibdênio a 880 nm (MURPHY; RILEY, 1962) e o pH final do meio de cultura. Inicialmente, 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 cinco 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 mol/L), 37,5 ml de molibdato de amônio (0,03 mol/L), 12,5 ml de tartarato de antimônio-potássio ( $4,1071 \times 10^{-3}$  mol/L). Após 20 minutos de reação, a intensidade da cor azul formada foi aferida em espectrofotômetro a 880 nm.



**Figura 2.5** Erlenmeyers contendo meio NBRIP, diferentes fontes de fósforo e diferentes culturas bacterianas após 10 dias de incubação. Registrado pelo autor.

A concentração final de P foi calculada utilizando uma curva padrão preparada com fosfato de potássio monobásico ( $KH_2PO_4$ ), 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). Para obtenção da curva padrão, também foi utilizado o método colorimétrico azul de molibdênio. Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas em triplicata.

## **2.5. Experimento de solubilização de fósforo *in planta* em *P. maritimum***

As bactérias endofíticas selecionadas para este ensaio foram os isolados 160 (*Pantoea* sp.), 161 (*Enterobacter* sp.) e 179 (*Pantoea* sp.). Todos estes isolados possuem potencial de promoção de crescimento vegetal, foram obtidos da endosfera 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.

### **2.5.1. Preparo do solo**

O solo, de textura média, utilizado no presente estudo foi analisado quanto a características físico-químicas (conforme VAN RAIJ et al, 2001) e, com base nos resultados desta análise (tabela 2.1), 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 quatro partes, três delas preparadas com diferentes fontes de fosfato e uma sem fosfato, considerada o solo controle. As fontes de fosfato utilizadas foram: (1) rocha fosfatada Araxá (29,93 % de  $P_2O_5$  total e 5,74 % solúvel em ácido cítrico a 2 %); (2) rocha fosfatada Bayovar (28,9 % de  $P_2O_5$  total e 14,8 % solúvel em ácido cítrico a 2 %) e (3) superfosfato triplo granulado (46 % de  $P_2O_5$  total e 41 % solúvel em ácido cítrico a 2 %). Visto que o fosfato de cálcio não é comumente utilizado na agricultura para fornecer fósforo para as plantas, optou-se por não utilizá-lo na experimentação em casa de vegetação. O peso de cada fonte de fósforo foi ajustado para que a cada 500g de solo fosse adicionado 150mg de P ou 344mg de  $P_2O_5.kg^{-1}$ . A mistura de 0,5kg de solo e sua respectiva fonte de fósforo foi utilizada no enchimento de vasos de isopor de 500 mL.

**Tabela 2.1** Análise físico-química utilizada no ensaio

Descritor	Quantidade
Areia	57,7 %
Argila	35,4%
Silte	6,9%
pH (CaCl <sub>2</sub> )	5,2
P (res)	10 mg.dm <sup>-3</sup>
K	1,3 mmol. dm <sup>-3</sup>
Ca	22 mmol. dm <sup>-3</sup>
Mg	7 mmol. dm <sup>-3</sup>
S.SO <sub>4</sub>	9 mmol. dm <sup>-3</sup>
CTC	55 mmol. dm <sup>-3</sup>
V(%)	55%

**Ph (CaCl<sub>2</sub>):** potencial hidrogeniônico medido em solução de cloreto de cálcio; **P(res):** fósforo remanescente; **K:** potássio; **Ca:** cálcio; **Mg:** magnésio; **S.SO<sub>4</sub>:** enxofre na forma de sulfato; **CTC:** Capacidade de troca de cátions; **V%:** saturação por bases.

### 2.5.2. Preparo das sementes e dos inóculos bacterianos

As sementes de *P. maritimum* (BGP 210) foram gentilmente cedidas pelo curador do BAG Paspalum, Dr. Marcelo Mattos Cavallari (<https://av.cenargen.embrapa.br/avconsulta/Passaporte/detalhesBanco.do?idb=77>).

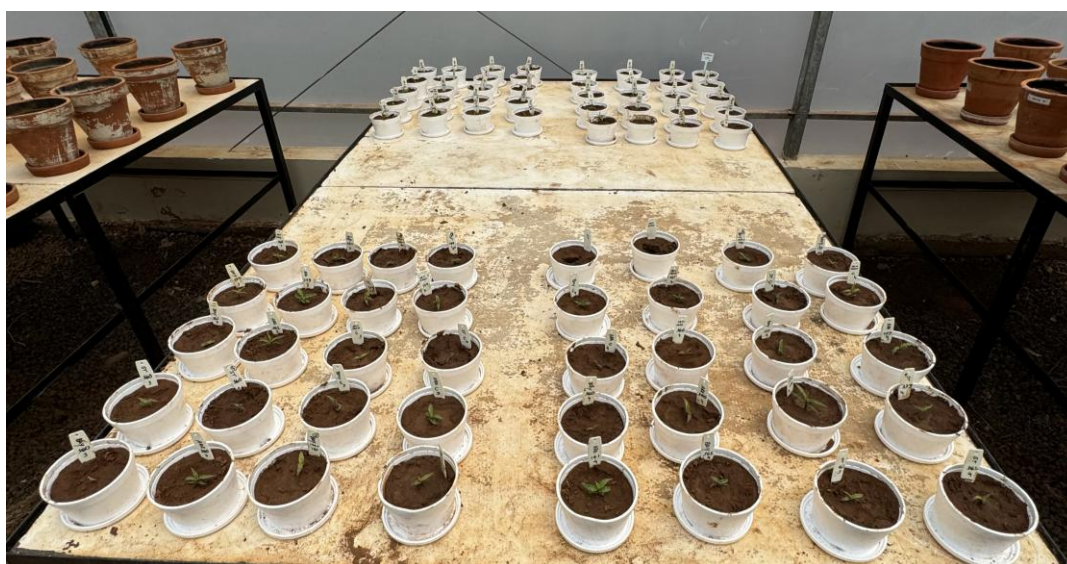
Essas sementes passaram por assepsia superficial, conforme De Moraes (2021) com modificações, sendo suspensas por 1 minuto em solução de hipoclorito de sódio 5 % (v/v), 30 segundos em etanol 70 % e lavadas duas vezes em água destilada esterilizada. Em seguida, as sementes foram embebidas na cultura bacteriana por 2 horas e plantadas em sementeiras com substrato Carolina Soil. As culturas bacterianas foram previamente padronizadas 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).

Após 45 dias, o preparo das mudas foi realizado de acordo com De Paula e colaboradores (2022), com modificações. As mudas foram retiradas do substrato, selecionadas de acordo com seu vigor e tamanho (Figura 2.6) (totalizando quatro mudas

por tratamento), suas raízes cortadas parcialmente e embebidas nas culturas bacterianas padronizadas em  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL e nas soluções controle por 30 minutos. Posteriormente, as mudas foram transplantadas para vasos de isopor de 500 mL contendo uma mistura de 0,5kg de solo e sua respectiva fonte de fósforo (Figura 2.7). Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizados com quatro repetições.



**Figura 2.6** Mudanças de *Paspalum maritimum* após retirar o substrato das raízes. Registrado pelo autor.



**Figura 2.7** Mudanças de *Paspalum maritimum* transplantadas para vasos de isopor de 500 mL contendo uma mistura de 0,5kg de solo e sua respectiva fonte de fósforo. Registrado pelo autor.

O experimento foi conduzido com 16 tratamentos resultantes da combinação dos quatro tratamentos bacterianos e dos quatro tratamentos do solo. Os tratamentos bacterianos consistiram no controle o qual não há inoculação bacteriana, inoculação da

Bac 160 (*Pantoea* sp.), inoculação da Bac 161 (*Enterobacter* sp.) e inoculação da Bac 179 (*Pantoea* sp.). Já os tratamentos do solo consistiram em um controle sem adição de fósforo, adição de rocha fosfatada de Araxá, adição de rocha fosfatada de Bayovar e adição de Superfosfato Triplo (SFT). Especificamente, cada um dos tratamentos bacterianos foi aplicado em conjunto com cada um dos tratamentos do solo, originando os 16 tratamentos estudados. O tratamento controle em que não há inoculação bacteriana foi feito apenas imergindo as sementes em meio de cultura líquido (TSB) estéril.

Após 30 e 60 dias do transplante, foi realizada adubação mineral (Figura 2.8), aplicando-se em cada vaso próximo a raiz das plantas 25 mL de solução de sulfato de potássio ( $K_2SO_4$ ) (3 g/L) e uréia ( $CH_4N_2O$ ) (4,45g/L).



**Figura 2.8** Adubação mineral em *Paspalum maritimum*. Registrado pelo autor.

### **2.5.3. Cortes da parte aérea das plantas e avaliação de parâmetros agronômicos**

Foram realizados dois cortes da parte aérea das plantas, o primeiro após 50 dias do transplante (Figura 2.9) e o segundo após 30 dias do primeiro corte, nessa etapa também foi retirada a terra das raízes das plantas para desmonte do experimento. A parte aérea e a raiz das plantas foram armazenadas em sacos de papel para secagem em estufa por 120

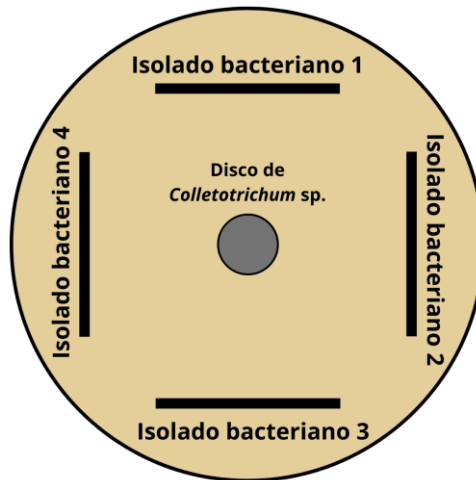
h a 60 °C. Após os 5 dias de secagem foram mensurados a matéria seca da parte aérea e a matéria seca radicular com o auxílio de uma balança digital.



**Figura 2.9** *Paspalum maritimum* após realização do primeiro corte. Registrado pelo autor.

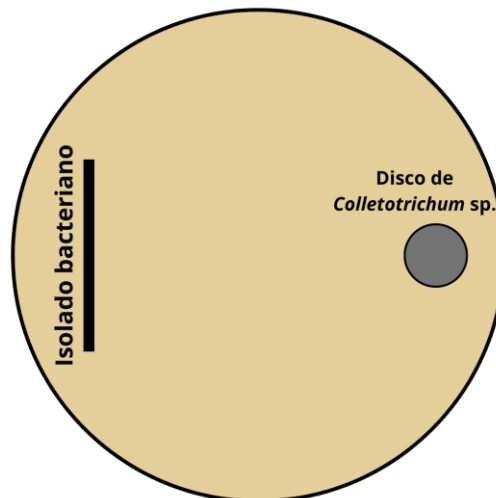
### **2.6. Atividade antagonista a *Colletotrichum* sp. e pareamento direto *in vitro***

O potencial antagônico dos 70 isolados bacterianos endofíticos de *P. vaginatum* em relação ao fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. foi analisado por meio de testes antagônicos. A cepa de *Colletotrichum* sp. foi gentilmente cedida pela Dra Sônia Regina Nogueira Stephan da Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP. Primeiramente, foi realizada uma triagem, na qual os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri contendo o meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) em quatro pontos equidistantes, em seguida discos (cortados de placas de Petri) de 0,5 cm de diâmetro contendo *Colletotrichum* sp. previamente cultivado em meio BDA foram adicionados no centro de cada placa (Figura 2.10). As placas foram incubadas a 28°C por 10 dias. Uma placa comportando apenas um disco com *Colletotrichum* sp. no centro serviu como controle do experimento.



**Figura 2.10** Representação de uma placa de Petri com a metodologia para triagem de antagonismo *in vitro* de bactérias endofíticas associadas *Paspalum vaginatum*, em relação ao fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. Desenvolvido pelo autor.

A segunda etapa dos testes antagônicos, foi realizada por meio do método de pareamento direto. Os isolados selecionados pela triagem anterior foram estriados, com auxílio de um de um palito descartável autoclavado, em uma das extremidades da placa. Em seguida, discos (cortados de placas de Petri) de 0,5 cm de diâmetro contendo *Colletotrichum* sp. previamente cultivado em meio PDA foram adicionados à outra extremidade das placas (MARIANO, 1993), conforme a Figura 2.11. O procedimento foi realizado em triplicata.



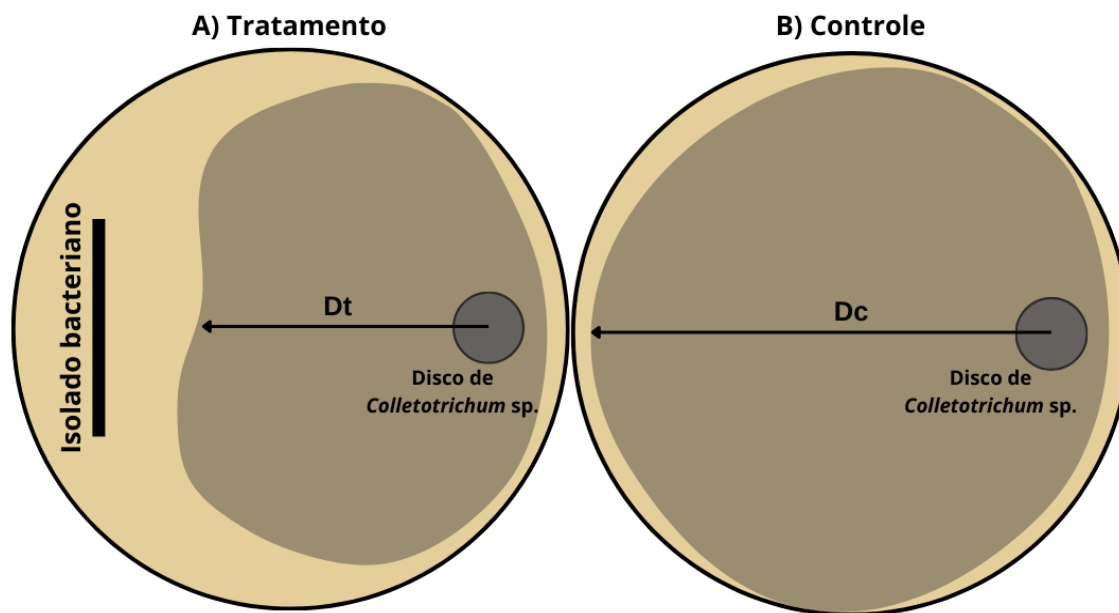
**Figura 2.11** Representação de uma placa de Petri com a técnica de pareamento direto *in vitro* para avaliação do potencial antagônico dos isolados endofíticos associados a *Paspalum vaginatum*, em relação ao fungo *Colletotrichum* sp. Desenvolvido pelo autor.

Uma placa comportando apenas um disco com *Colletotrichum* sp. no centro serviu como controle do experimento. A presença de um halo de inibição no crescimento do fungo indica que o isolado apresenta atividade antagonista. A avaliação do experimento foi realizada quando a placa contendo apenas o disco fúngico (controle) apresentou o crescimento de uma extremidade a outra da placa de Petri. As placas foram incubadas por 10 dias a 28°C.

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

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

As medições dos diâmetros miceliais do controle e tratamento nas placas foram realizadas conforme a Figura 2.12.



**Figura 2.12** Representação esquemática do ensaio de pareamento direto *in vitro* utilizando duas placas de Petri, com os diâmetros utilizados para determinação da %inibição dos isolados endofíticos associados a *Paspalum vaginatum*, em relação ao fungo *Colletotrichum* sp. A) Placa do tratamento em que Dt= Diâmetro micelial no Tratamento; B) Placa do controle em que Dc= Diâmetro micelial no Controle. Desenvolvido pelo autor.

## **2.7. Metodologia estatística**

### **2.7.1. Ensaio de promoção de crescimento vegetal *in vivo***

#### **2.7.1.1. Dados de matéria seca de *P. vaginatum* e *P. maritimum***

Os dados de matéria seca (g) em *P. maritimum* e *P. vaginatum* foram submetidos a uma Análise de Variância pelo procedimento GLM do SAS (SAS, 2023), considerando no modelo o efeito de Tratamento (Controle, Bac 160, Bac 161, Bac 179, Bac 185, Bac 198, BiopmaPhos e Biopasto). As análises foram conduzidas separadamente para cada parte da planta (Parte Aérea e Raiz). O modelo usado foi:  $Y_{ij} = \text{TRAT} + \text{Erro}$ , sendo que  $Y_{ij}$  corresponde à variável resposta (matéria seca da parte aérea ou matéria seca da raiz), TRAT corresponde ao efeito do tratamento, e Erro corresponde ao erro experimental. Para as comparações múltiplas das médias de tratamento em cada parte da planta, adotou-se o teste de Tukey, na opção LSMEANS do SAS, com nível de significância  $p \leq 5\%$ . A unidade experimental-repetição era o vaso, sendo que cada tratamento tinha observação de 12 vasos ( $n=12$ ). Os resultados foram organizados em forma de tabelas e gráficos.

#### **2.7.1.2. Dados de comprimento e número de perfilhos, por semana, de *P. vaginatum* e *P. maritimum***

Os dados coletados para as variáveis para *Paspalum maritimum* (Comprimento\_M (cm) e número de perfilhos basais (un)) e para *Paspalum vaginatum* (Comprimento\_V (cm), número de perfilhos basais (un) e número de perfilhos aéreo(n)) foram submetidos a análise de variância utilizando o procedimento MIXED do SAS (SAS, 2023), considerando no modelo o efeitos fixo de Tratamento (Controle, Bac 160, Bac 161, Bac 179, Bac 185, Bac 198 Biomaphos e Biopasto), adotando uma estrutura de medidas repetidas no tempo, tendo como medida repetida a semana (1 a 6). A unidade experimental-repetição era o vaso, sendo que cada tratamento tinha observação de 12 Vasos ( $n=12$ ). O modelo usado foi:  $Y_{ijk} = \text{Trat} + \text{Vaso}(\text{TRAT}) + \text{Semana} + \text{Semana} * \text{TRAT} + \text{Erro}$ . Na escolha da estrutura das respectivas matrizes de variância e covariância, para as variáveis estudadas foi utilizado o critério do menor valor de AIC (AKAIKE,1974). Para as comparações múltiplas entre as médias foi adotado o teste ajustado de TUKEY, na opção LSMEANS, com nível de

significância  $p \leq 5\%$ . Para estabilizar as variâncias e normalização dos dados foi necessário usar a transformação dos dados para Comprimento\_V ( $Y^{**0,25}$ ), NP\_Basal\_V ( $Y^{**0,5}$ ) e NP\_Aereo\_V ( $Y^{**0,5}$ ). Os resultados foram organizados em forma de tabelas e gráficos.

## **2.7.2. Ensaio de solubilização de fósforo *in vivo***

### **2.7.2.1. Dados de matéria seca total da parte aérea e da raiz**

Os dados da MS total e Raiz foram submetidos a uma Análise de Variância pelo procedimento GLM do SAS (SAS, 2023), considerando no modelo os efeitos de inoculo (I=1,2,3 e 4); Fonte de Fosforo (P=1,2,3 e 4) e a interação. O modelo usado foi:  $Y_{ij} = I + P + I*P + \text{Erro}$ . Para as comparações múltiplas das médias adotou-se o teste de Tukey, na opção LSMEANS do SAS, com nível de significância  $p \leq 5\%$ . Os resultados foram organizados em forma de tabelas

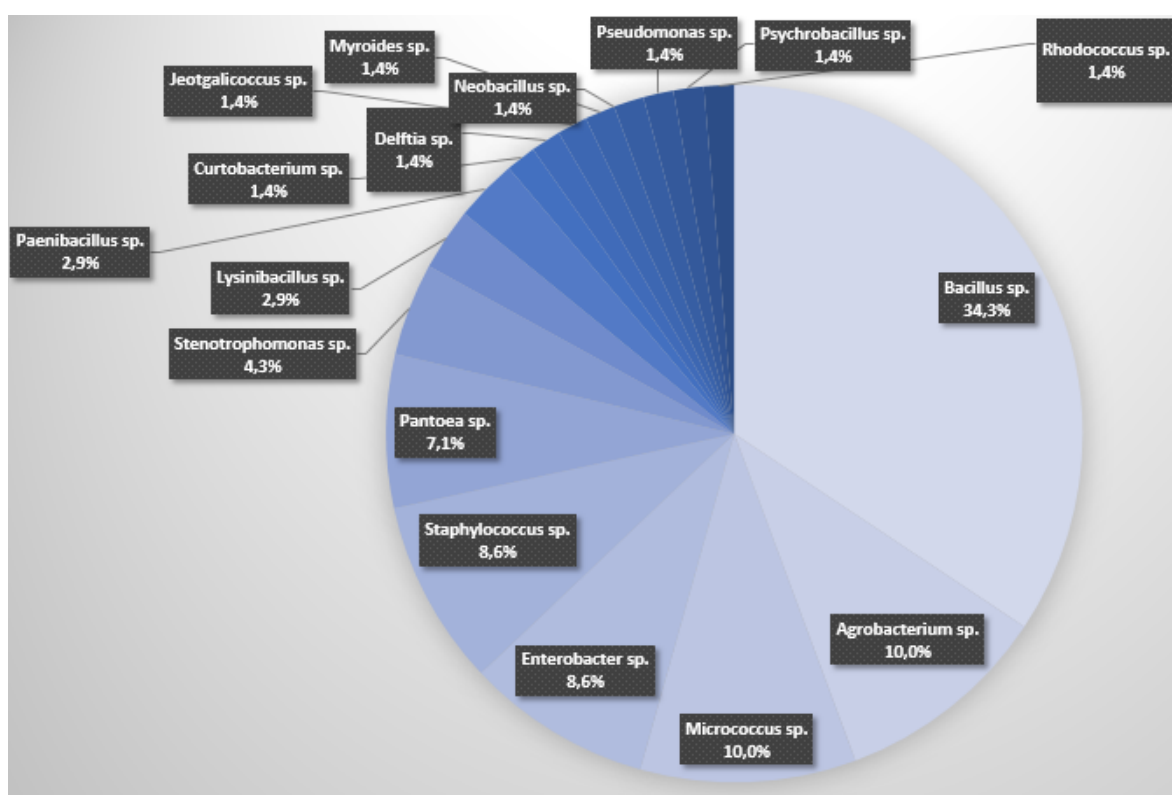
### **2.7.2.2. Dados da matéria seca considerando o efeito de corte**

Os dados da matéria seca de *Paspalum maritimum* foram submetidos à análise de variância utilizando o procedimento MIXED do SAS (SAS, 2023), considerando no modelo os efeitos de inóculo (I=1,2,3 e 4); fonte de fósforo (P=1,2,3 e 4) e corte (C=1,2) e as respectivas interações. Nesta análise adotou-se uma estrutura de medidas repetidas no tempo, tendo como medida repetida o corte (C=1 e 2). Como unidade experimental foi utilizado o vaso, sendo que cada tratamento tinha  $n=4$  observações. O modelo usado foi:  $Y_{ijk} = I + P + I*P + \text{rep}(I*P) + C + I*C + P*C + I*P*C + \text{Erro}$ . Na escolha da estrutura das respectivas matrizes de variância e covariância, para a variável estudada foi utilizado o critério do menor valor de AIC (AKAIKE,1974). Para as comparações múltiplas entre as médias utilizou-se o teste ajustado de TUKEY, na opção LSMEANS, com nível de significância  $p \leq 5\%$ . Os resultados foram organizados em forma de tabelas e gráficos.

## Capítulo 3 – Resultados e Discussão

### 3.1. Identificação dos isolados endofíticos e árvore filogenética

Ao sequenciar o gene 16S rDNA de 70 bactérias endofíticas isoladas por Fernandes e colaboradores (2023), foram identificados 17 gêneros bacterianos, sendo eles *Bacillus* sp. (34,3%), *Agrobacterium* (10%), *Micrococcus* (10%), *Enterobacter* (8,6%), *Staphylococcus* (8,6%), *Pantoea* (7,1%), *Stenotrophomonas* (4,3%), *Lysinibacillus* (2,9%), *Paenibacillus* (2,9%), *Curtobacterium* (1,4%), *Delftia* (1,4%), *Jeotgalicoccus* (1,4%), *Myroides* (1,4%), *Neobacillus* (1,4%), *Pseudomonas* (1,4%), *Psychrobacillus* (1,4%), *Rhodococcus* (1,4%) (Figura 3.1 e Apêndice A).



**Figura 3.1** Proporção dos gêneros bacterianos endofíticos associados ao *Paspalum vaginatum*. Desenvolvido pelo autor.

A diversificação de meios de cultura pode promover o isolamento de maior biodiversidade de bactérias cultiváveis, incluindo as que necessitam de fontes nutricionais complexas para seu desenvolvimento (KUMAR & JADEJA, 2016; HASSAN *et al.*, 2019). Portanto, o uso de um meio de cultura utilizado por Fernandes e colaboradores (2023)

pode ter influenciado a diversidade de gêneros bacterianos encontrados no presente estudo.

Lisboa (2024) ao isolar bactérias rizosféricas do mesmo acesso de *P. vaginatum* (BGP 114) identificou cerca de 62,8% do total de bactérias, sendo determinado o gênero daquelas com resultados positivos para testes de promoção de crescimento vegetal. Este mesmo autor, identificou 28 gêneros bacterianos e, assim como no presente estudo de bactérias endofíticas, o gênero *Bacillus* predominou com a maior porcentagem de isolamento (31%), seguido de outros gêneros como *Priestia* (8%), *Streptomyces* (8%), *Microbacterium* (7%), *Acinetobacter* (5%), *Arthrobacter* (4%), *Lysinibacillus* (4%), *Burkholderia* (3%), *Staphylococcus* (3%), *Amycolatopsis* (2%), *Enterobacter* (2%), *Kitasatospora* (2%), *Nocardia* (2%), *Prescottella* (2%) e a proporção restante dividida entre os gêneros *Agrobacterium*, *Brevibacillus*, *Chryseobacterium*, *Curtobacterium*, *Dyella*, *Leifsonia*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sinomonas* e *Stenotrophomonas* (LISBOA, 2024).

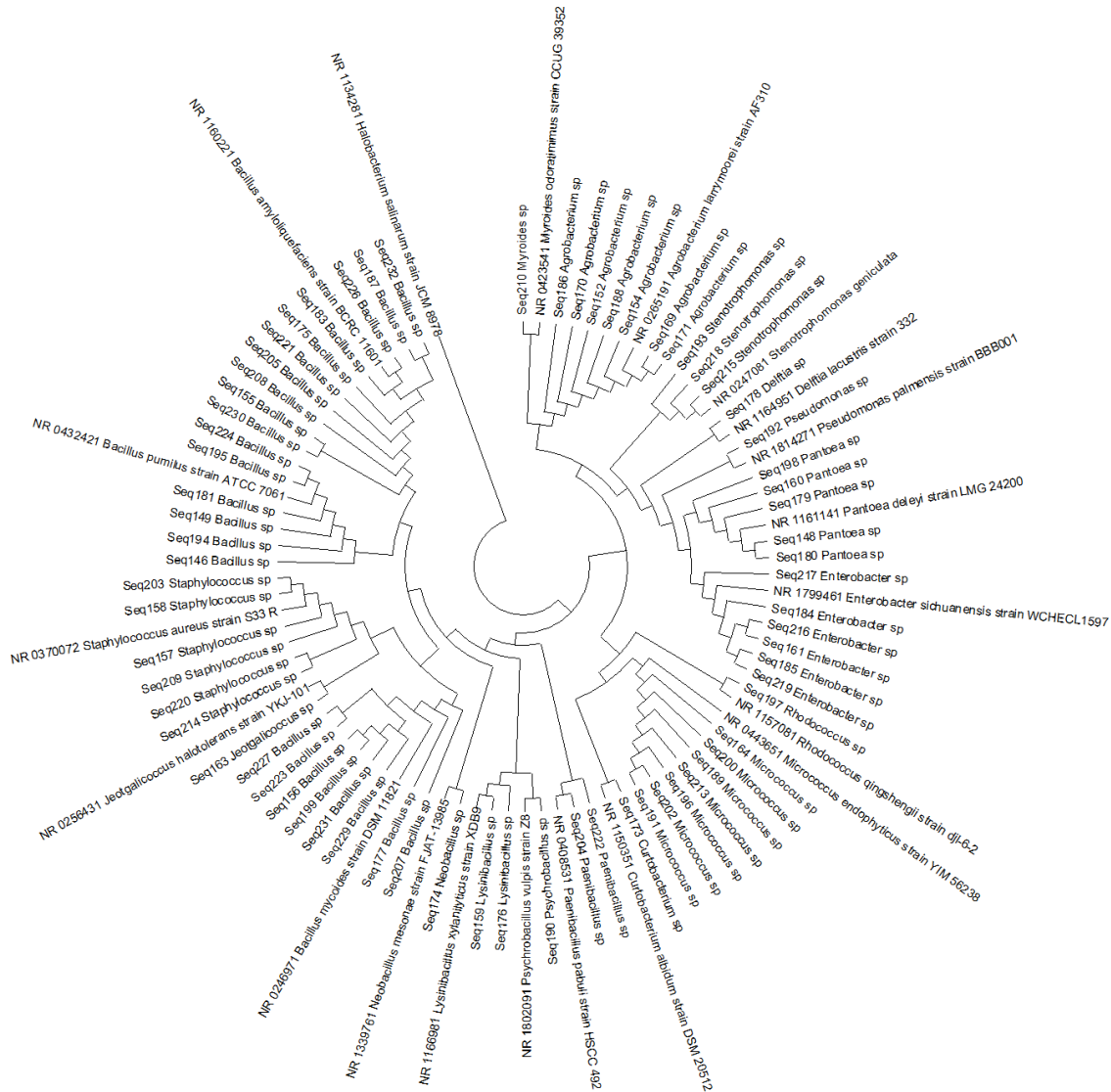
Assim, cerca de 59% dos gêneros bacterianos identificados no presente estudo também foram identificados por Lisboa (2024), o que reforça a noção de que as comunidades microbianas endofíticas frequentemente se originam da população de rizobactérias (ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2019; BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012; HARDOIM; VAN OVERBEEK; VAN ELSAS, 2008). Este fenômeno pode ser atribuído à capacidade dessas bactérias de inicialmente se estabelecerem na rizosfera e, subsequentemente, colonizarem o interior vegetal. Tal processo envolve mecanismos complexos, incluindo quimiotaxia, produção de enzimas que degradam a parede celular e formação de biofilmes (KANDEL *et al.*, 2017; HARDOIM *et al.*, 2015; COMPANT *et al.*, 2010). A porcentagem de sobreposição de 59% pode ser justificada, uma vez que Lisboa (2024) não identificou toda a comunidade bacteriana rizosférica. É razoável supor que esta porcentagem possa aumentar com uma análise mais abrangente dos isolados rizosféricos. Os gêneros encontrados em ambos trabalhos são: *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas*.

De Paula e colaboradores (2022) relataram isolados bacterianos endofíticos associados ao *Paspalum atratum* com melhores resultados para testes de promoção de crescimento vegetal. Assim como o presente trabalho, de Paula (2022) identificou gêneros como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Pantoea* e *Pseudomonas*. Já Liu e colaboradores (2021), ao estudarem a comunidade bacteriana endofítica diazotrófica de *P. vaginatum*, identificaram os seguintes gêneros bacterianos: *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Lysinibacillus*, *Myroides*, *Rhizobium*, *Staphylococcus* e *Stenotrophomonas*. Estes autores possivelmente identificaram menor número de gêneros quando comparado com o presente estudo devido ao meio de cultura seletivo utilizado. Liu e colaboradores (2021) utilizaram meio livre de nitrogênio para isolar bactérias diazotróficas, já as bactérias do presente estudo foram isoladas a partir de TSA (Tryptic Soy Agar), um meio nutritivo para crescimento geral de bactérias. Ademais, diversos fatores bióticos e abióticos podem influenciar na variedade da comunidade bacteriana endofítica, como a espécie, idade, genótipo e propriedade da cutícula da planta hospedeira, os exsudatos radiculares, o tipo de solo, a condição climática, condições do solo (umidade, pH, poluentes) e estresse (PAPIK *et al.*, 2020; DING; MELCHER, 2016; PEÑUELAS *et al.*, 2012; HALLMANN; BERG, 2006; SICILIANO *et al.*, 2001; ZIHONG *et al.*, 1999).

Um estudo com 126 bactérias rizosféricas isoladas de 10 acessos de *Paspalum* identificou 74 isolados pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Paraburkholderia*, *Enterobacter*, *Cupriavidus*, *Pseudomonas*, *Dyadobacter*, *Acinetobacter*, *Microbacterium* e *Azospirillum*. Sendo que os gêneros *Bacillus* e *Rhizobium* apresentaram o maior número de isolados, 55 e 7 isolados, respectivamente (AMARAL *et al.*, 2022). Moraes (2021) ao estudar bactérias endofíticas e rizosféricas associadas com *Paspalum rojasii*, *P. leticulare* e *P. compressifolium* relatou isolados com melhores resultados para testes de promoção de crescimento vegetal pertencentes aos gêneros *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Serratia*.

Ao analisar o dendrograma (Figura 3.2), observa-se uma relação evolutiva próxima entre as bactérias dos gêneros *Enterobacter* e *Pantoea*, descritas por Fernandes e colaboradores (2023) com índice de solubilização de fósforo ISF>2, ou seja, os melhores

solubilizadores de fósforo isolados de *P. vaginatum*. Tal proximidade filogenética entre estes dois gêneros mostrada na análise é esperada quando se leva em conta o fato de ambos pertencerem à família Enterobacteriaceae. Apesar de estarem em diferentes posições dentro da filogenia da família, a capacidade de solubilização de fosfato observada para *Enterobacter* e *Pantoea* já é caracterizada na literatura (MA *et al.*, 2023; DAMO, PEDRO & SISON, 2024) e pode se dar pela conservação de vias de solubilização como a da Porroloquinolina Quinona (RAWAT, SHANKHDHAR & SHANKHDHAR, 2021). Isto pode estar relacionado com a presença desta via em um ancestral comum a estes gêneros que era possivelmente um bom solubilizador de fosfato. Assim, as medidas de alta solubilização de fosfato em *Enterobacter* e *Pantoea* evidenciadas pelo presente trabalho sugerem que essa capacidade pode ter um componente filogenético conservado. É importante destacar que há um isolado pertencente ao gênero *Enterobacter* (217) que não apresentou boa solubilização fosfato. Neste caso, há diversas possibilidades para explicar tal situação atípica para um gênero relacionado com a solubilização de fosfato, como mutações nos genes envolvidos nas vias de solubilização de fosfato ou alteração nos mecanismos de regulação gênica que controlam a expressão dessas vias. Outra possibilidade a ser considerada é a de que alterações sobre o DNA podem ter influenciado na expressão dos genes, causando plasticidade no fenótipo da solubilização. Por fim, deve-se considerar também a influência ambiental do isolamento sobre a expressão fenotípica da característica, com fatores locais influenciando na capacidade de solubilização de fosfato.



**Figura 3.2** Dendrograma da biodiversidade de bactérias endofíticas associadas à *Paspalum vaginatum*, com seqüências de comparação. Elaborado pelo autor.

### 3.2. Promoção de crescimento vegetal em *Paspalum vaginatum* e *Paspalum maritimum*

#### 3.2.1. Matéria seca da raiz e da parte aérea

Os valores das médias e erro padrão da matéria seca da parte aérea e da raiz de *Paspalum vaginatum* e de *Paspalum maritimum* dos tratamentos (Controle, Bac 160, Bac 161, Bac 179, Bac 185, Bac 198, BiomaPhos®, Biopasto®) são apresentados nas tabelas 3.1 e 3.2, respectivamente.

**Tabela 3.1** Matéria seca (g) da parte aérea e da raiz de *Paspalum vaginatum* por tratamento

Tratamento	Parte Aérea	Raiz
	M±EP	M±EP
Controle	4,92±0,34 <sup>a</sup>	1,84±0,34 <sup>a</sup>
Bac 160 ( <i>Pantoea</i> sp.)	4,99±0,34 <sup>a</sup>	2,87±0,34 <sup>a</sup>
Bac 161 ( <i>Enterobacter</i> sp.)	6,06±0,34 <sup>a</sup>	2,08±0,34 <sup>a</sup>
Bac 179 ( <i>Pantoea</i> sp.)	4,64±0,34 <sup>a</sup>	2,78±0,34 <sup>a</sup>
Bac 185 ( <i>Enterobacter</i> sp.)	5,39±0,34 <sup>a</sup>	2,64±0,34 <sup>a</sup>
Bac 198 ( <i>Pantoea</i> sp.)	4,56±0,29 <sup>a</sup>	1,81±0,29 <sup>a</sup>
BiomaPhos <sup>®</sup>	2,06±0,29 <sup>b</sup>	1,51±0,29 <sup>a</sup>
Biopasto <sup>®</sup>	2,98±0,29 <sup>b</sup>	1,84±0,29 <sup>a</sup>

M= Média; EP= Erro Padrão. Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade ( $p<0.05$ ) pelo teste de Tukey.

**Tabela 3.2** Matéria seca (g) da parte aérea e da raiz de *Paspalum maritimum* por tratamento

Tratamento	Parte aérea	Raiz
	M±EP	M±EP
Controle	3,56±0,27 <sup>ab</sup>	4,54±0,27 <sup>b</sup>
Bac 160 ( <i>Pantoea</i> sp.)	3,28±0,27 <sup>ab</sup>	5,88±0,27 <sup>a</sup>
Bac 161 ( <i>Enterobacter</i> sp.)	3,51±0,27 <sup>ab</sup>	4,55±0,27 <sup>b</sup>
Bac 179 ( <i>Pantoea</i> sp.)	3,18±0,27 <sup>ab</sup>	6,19±0,27 <sup>a</sup>
Bac 185 ( <i>Enterobacter</i> sp.)	3,93±0,27 <sup>a</sup>	4,87±0,27 <sup>ab</sup>
Bac 198 ( <i>Pantoea</i> sp.)	3,35±0,27 <sup>ab</sup>	5,22±0,27 <sup>ab</sup>
Biomaphos <sup>®</sup>	2,27±0,27 <sup>b</sup>	5,16±0,27 <sup>b</sup>
Biopasto <sup>®</sup>	2,50±0,27 <sup>b</sup>	4,52±0,27 <sup>b</sup>

M= Média; EP= Erro Padrão. Médias não seguidas de uma mesma letra diferem a 5% de probabilidade ( $p<0.05$ ) pelo teste de Tukey.

A análise estatística mostrou que, para a matéria seca da parte aérea de *Paspalum vaginatum*, os tratamentos com BiomaPhos® (2,06±0,29 g) e Biopasto® (2,98±0,29 g) diferiram significativamente dos demais tratamentos, apresentando valores mais baixos. No entanto, os demais tratamentos, incluindo o controle, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si, sugerindo que, apesar de algumas variações, o efeito da inoculação bacteriana sobre a matéria seca da parte aérea foi semelhante ao controle. Para a matéria seca das raízes, não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, indicando que o desenvolvimento radicular foi consistente entre os diferentes tratamentos testados. O solo é um ambiente complexo e tem uma grande capacidade de tamponar fatores bióticos, o que pode reduzir os impactos da introdução de novos organismos (MENDES & REIS-JÚNIOR, 2003).

O experimento com *Paspalum maritimum* revelou diferenças significativas na matéria seca das plantas sob diferentes tratamentos. As plantas inoculadas com BiomaPhos® e Biopasto® apresentaram valores de matéria seca, tanto da parte aérea quanto da raiz, significativamente menores do que o controle. Para os demais tratamentos, incluindo o controle, a matéria seca da parte aérea foi estatisticamente igual. Já para a matéria seca da raiz, duas linhagens bacterianas se destacaram e apresentaram valores estatisticamente maiores que o controle, ambas pertencentes ao gênero *Pantoea* sp. (Bac 161 e Bac 179).

O BiomaPhos é um inoculante solubilizador de fósforo composto por cepas de *Bacillus subtilis* e *B. megaterium*, foi desenvolvido para inoculação em milho e soja, mas tem sido testado em outras culturas (OLIVEIRA-PAIVA, 2021; OLIVEIRA, 2023; GANDRA, 2024). O primeiro relato de teste de BiomaPhos em *Paspalum* foi descrito por Lisboa (2024), que não identificou diferença estatística ao comparar a matéria seca da parte aérea e da raiz de sete tratamentos de *Paspalum vaginatum* (*Biomaphos* sp., *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Streptomyces* sp., *Dyella* sp., *Agrobacterium* sp. e controle).

Já o Biopasto é um inoculante para pastagens com braquiária, é composto por cepas de *Azospirillum brasilense* e *Pseudomonas fluorescens* (HUNGRIA, 2021). O presente experimento é o primeiro estudo conhecido sobre o uso de Biopasto em *Paspalum* e os

resultados sugerem que esse inoculante não é ideal para *Paspalum vaginatum*. No entanto, é necessário conduzir experimentos mais amplos, tanto com *Paspalum vaginatum* quanto com outras espécies de *Paspalum*, usando o Biopasto como inoculante, com o intuito de confirmar os efeitos do Biopasto no gênero *Paspalum*.

O uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal na agricultura é uma prática que pode reduzir a aplicação de fertilizantes químicos (GOVINDARAJAN *et al.*, 2007). Estas bactérias, através de diversos mecanismos como a fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de fitormônios, podem aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas (SHAH *et al.*, 2021). No presente estudo, as cinco linhagens selecionadas, pertencentes aos gêneros *Pantoea* sp. (isolados 160, 179 e 198) e *Enterobacter* sp. (161 e 185), demonstraram capacidade de realizar os três processos mencionados durante avaliações *in vitro*, destacando-se principalmente pelo elevado índice de solubilização de fosfato (FERNANDES *et al.*, 2023).

Um estudo desenvolvido por Liu e colaboradores (2021), descreveu uma linhagem endofítica de *Bacillus pumilus* e uma linhagem endofítica de *Lysinibacillus macrolides* isolados de *Paspalum vaginatum* que quando inoculados em azevém e arroz foram capazes de aumentar a produção de matéria seca da raiz e da parte aérea das plantas. De Moraes (2021), ao estudar bactérias isoladas de *Paspalum lenticulare* identificou uma cepa de *Enterobacter* que ao ser inoculada em *Paspalum notatum* foi capaz de aumentar a matéria seca da raiz, mas não da parte aérea da planta. Prasad e colaboradores (2022), identificou duas linhagens endofíticas pertencentes ao gênero *Pantoea* sp. de *Hedychium coronarium* L. que promoveram aumento da matéria seca da raiz e da parte aérea de trigo.

Produtos comerciais que utilizam bactérias do gênero *Pantoea* em sua composição estão disponíveis no mercado e são empregados na promoção do crescimento de diversas espécies vegetais. Um exemplo é o inoculante Sprinter®, desenvolvido pela bionat soluções biológicas em colaboração com a ESALQ-USP, que utiliza a cepa *Pantoea agglomerans* ESALQ 33.1. De acordo com a empresa, esse inoculante atua na promoção do crescimento das plantas, solubilização de nutrientes e aumento da tolerância a estresses

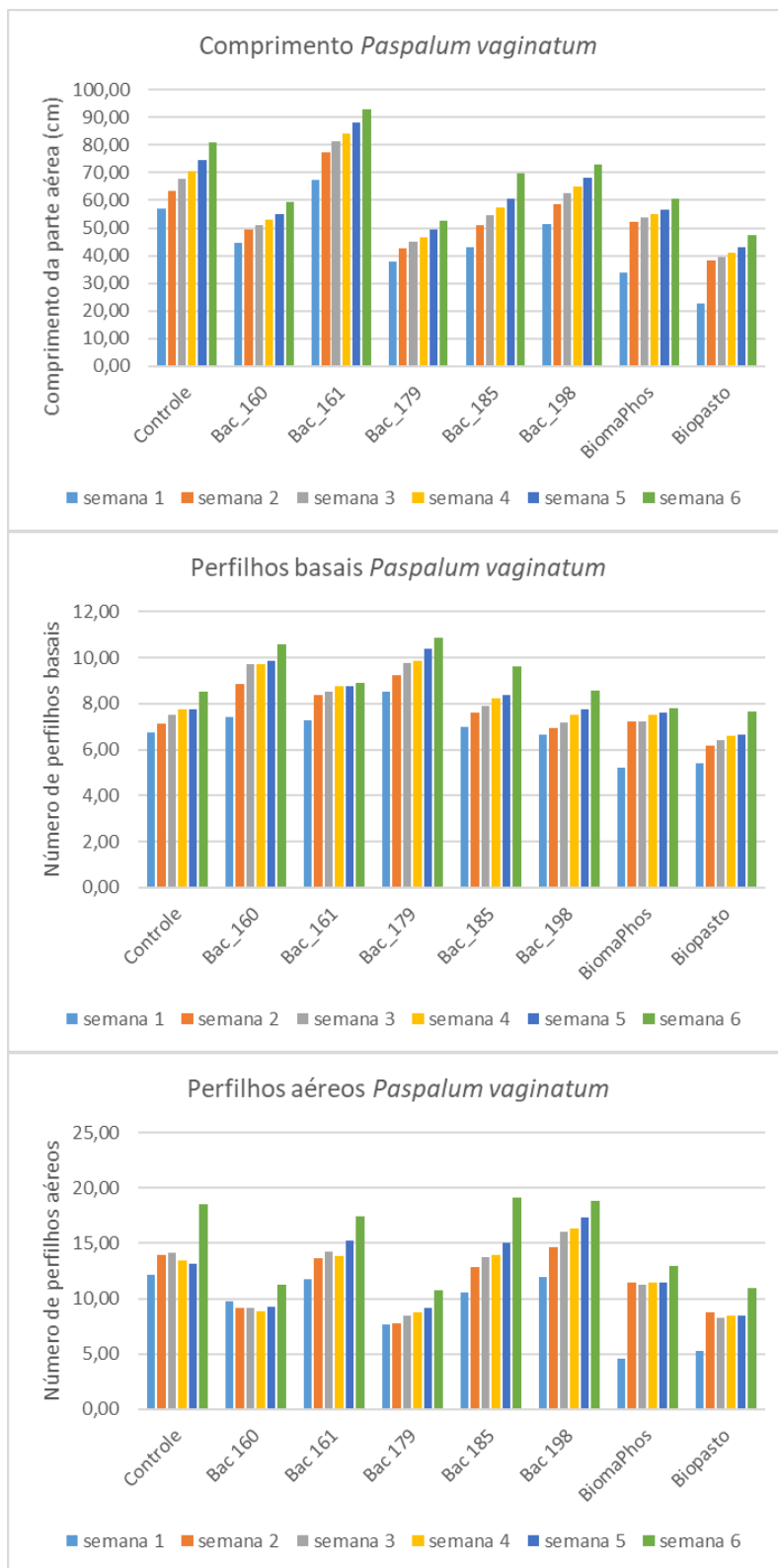
(SPRINTER, 2025). Outros produtos desenvolvidos com o gênero *Pantoea* é o Biopron® e o Bulhnova®, inoculantes da empresa Probelte by Agronova Biotech compostos por *Azospirillum brasilense* cepa M3 (CECT 5802) e *Pantoea dispersa* cepa C3 (CECT 5801). De acordo com a empresa, esses inoculantes atuam na fixação biológica de nitrogênio e solubilização de nutrientes como o fósforo e potássio (BIOPRON, 2025 e BULHNOVA, 2025).

### **3.2.2. Comprimento da planta, número de perfilhos basal e aéreo**

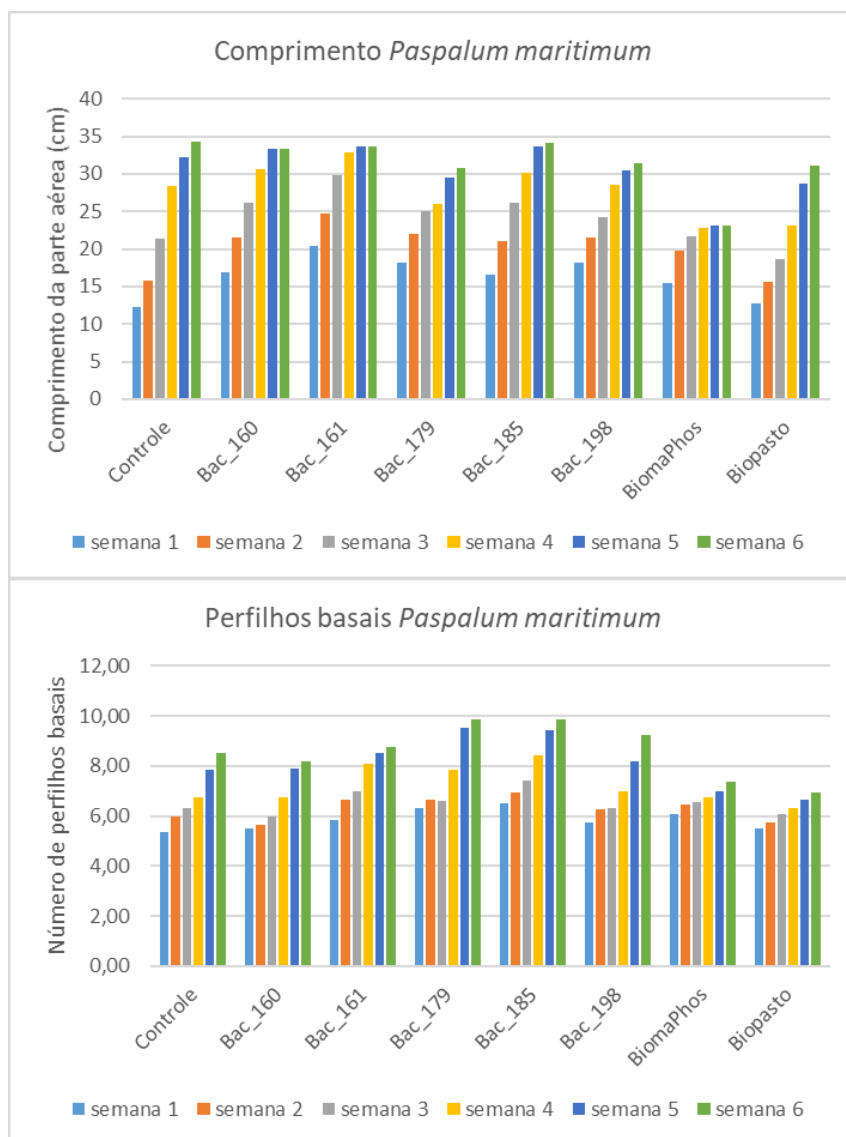
Os resultados dos descritores comprimento, número de perfilhos basais e número de perfilhos aéreos para *Paspalum vaginatum* são mostrados no Apêndice B e apresentados graficamente na Figura 3.3. Os resultados dos descritores comprimento e número de perfilhos basais para *Paspalum maritimum* são mostrados no Apêndice C e apresentados graficamente na Figura 3.4.

Para o *Paspalum maritimum*, os descritores comprimento e número de perfilhos basais não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos testados.

Para o *Paspalum vaginatum*, o Biopasto começou a apresentar diferença significativa em relação à Bac 160 na segunda semana e continuou até a sexta semana, os outros tratamentos não apresentaram diferença estatística entre si. Em relação ao número de perfilhos basais, BiomaPhos e Biopasto apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação à Bac 179 na primeira semana, a partir da segunda semana todos os tratamentos foram estatisticamente iguais. Para o número de perfilhos aéreos, o Biopasto apresentou diferença significativa em relação à Bac 198 e ao controle entre a segunda e a sexta semana, em relação à Bac 161 entre a terceira e quinta semana e em relação à Bac 185 entre a quarta e quinta, os outros tratamentos não apresentaram diferença estatística entre si.



**Figura 3.3** Resultado gráfico do comprimento da parte aérea, número de perfilhos basais e número de perfilhos aéreos para os tratamentos em *P. vaginatum* ao longo das semanas.



**Figura 3.4** Resultado gráfico do comprimento da parte aérea e número de perfilhos basais para os tratamentos em *P. maritimum* ao longo das semanas.

Bactérias promotoras de crescimento, ao serem inoculadas nas plantas, podem resultar em comportamentos distintos daqueles observados em condições laboratoriais controladas. Esta discrepância pode ser atribuída a uma série de fatores. A planta hospedeira, por exemplo, pode modular significativamente a atividade bacteriana (TEIXEIRA *et al.*, 2019).

Um estudo desenvolvido por Liu e colaboradores (2021), descreveu uma linhagem endofítica de *Bacillus pumilus* e uma linhagem endofítica de *Lysinibacillus macrolides* isolados de *Paspalum vaginatum* que quando inoculados em azevém e arroz foram

capazes de aumentar o comprimento da parte aérea e da raiz das plantas. Kumar & Dubey (2022) identificaram uma cepa de *Enterobacter roggenkampii* isolada de *Barleria lupulina* capaz de aumentar significativamente o comprimento da parte aérea quando reinoculada. Suman e Colaboradores (2020), ao estudar oito linhagens bacterianas pertencentes ao gênero *Pantoea* sp. (*P. aglomerans*, *P. eucalypti*, *Pantoea* sp., *P. ananatis*, *P dispersa*, *P cyperipedi*, *P. dispersa*, *Pantoea* sp.) identificou que estas promoveram o crescimento da parte aérea em milho, arroz e trigo.

Amaral e colaboradores (2022) descreveram uma linhagem de *Bacillus* sp. rizosférica isolada de *Paspalum* sp. capaz de aumentar o número de perfilhos basais em *P. regnelli* e em *P. atratum* cv. Pojuca, mas não em *P. malacophyllum*. Também foram descritas uma linhagem de *Rhizobium* sp. e uma de *Acinetobacter* sp. que não promoveram o aumento de perfilhos em nenhuma das espécies de *Paspalum* citadas. Ao estudar linhagens de *Azospirillum brasiliense*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pantoea ananatis*, Duarte e colaboradores (2020) identificaram uma linhagem de *Pseudomonas fluorescens* e uma de *Pantoea ananatis* que ao serem inoculadas em *Urochloa brizantha* cv. BRS Paiaguás e *Urochloa brizantha* cv. Xaraés foram capazes de aumentar significativamente o número de perfilhos basais.

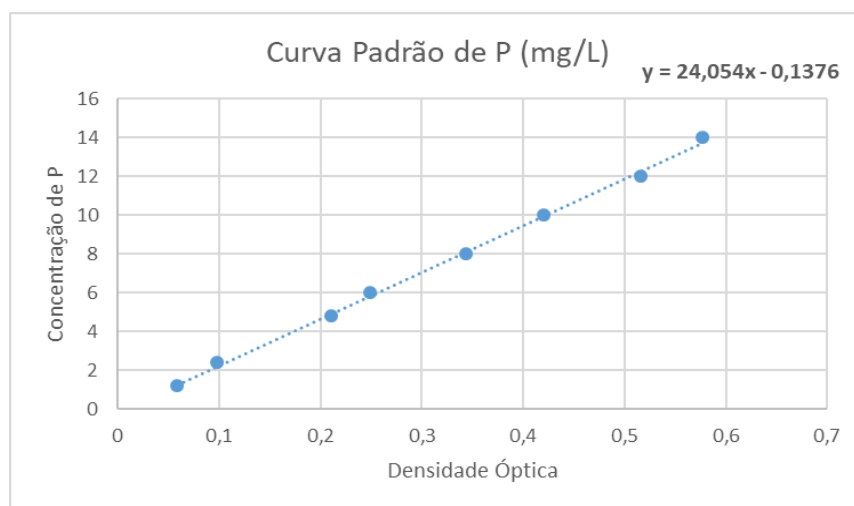
Os perfilhos constituem unidades básicas de crescimento em gramíneas forrageiras, representando um importante fator para a produção de forragem visto que indica vigor e persistência da gramínea (FIALHO *et al.*, 2012; HODGSON, 1990). Originados de gemas basais, próximas ao solo, ou de gemas axilares nas folhas, esses perfilhos se dividem em dois tipos principais: basais e aéreos (DE SOUZA ALMEIDA *et al.*, 2017; PEDREIRA *et al.*, 2001). Os perfilhos aéreos se destacam por serem mais tenros, com maior proporção de folhas em relação ao colmo e mais nutritivos quando comparados aos perfilhos basais. Já os perfilhos basais apresentam maior capacidade de rebrota, devido à conexão direta com o sistema radicular, o que facilita a absorção de nutrientes do solo (DE MORAES *et al.*, 2018; DA SILVA *et al.*, 2017; PACIULLO *et al.*, 2008).

Ademais, as folhas de *Paspalum maritimum* de todos os tratamentos apresentaram coloração roxa, sintoma característico de deficiência de fósforo. Os

principais fatores para deficiência de fósforo incluem seca, baixa temperatura, elevada quantidade de alumínio no solo, compactação do solo (diminuição de O<sub>2</sub>), teor naturalmente reduzido no solo (LIMA FILHO, 2020). Ademais, não foi adicionada nenhuma fonte de fósforo solúvel ou insolúvel durante o experimento. Portanto, é possível que a quantidade de fósforo no solo utilizado no experimento é reduzida mesmo com as bactérias com potencial de solubilização, o fósforo presente naturalmente no solo pode não ter sido suficiente para suprir o crescimento das plantas.

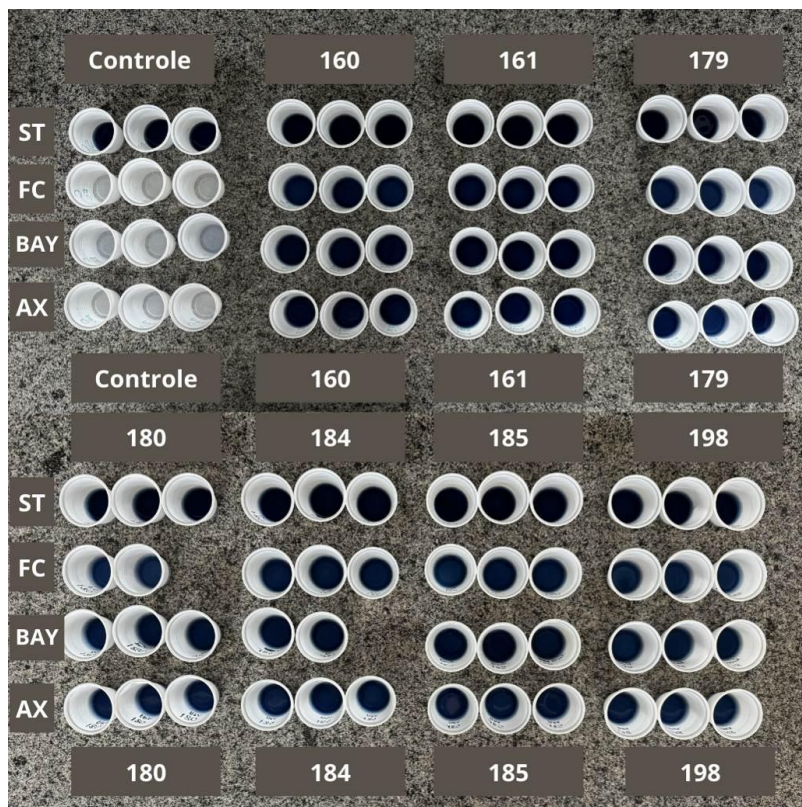
### 3.1. Solubilização de rochas fosfatadas *in vitro*

A curva padrão utilizada no cálculo da quantificação do fósforo solúvel, obtida a partir de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) em oito concentrações, bem como sua respectiva equação, está ilustrada na Figura 3.5. Para a obtenção da curva padrão, foi empregado o método colorimétrico azul de molibdênio.



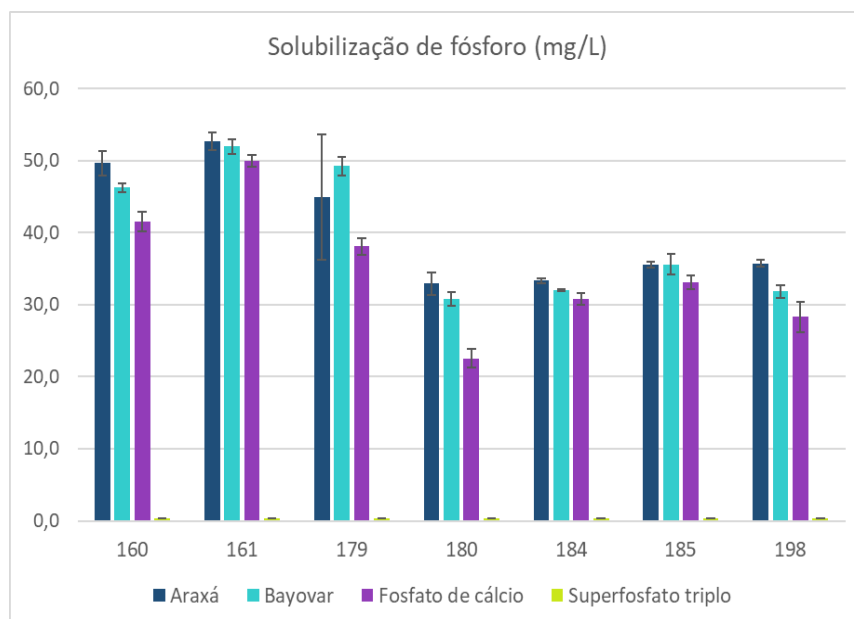
**Figura 3.5** Curva padrão para quantificação de fósforo solúvel. Desenvolvido pelo autor.

Neste estudo de solubilização de fósforo *in vitro*, foram avaliadas quatro fontes de fósforo: rocha fosfatada Araxá (AX), rocha fosfatada Bayovar (BAY), fosfato de cálcio (FC) e superfosfato triplo (ST). Sete isolados pertencentes a dois gêneros bacterianos foram testados: *Enterobacter* sp. (161, 184, 185) e *Pantoea* sp. (160, 179, 180, 198) (Figura 3.6).



**Figura 3.6** Copos descartáveis contendo o mix de Murphy & Riley, água e o filtrado do sobrenadante do controle e das inoculações 160, 161, 179, 180, 184, 185, 198 em diferentes fontes de fósforo (rochas Araxá e Bayovar, fosfato de cálcio e superfosfato triplo). Registrado pelo autor.

Os resultados mostraram que o isolado 161 (*Enterobacter* sp.) apresentou a maior capacidade de solubilização em AX, BAY e FC. As quantidades de fósforo solubilizado foram de 52,6 mg/L para rocha fosfatada Araxá (Brasil), 51,9 mg/L para rocha fosfatada Bayovar (Peru) e 50,0 mg/L para fosfato de cálcio. Por outro lado, o isolado 180 (*Pantoea* sp.) demonstrou menor eficiência na solubilização das mesmas fontes, com valores de 32,9 mg/L, 30,8 mg/L e 22,5 mg/L, respectivamente (Figura 3.7).



**Figura 3.7** Quantificação de fósforo solubilizado por isolados bacteriano endofíticos de acordo com quatro fontes de fósforo (rochas Araxá e Bayovar, fosfato de cálcio e superfosfato triplo). Elaborado pelo autor.

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 no controle que, quando subtraída dos tratamentos conforme descrito na metodologia do experimento, mostrou pouca ou nula diferença.

Gomes e colaboradores (2014), ao estudar bactérias isoladas de milho com potencial para solubilização de fosfato, identificaram duas bactérias do gênero *Pantoea* responsáveis pela solubilização de 71,2 e 30,2 mg/L de fósforo a partir da rocha Araxá. Silva e colaboradores (2021), ao analisar 101 bactérias isoladas de milho solubilizadoras de fosfato, identificaram que o grupo de isolados que melhor solubilizou a rocha fosfatada Araxá pertence aos gêneros *Serratia*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Raoutella*, *Microbacterium* e *Acinetobacter* apresentaram solubilização média de 189 mg/L. Ademais, Silva e colaboradores também identificaram um grupo de bactérias que incluíram os gêneros *Pantoea* e *Enterobacter* que apresentaram solubilização média de 56,7 mg/L de fósforo a partir da rocha fosfatada Araxá.

Silva e colaboradores (2020), ao isolar bactérias endofíticas de aloe vera identificou cepas de *Enterobacter* capazes de solubilizar fósforo a partir da rocha fosfatada Bayovar, as quantidades variaram de 5,7 até 16,9 mg/L. Ademais, também foi identificada uma

cepa de *Pantoea* capaz de solubilizar 7mg/L de fósforo. No entanto, Silva e colaboradores (2020) mantiveram o experimento por apenas 72 h, diferente do atual trabalho que manteve o experimento por 10 dias. Lisboa (2024), ao estudar bactérias rizosféricas associadas à mesma espécie vegetal do presente estudo (*P. vaginatum*), identificou cepas de *Burkholderia* sp., *Streptomyces* sp., *Dyella* sp., *Rhizobium* sp. e *Acinetobacter* capazes de solubilizar rocha fosfatada Araxá (45,8 mg/L, 25,7 mg/L, 4,4 mg/L, 5,5 mg/L e 26,2 mg/L, respectivamente) e também a rocha fosfatada Bayovar (49,1 mg/L, 44,6 mg/L, 1,1 mg/L, 0,7 mg/L e 26,2 mg/L, respectivamente).

Os gêneros *Pantoea* e *Enterobacter* pertencem à família Enterobacteriaceae. Tal família pode ser encontrada em diversos ambientes como solos, em tecidos vegetais, água e amostras clínicas (PODSCHUN *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2023; LISBOA, 2024). Integrantes deste grupo taxonômico são relatados como solubilizadores de fosfato inorgânico e/ou por sua adaptados a ecossistemas com escassez de fósforo biodisponível (SILVA *et al.*, 2017).

Nos experimentos realizados por Gomes e colaboradores (2014) e Silva e colaboradores (2021), observou-se que determinadas cepas bacterianas demonstraram capacidade de solubilização de fósforo tanto em condições laboratoriais quanto experimentos em plantas, contribuindo para o crescimento vegetal. A utilização apenas de fosfato de cálcio como fonte de fósforo para identificar bactérias solubilizadoras se mostra limitado, pois pode levar à seleção de microrganismos que, apesar de eficientes *in vitro*, não apresentam o mesmo desempenho *in vivo*. Por isso, o aprimoramento de métodos de avaliação *in vitro*, utilizando uma maior variedade fontes de fósforo e as características do solo onde as bactérias serão aplicadas, pode proporcionar uma seleção mais criteriosa de potenciais inoculantes.

### **3.2. Experimento de solubilização de fósforo *in planta* em *P. maritimum***

O presente experimento avaliou a influência de três isolados bacterianos endofíticos (160, 161 e 179) e da ausência de microrganismos, de três fontes de fósforo

(duas fontes pouco solúveis e uma fonte solúvel) e da ausência de fonte de fósforo na produção de matéria seca da parte aérea e da raiz de *Paspalum maritimum* (Figura 3.8).



**Figura 3.8** Efeito da inoculação bacteriana (Bac 160, 161, 179 e controle) e das fontes de fósforo (sem fósforo, Araxá, Bayovar, e superfosfato triplo) no *Paspalum maritimum*. Registrado pelo autor.

O fósforo (P) é um dos macronutrientes mais importantes para as plantas e apresenta funções essenciais no metabolismo celular. O P compõe o DNA, RNA e os fosfolipídios da membrana plasmática na forma de ésteres de fosfato. Além de ser um dos constituintes do ATP (adenosina trifosfato), ADP (adenosina difosfato), AMP (adenosina monofosfato) e pirofosfato (PPi), que são componentes importantes do metabolismo

energético, o P também compõe açúcares envolvidos na fotossíntese, na respiração e outros processos metabólicos. No geral, o fósforo promove o crescimento rápido das plantas, estimula o florescimento e favorece o desenvolvimento das raízes (HATLA & LAL, 2023; TAIZ, *et al.*, 2017).

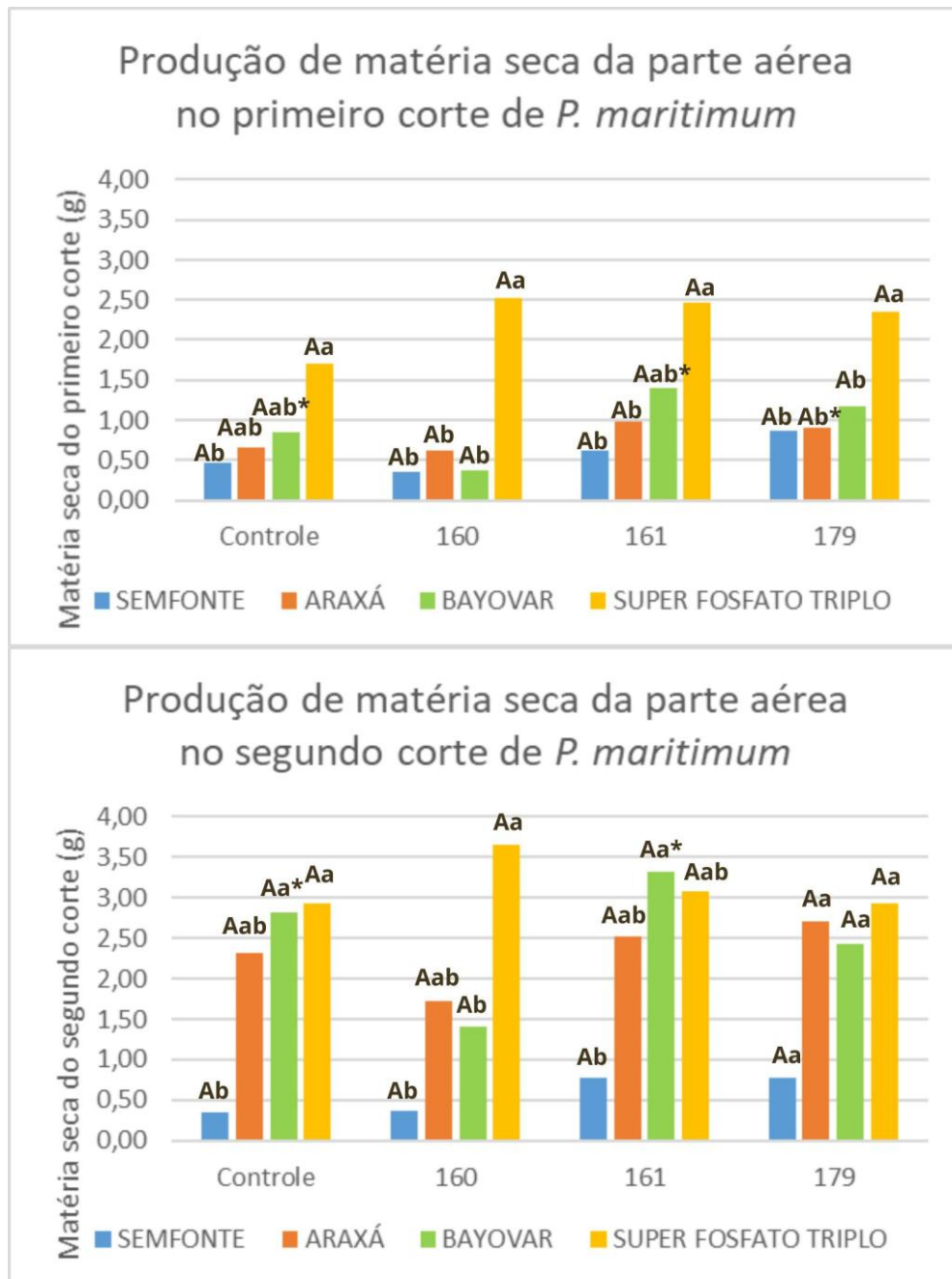
Ao comparar as médias da matéria seca da parte aérea do primeiro e do segundo corte (Tabela 3.3 e Figura 3.9), os tratamentos com Bayovar + controle, Bayovar + Bac 161 e Araxá + Bac 179 apresentaram diferença significativa, sendo a matéria seca do segundo maior que o primeiro corte. Isso pode ser explicado pelo tempo que as bactérias endofíticas precisam para se estabelecer e começar a atuar na solubilização do fósforo, por meio da produção de ácidos orgânicos e enzimas, o que aumenta a disponibilidade do nutriente no solo e, com isso, favorece a produção de matéria seca no segundo corte.

**Tabela 3.3** Produção matéria seca da parte aérea (g) para o primeiro e segundo corte.

<b>Corte 1</b>										
<b>Inóculo</b>	<b>Fonte de fósforo</b>				<b>Média</b>	<b>EP</b>				
	<b>Sem fonte</b>	<b>Araxá</b>	<b>Bayovar</b>	<b>SFT</b>						
Controle	0,48	Ab	0,65	Aab	0,85	Aab*	1,70	Aa	0,92	0,10
Bac 160	0,35	Ab	0,63	Ab	0,38	Ab	2,53	Aa	0,97	0,10
Bac 161	0,63	Ab	0,98	Ab	1,40	Aab*	2,48	Aa	1,37	0,10
Bac 179	0,88	Ab	0,90	Ab*	1,18	Ab	2,35	Aa	1,33	0,10
<b>Média</b>	0,58		0,79		0,95		2,26			
<b>EP</b>	0,10		0,10		0,10		0,10			
<b>Corte 2</b>										
<b>Inóculo</b>	<b>Fonte de fósforo</b>				<b>Média</b>	<b>EP</b>				
	<b>Sem fonte</b>	<b>Araxá</b>	<b>Bayovar</b>	<b>SFT</b>						
Controle	0,35	Ab	2,33	Aab	2,83	Aa*	2,93	Aa	2,11	0,21
Bac 160	0,38	Ab	1,73	Aab	1,40	Ab	3,65	Aa	1,79	0,21
Bac 161	0,78	Ab	2,53	Aab	3,33	Aa*	3,08	Aab	2,43	0,21
Bac 179	0,78	Aa	2,70	Aa*	2,43	Aa	2,93	Aa	2,21	0,21
<b>Média</b>	0,57		2,32		2,49		3,14			
<b>EP</b>	0,21		0,21		0,21		0,21			

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

**SFT**: superfosfato triplo; **EP**: erro padrão; **Letras minúsculas**: comparam as fontes de fósforo para um mesmo tratamento bacteriano (comparação horizontal); **Letras maiúsculas**: comparam as diferentes inoculações bacterianas para o mesmo tratamento de fósforo (comparação vertical); \* indica diferença significativa entre o primeiro e segundo corte para o mesmo tratamento.



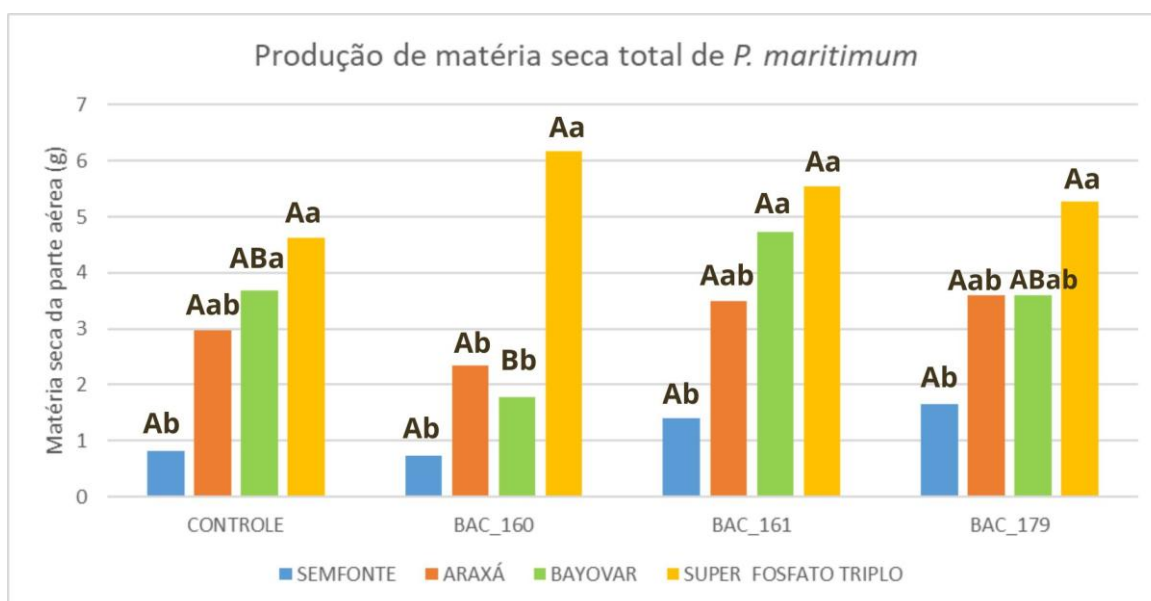
**Figura 3.9** Produção matéria seca da parte aérea (g) para o primeiro e segundo corte. **Letras minúsculas:** comparam as fontes de fósforo para um mesmo tratamento bacteriano; **Letras maiúsculas:** comparam as diferentes inoculações bacterianas para o mesmo tratamento de fósforo; \* indica diferença significativa entre o primeiro e segundo corte para o mesmo tratamento. Desenvolvido pelo autor.

Ao analisar a matéria seca do primeiro e do segundo corte separadamente, no geral as plantas tratadas com o superfosfato triplo (SFT) apresentaram diferença

significativa com as plantas sem fonte de fósforo, exceto pelos tratamentos inoculados com a Bac 179 e Bac 161 no segundo corte. As plantas tratadas com a rocha fosfatada Araxá, no primeiro corte, tiveram resultados semelhantes às plantas sem fonte de fósforo. Já no segundo corte apresentaram-se igual às médias das plantas inoculadas tanto com STF quanto aquelas sem fonte de fósforo.

No primeiro corte, as médias as plantas tratadas com a rocha fosfatada Bayovar apresentaram-se igual às médias das plantas sem fonte de fósforo para os inóculos 160 e 179, já para o controle e para o inóculo 161 as médias das plantas se igualaram tanto com as plantas sem fonte de fósforo quanto com as plantas inoculadas com super triplo. As médias das plantas inoculadas com a rocha fosfatada Bayovar no segundo corte apresentaram-se igual às médias das plantas inoculadas com STF, exceto para a Bac 160.

Ao analisar a produção total de matéria seca (Figura 3.10 e Tabela 3.4), ainda observa-se o padrão em que as plantas inoculadas com o superfosfato triplo apresentaram diferença significativa com as plantas inoculadas sem fonte de fósforo, independente do tratamento bacteriano.



**Figura 3.10** Produção de matéria seca total da parte aérea de *Paspalum maritimum*. **Letras minúsculas:** comparam as fontes de fósforo para um mesmo tratamento bacteriano; **Letras maiúsculas:** comparam as diferentes inoculações bacterianas para o mesmo tratamento de fósforo. Desenvolvido pelo autor.

**Tabela 3.4** Produção matéria seca da parte aérea (g) total.

Inóculo	Fonte de fósforo				Média	EP				
	Sem fonte	Araxá	Bayovar	SFT						
Controle	0,83	Ab	2,98	Aab	3,68	ABa	4,63	Aa	3,03	0,25
Bac 160	0,73	Ab	2,35	Ab	1,78	Bb	6,18	Aa	2,76	0,25
Bac 161	1,40	Ab	3,50	Aab	4,73	Aa	5,55	Aa	3,79	0,25
Bac 179	1,65	Ab	3,60	Aab	3,6	ABab	5,28	Aa	3,53	0,25
<b>Média</b>	1,15		3,11		3,44		5,41			
<b>EP</b>	0,25		0,25		0,25		0,25			

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

**SFT**: superfosfato triplo; **EP**: erro padrão; **Letras minúsculas**: comparam as fontes de fósforo para um mesmo tratamento bacteriano (comparação horizontal); **Letras maiúsculas**: comparam as diferentes inoculações bacterianas para o mesmo tratamento de fósforo (comparação vertical).

As plantas inoculadas com as bactérias 161 e 179 e que tiveram a rocha Araxá e a rocha Bayovar como fonte de fósforo, foram estatisticamente iguais às plantas que tiveram o SFT (fósforo solúvel) como fonte de fósforo e as mesmas inoculações bacterianas. Com destaque para a bactéria 161 em que as plantas inoculadas com esta cepa também foram estatisticamente distintas às plantas sem fonte de fósforo. As médias de matéria seca dos tratamentos Bac 161 + Bayovar e Controle + SFT foram muito próximas, com uma variação de apenas 0,1 g. Além disso, quando comparamos os tratamentos Bac 161 + SFT e Controle + SFT, a variação é de 0,92g que representa 20% a mais de massa seca quando inoculada a Bac 161. Isso indica que a Bac 161 pode ser um isolado promissor para utilização em sistemas que empregam fontes de fósforo de baixa solubilidade.

Já o isolado 160, quando inoculado em plantas com as fontes insolúveis Araxá e Bayovar, não apresentou bom rendimento, sendo estatisticamente inferior às plantas inoculadas com SFT. Quando o isolado 160 foi combinado com uma fonte solúvel como o SFT, notou-se uma variação de 1,55 g com relação ao tratamento controle + SFT, representando cerca de 33% de incremento, embora essa diferença não tenha alcançado significância estatística nas condições testadas. Este aumento numérico, apesar de não significativo, sugere que o isolado 160 pode ter capacidade de potencializar o efeito do

SFT, contudo, para validar esta observação, é necessário realizar novos experimentos com maior número de repetições e em vasos maiores, possibilitando uma melhor análise do efeito da bactéria. Os dados obtidos até o momento apontam o isolado 160 como uma possível alternativa interessante para sistemas agrícolas convencionais que empregam fontes solúveis de fósforo, justificando estudos mais detalhados sobre esta interação.

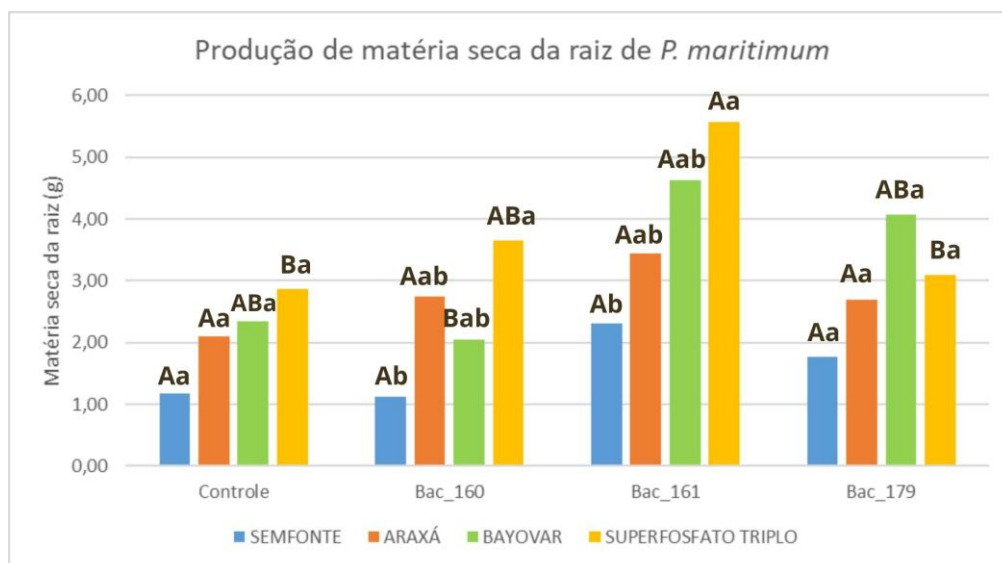
Ao avaliar a produção de matéria seca da raiz (Tabela 3.5 e Figura 3.11), observou-se que o inóculo 179 e o grupo controle não apresentaram variações significativas entre as diferentes fontes de fósforo testadas, conforme indicado pela análise estatística. Por outro lado, o tratamento que combinou o isolado 161 com a fonte de fósforo Bayovar (4,63 g) exibiu um a produção de matéria seca da raiz similar ao do tratamento com o mesmo isolado 161, mas utilizando SFT (5,58 g). Nota-se também que a combinação do isolado 161 com SFT (5,58 g) resultou em um aumento estatisticamente superior na produção de matéria seca da raiz em comparação com o controle + SFT (2,88g). Esse resultado sugere que, para o isolado 161, a fonte Bayovar pode representar uma alternativa interessante ao SFT. O aumento da massa seca do tratamento Bac 161 + SFT quando comparado com o Controle + SFT representa um aumento de 93%. Já o tratamento 161 + Bayovar quando comparado com o Controle + SFT representa um aumento de 61%.

**Tabela 3.5** Produção matéria seca da raiz (g).

Inóculo	Fonte de fósforo				Média	EP
	Sem fonte	Araxá	Bayovar	SFT		
Controle	1,18 Aa	2,10 Aa	2,35 ABa	2,88 Ba	2,13	0,24
Bac 160	1,13 Ab	2,75 Aab	2,05 Bab	3,65 ABa	2,39	0,24
Bac 161	2,30 Ab	3,45 Aab	4,63 Aab	5,58 Aa	3,99	0,24
Bac 179	1,78 Aa	2,70 Aa	4,08 ABa	3,10 Ba	2,91	0,24
<b>Média</b>	1,59	2,75	3,28	3,80		
<b>EP</b>	0,24	0,24	0,24	0,24		

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

**SFT:** superfosfato triplo; **EP:** erro padrão; **Letras minúsculas:** comparam as fontes de fósforo para um mesmo tratamento bacteriano (comparação horizontal); **Letras maiúsculas:** comparam as diferentes inoculações bacterianas para o mesmo tratamento de fósforo (comparação vertical).



**Figura 3.11** Produção de matéria seca da raiz de *Paspalum maritimum*. **Letras minúsculas:** comparam as fontes de fósforo para um mesmo tratamento bacteriano; **Letras maiúsculas:** comparam as diferentes inoculações bacterianas para o mesmo tratamento de fósforo. Desenvolvido pelo autor.

Ademais, ao final do experimento, as folhas de *Paspalum maritimum* de todos os tratamentos apresentaram coloração roxa, sintoma característico de deficiência de fósforo. Esse sintoma pode sugerir que as plantas consumiram o fósforo adicionado no início do experimento em tratamentos que as plantas cresceram mais ou que a bactéria não conseguiu suprir a demanda de fósforo da planta em tratamentos que as plantas cresceram menos. Para confirmar essa hipótese, seria interessante realizar análises do solo ao final do experimento, para determinar a quantidade de fósforo disponível e também análises foliares para quantificar o fósforo nas plantas.

A variação na solubilização de fósforo observada em experimentos *in vivo* provavelmente se deve à maior complexidade de fatores presentes na rizosfera, que envolve interações nutricionais e ambientais mais dinâmicas do que aquelas encontradas em condições controladas de cultivo (DE ALMEIDA LEITE *et al.*, 2024). Marra *et al.* (2019) demonstraram, por exemplo, que a solubilização de fosfato está relacionada ao tipo de fonte de carbono disponível, entre outros fatores. Já Silva *et al.* (2017) mostrou que a comunidade microbiana da rizosfera pode ser alterada a partir da fonte de fósforo utilizada no solo.

Silva e colaboradores (2021), ao estudar o efeito de bactérias solubilizadoras de fósforo em *Pennisetum glaucum* utilizando rocha fosfatada comercial de origem sedimentar, assim como o Bayovar, identificou dois isolados capazes de aumentar a massa seca da parte aérea, *Bacillus megaterium* e *Ochrobactrum grignonense*, sendo que o primeiro também aumentou a matéria seca da raiz da planta. No mesmo estudo, também foi utilizado o superfosfato triplo como fonte solúvel de fósforo em associação com os isolados bacterianos; entretanto, observaram que nenhum dos isolados foi capaz de potencializar o efeito dessa fonte de fósforo.

Lisboa (2024), ao estudar bactérias isoladas de *P. vaginatum* posteriormente inoculadas em *P. regnelli* com fontes de fósforo rocha fosfatada Araxá e Bayovar e superfosfato triplo, identificou um isolado pertencente ao gênero *Acinetobacter* sp. que não foi adequado para solubilização do fósforo presente nas rochas, mas foi capaz de potencializar o efeito do SFT aumentando a matéria seca tanto da parte aérea como da raiz das plantas.

Em estudo desenvolvido por de Almeida Leite e colaboradores (2024), identificou isolados pertencentes às espécies *Enterobacter bugandensis*, *Paenibacillus peoriae* capazes de solubilizar fosfato Bayovar e aumentar a massa seca da raiz e da parte aérea do milho quando comparado com o controle que foi tratado apenas com a rocha fosfatada Bayovar. No entanto, as cepas não foram capazes de igualar a produção de matéria seca com as plantas do tratamento que foi utilizado a fonte de fosforo solúvel (fosfato monoamônico), isso pode ter correlação com o tempo de experimento que foi de apenas 60 dias.

No estudo de Lozada e colaboradores (2024), isolados bacterianos testados para solubilização da rocha fosfatada Araxá em milho não apresentaram diferença significativa com o controle tratado apenas com a fonte de fósforo. Já no trabalho realizado por Ferreira e colaboradores (2023), ao coinocular uma cepa de *Bacillus megaterium* com *Bacillus subtilis* em milho, a matéria seca da parte aérea e da raiz se aproximou dos resultados obtidos a partir das plantas tratadas com superfosfato simples, uma fonte de fósforo solúvel.

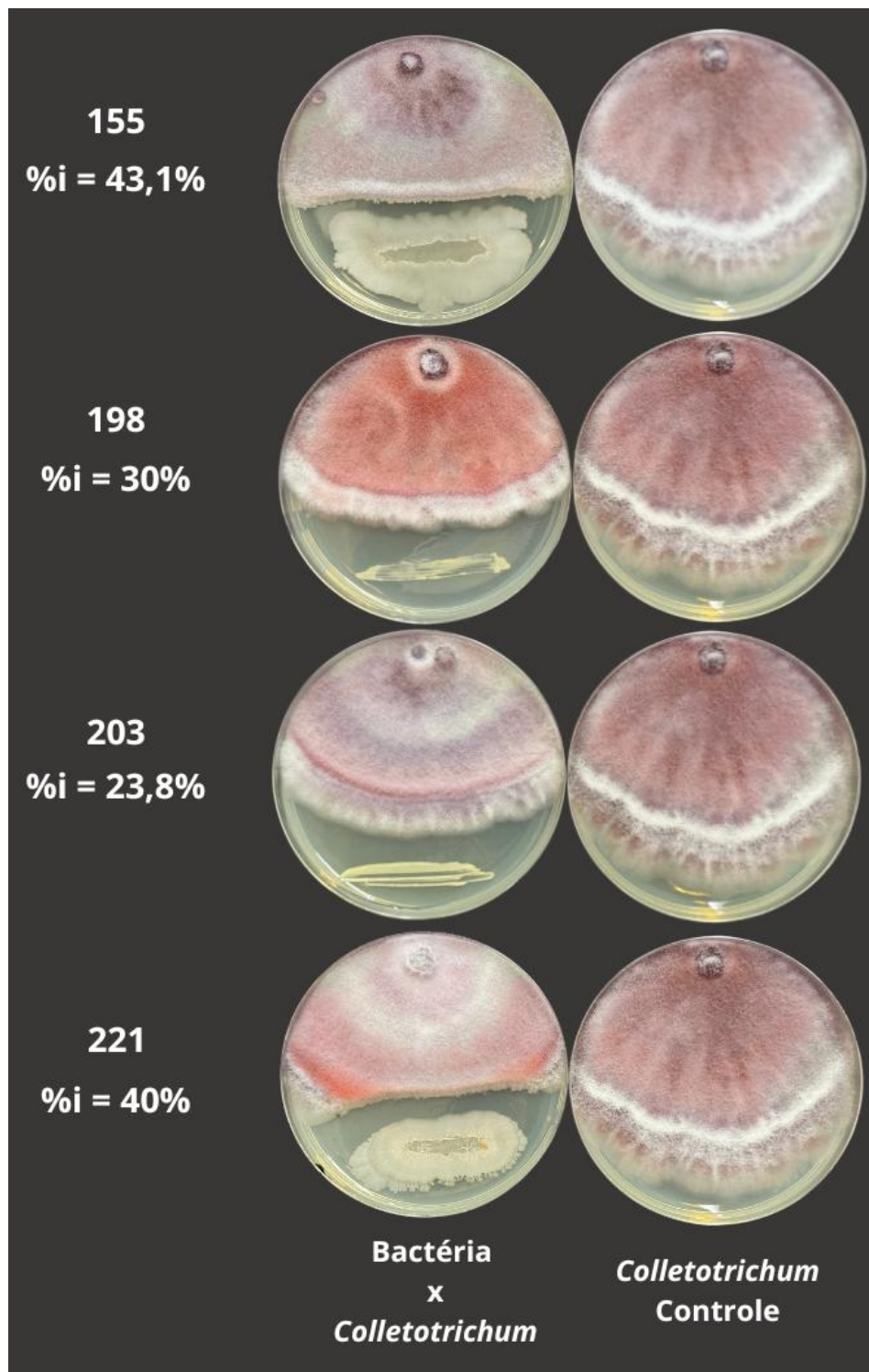
Devido à baixa solubilidade das rochas fosfáticas, é importante que as plantas desenvolvam um sistema radicular robusto e eficiente ou que o solo conte com a ação de microrganismos solubilizadores de fósforo (ELHAISSOUFI *et al.*, 2022). Dessa forma, a aplicação de rochas fosfáticas, bactérias solubilizadoras de fósforo e fontes de fósforo de maior solubilidade pode constituir uma estratégia eficiente para promover o desenvolvimento de plantas.

### 3.3. Antagonismo ao fitopatógeno *Colletotrichum* sp.

Dentre os 70 isolados avaliados contra o fitopatógeno *Colletotrichum* sp., 13 isolados apresentaram atividade antagônica, tais isolados foram selecionados para a etapa de pareamento direto (Figura 3.12). A porcentagem de inibição micelial variou de 12,9 a 43,1%, conforme a Tabela 3.6. Os isolados com atividade antagônica pertencem aos gêneros bacterianos *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp. e *Staphylococcus* sp..

**Tabela 3.6** Porcentagem de inibição de crescimento micelial de *Colletotrichum* sp. pelos isolados endofíticos

Gênero	Isolados e número de acesso ao GenBank	Porcentagem de inibição (%i)
<i>Bacillus</i> sp.	155 (PQ187714)	43,1
	221 (PQ187769)	40,0
	226 (PQ187774)	40,0
	205 (PQ187756)	40,0
	187 (PQ187739)	38,1
	208 (PQ187758)	37,5
	232 (PQ187779)	37,5
	230 (PQ187777)	21,9
	156 (PQ187715)	16,3
<i>Pantoea</i> sp.	198 (PQ187750)	30
<i>Enterobacter</i> sp.	216 (PQ187764)	27,5
	184 (PQ187736)	12,9
<i>Staphylococcus</i> sp.	203 (PQ187754)	23,8



**Figura 3.12** Exemplos de resultados dos ensaios de antagonismo *in vitro* entre o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. e bactérias endofíticas isoladas de *Paspalum vaginatum*. Registrado pelo autor.

Os fungos pertencentes ao gênero *Colletotrichum* representam importantes fitopatógenos, responsáveis por perdas economicamente significativas nas regiões tropicais e subtropicais do mundo por causarem a antracnose em diversas culturas economicamente importantes, podendo ser um problema no desenvolvimento das plantas e também no pós-colheita (MENEZES, 2006; TALHINHAS *et al.*, 2023). Nesse sentido, faz-se o uso de fungicidas que pode trazer diversas consequências ambientais e para a saúde humana (RANI *et al.*, 2021). Além disso, o uso de agroquímicos para o controle de doenças de gramíneas forrageiras em áreas de pastagens é economicamente inviável, sendo essa prática limitada à aplicação em campos de produção de sementes (FERNANDES *et al.*, 2010). Uma alternativa sustentável é o controle biológico de doenças de plantas onde um microrganismo é utilizado para controlar outro (MORANDI *et al.*, 2009; Brasil, 2021). O padrão de colonização semelhante e a associação próxima aos fitopatógenos fazem com que as bactérias endofíticas sejam potencialmente usadas na agricultura como uma forma de biocontrole (SANTOYO *et al.*, 2016).

Xu e colaboradores, ao estudar isolados endofíticos de caule de amoreira identificou quatro isolados pertencentes ao gênero *Pantoea* sp. com atividade antagônica contra *Colletotrichum* sp. e a porcentagem de inibição variou entre 26,14 a 44,25%. Ainda no mesmo estudo, Xu e colaboradores (2019) descreveram 25 isolados de *Bacillus* sp. com porcentagem de inibição variando de 19,25 a 72,21% contra o *Colletotrichum* sp. Em estudo realizado por Ortiz-Ojeda e colaboradores (2020), um isolado bacteriano endofítico de jambu (*Acmella ciliata*) pertencente ao gênero *Enterobacter* sp. foi descrito com atividade antagônica *in vitro* contra *Colletotrichum* sp. e porcentagem de inibição de aproximadamente 30%. Ortiz-Ojeda e colaboradores (2020) também descreveram oito linhagens de *Bacillus* sp. com atividade antagônica contra *Colletotrichum* sp. variando de, aproximadamente, 25 a 40%. Malik e colaboradores (2022), ao estudar isolados de tomate identificou um isolado bacteriano pertencente ao gênero *Pantoea* sp. e três *Bacillus* sp. com atividade antagonista ao fungo *Colletotrichum* sp. *in vitro* e porcentagens de inibição de 23,5%, 49,1%, 29,4% e 25,9%, respectivamente. Alijani e colaboradores (2022) descreveu uma linhagem endofítica de *Staphylococcus* sp. produzindo metabólitos

voláteis biologicamente ativos contra *Colletotrichum* sp. resultando em 34,5% de inibição do patógeno. Lisboa (2024) descreveu bactérias rizosféricas de *P. vaginatum* com atividade antagônica *in vitro* contra *Colletotrichum* pertencentes aos gêneros *Bacillus* (%i= 77,4%), *Streptomyces* (%i= 31 e 84,5%), *Amycolatopsis* (%i= 81%), *Paenibacillus* (%i= 85,7%) e *Burkholderia* (%i= 72,6%).

A interação entre patógenos e plantas hospedeiras é um processo complexo, influenciado por fatores bióticos e abióticos. Essa complexidade torna insuficiente resultados obtidos *in vitro* para o contexto real de campo. Os ensaios *in vivo* são cruciais para compreender a dinâmica da doença em sua totalidade, pois permitem observar como o patógeno se comporta frente aos mecanismos de defesa da planta, às variações ambientais e à microbiota presente (KATAN, 2017).

#### Capítulo 4 – Conclusões

De acordo com o sequenciamento do gene 16S rDNA, os isolados endofíticos selecionados pertencem aos gêneros: *Bacillus* sp., *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Curtobacterium*, *Delftia*, *Jeotgalicoccus*, *Myroides*, *Neobacillus*, *Pseudomonas*, *Psychrobacillus*, *Rhodococcus*.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos na matéria seca da raiz para *Paspalum vaginatum*. Para a matéria seca da parte aérea, comprimento das plantas e número de perfilhos basais, os inoculantes comerciais BiomaPhos® e Biopasto® apresentaram resultados inferiores quando comparados aos demais tratamentos disponíveis para *Paspalum vaginatum*. Ademais, o Biopasto® apresentou resultados inferiores quando comparados aos demais tratamentos disponíveis em relação ao número de perfilhos aéreos em *Paspalum vaginatum*.

Em *Paspalum maritimum*, duas linhagens de *Pantoea* sp. contribuíram para um aumento significativo na matéria seca das raízes em comparação com o grupo de controle e o Biopasto® apresentou resultados inferiores quando comparados aos demais tratamentos disponíveis para matéria seca da parte aérea e da raiz. Não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos para o comprimento da planta e número de perfilhos basais em *Paspalum maritimum*.

Dos sete isolados bacterianos testados para solubilizar rocha fosfatada Araxá, rocha fosfatada Bayovar, fosfato de cálcio e superfosfato triplo *in vitro* todos foram capazes de solubilizar as quatro diferentes fontes de fósforo, com destaque para a Bac 160, Bac 161 e Bac 179.

No experimento de solubilização de fósforo *in vivo*, dentre os três isolados testados a Bac 161 apresentou resultados favoráveis para seu uso com fontes de fósforo insolúveis, como a rocha fosfatada Bayovar tanto para matéria seca da parte aérea como da raiz. Já a Bac 160 apresentou resultados favoráveis para uso em conjunto com uma fonte de fósforo solúvel no intuito de intensificar seu efeito.

Dentre os 70 isolados bacterianos endofíticos avaliados para antagonismo em relação ao *Colletotrichum* sp., 13 isolados demonstraram atividade antagônica ao fungo *Colletotrichum* sp. e apresentaram índice de inibição variando entre 12,9% e 43,1%, sendo eles: Bac 155, Bac 156, Bac 184, Bac 187, Bac 198, Bac 203, Bac 205, Bac 208, Bac 216, Bac 221, Bac226, Bac 230, Bac 232.

## Referências

- Abedinzadeh, M., Etesami, H., & Alikhani, H. A. (2019). Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. *Biotechnology Reports*, *21*, e00305.
- Acuña, Carlos A.; Martínez, Eric J.; Zilli, Alex L.; Brugnoli, Elsa A.; Espinoza, Francisco; Marcón, Florencia; Urbani, Mario H.; Quarín, Camilo L. (2019). Reproductive Systems in Paspalum: Relevance for Germplasm Collection and Conservation, Breeding Techniques, and Adoption of Released Cultivars. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, p. 1377.
- Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological research*, *221*, 36-49.
- 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.
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE transactions on automatic control*, *19*(6), 716-723.
- Alberto, R. T., Isip, M. F., Biagtan, A. R., & Tagaca, R. C. (2019). Disease risk map of anthracnose-twister of onion based on previous disease locations as a future predictors. *Spatial Information Research*, *27*, 259-265.
- Ajar, N.Y.; Priyanka, V.; Bhanumati, S.; Vinay, S.C.; Archana, S.; Anil, K.S. (2017). Plant Growth Promoting Bacteria: Biodiversity and Multifunctional Attributes for Sustainable Agriculture. *Adv. Biotechnol. Microbiol.* *5*, 1-6.
- Alijani, Z., Amini, J., Ashengroph, M., & Bahramnejad, B. (2019). Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae*, causal agent strawberry anthracnose. *International journal of food microbiology*, *307*, 108276.
- Amaral, M. B., Ribeiro, T. G., Alves, G. C., Coelho, M. R. R., Matta, F. D. P., Baldani, J. I., & Baldani, V. L. D. (2022). The occurrence of rhizobacteria from Paspalum genotypes and their effects on plant growth. *Scientia Agricola*, *79*, e20200240.
- Associação nacional para difusão de adubos (Brasil). Principais indicadores do setor de fertilizantes: janeiro de 2021. São Paulo: Anda, 2021. Disponível em: [https://anda.org.br/wpcontent/uploads/2021/06/Principais\\_Indicadores\\_2021.pdf](https://anda.org.br/wpcontent/uploads/2021/06/Principais_Indicadores_2021.pdf). Acesso em: 28 jun. 2021.
- Aswani, R., Vipina Vinod, T., & Ashitha, J. (2020). Benefits of plant-endophyte interaction for sustainable agriculture. *Microbial Endophytes: Functional Biology and Applications; Kumar, A., Radhakrishnan, E., Eds*, 35-55.
- Azevedo, J. L. D., Pamphile, J. A., Quecine-Verdi, M. C., Lacava, P. T., & Costa, S. O. P. D. (2018). Biotecnologia microbiana ambiental. Maringá: Eduem, 331 p. ISBN 978-85-7628-734-6.
- Baroncelli, R., Zapparata, A., Sarrocco, S., Sukno, S. A., Lane, C. R., Thon, M. R., ... & Sreenivasaprasad, S. (2015). Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with UK strawberry production suggests multiple introductions of three different *Colletotrichum* species. *PLoS One*, *10*(6), e0129140.
- 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*(4), 465-479.

Batista, L. A. R.; Godoy, R.; Regitano Neto, A. (1999). Recursos Genéticos de Forrageiras do Gênero Paspalum na Embrapa Pecuária Sudeste In: SIMPÓSIO DE RECURSO GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA E CARIBE, Brasília, DF. Resumos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

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, 23-32.

Begam, M. M., Sutradhar, T., Chowdhury, R., Mukherjee, C., Basak, S. K., & Ray, K. (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, 373-387.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*, 17(8), 478-486.

Bhatla, S. C., & Lal, M. A. (2023). Plant physiology, development and metabolism. Springer Nature.

Bianchi, V., Masciandaro, G., Ceccanti, B., Peruzzi, E., & Iannelli, R. (2011). Phytoremediation of contaminated sediments: evaluation of agronomic properties and risk assessment. *Chemistry and Ecology*, 27(S1), 1-11.

Biopron. Disponível em: <<https://probelte.com/product/biopron/>>. Acesso em: 19 fev. 2025.

Blanco-Vargas, A., Rodríguez-Gacha, L. M., Sánchez-Castro, N., Garzón-Jaramillo, R., Pedroza-Camacho, L. D., Poutou-Piñales, R. A., ... & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2020). Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*, 6(10).

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.

Brasil. (2021). Plano nacional de fertilizantes 2050: uma estratégia para os fertilizantes no Brasil.

Brasil. 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, 13 mai 2020.

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

Bulhnova. Disponível em: <<https://probelte.com/product/bulhnova/>>. Acesso em: 19 fev. 2025.

Catanzaro, M. P., Bonasora, M. G., Speranza, P. R., Medina Nicolás, M., Valls, J. F. M., & Rua, G. H. (2015). *Paspalum chilense* (Poaceae, Paspaleae): A new species from southern South America.

Cardoso, E. J. B. N.; Andreote, F. D. (2016). Microbiologia do solo. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, 221 p. ISBN 978-85-86481-56-7.

Cardoso, E., Tsai, S., & Neves, M. Microbiologia do solo Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p. *COELHO, LF*, 1413-1420.. ISBN: 978-85-86481-56-7

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.

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. p. 1–310.

Chaturvedi, H., Singh, V., & Gupta, G. (2016). Potential of bacterial endophytes as plant growth promoting factors. *J Plant Pathol Microbiol*, 7(9), 1-6.

Compant, S., Reiter, B., Sessitsch, A., Nowak, J., Clément, C., & Ait Barka, E. (2005). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 1685-1693.

Compant, S., Clément, C., & Sessitsch, A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo-and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(5), 669-678.

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.

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

da Silva, S. C., Chiavegato, M. B., Pena, K. S., Silveira, M. C. T., Barbero, L. M., Junior, S. J. S., ... & Pereira, L. E. T. (2017). Tillering dynamics of Mulato grass subjected to strategies of rotational grazing management. *The Journal of Agricultural Science*, 155(7), 1082-1092.

Damo, J. L. C., Pedro, M., & Sison, M. L. (2024). Phosphate Solubilization and Plant Growth Promotion by *Enterobacter* sp. Isolate. *Applied Microbiology*, 4(3), 1177-1192.

Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 847-867.

De Abreu, C. S., Figueiredo, J. E. F., Oliveira-Paiva, C. A., Dos Santos, V. L., Gomes, E. A., Ribeiro, V. P., ... & Marriel, I. E. (2017). Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. *Genet. Mol. Res.* 16 (1).

de Almeida Leite, R., Martins da Costa, E., Cabral Michel, D., do Amaral Leite, A., de Oliveira-Longatti, S. M., de Lima, W., ... & de Souza Moreira, F. M. (2024). Genomic insights into organic acid production and plant growth promotion by different species of phosphate-solubilizing bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(10), 311.

de Bary, A. (1866). *Morphologie und physiologie der pilze, flechten und myxomyceten* (Vol. 1). Engelmann.

de Souza Almeida, B. A., Mistura, C., dos Santos Nunes, T. S., Borges, R. O., Queiroz, M. A. Á., de Oliveira, G. M., ... & Ferreira Filho, P. A. (2017). Contribuição de perfilhos basais e aéreos na dinâmica de produção de forragem do capim-tifton 85 irrigado com efluentes de tanques de piscicultura e recebendo adubação com NPK. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(6), 3725-3738.

de Carvalho Filho, O. M., & Fontes, H. R. (2004). Crescimento e algumas características nutricionais do capim-gengibre (*Paspalum maritimum* Trind.).

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, L. F., Brandão De Carvalho, C. A., Assis Anjos, A. N., Renato Viegas, C., & Ferreira Da Silva, P. H. (2018). Avanços na avaliação de pastagens cultivadas com forrageiras tropicais no Brasil: Uma

Revisão. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science/Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias*, 11(2).

de Oliveira, F. A., Vigna, B. B., da Silva, C. C., Fávero, A. P., de Matta, F. P., Azevedo, A. L., & de Souza, A. P. (2020). Coexpression and transcriptome analyses identify active apomixis-related genes in *Paspalum notatum* leaves. *BMC genomics*, 21, 1-15.

de Paula, A. F., Cruz, F. D. P. N., Dinato, N. B., de Andrade, P. H. M., de Moraes, A. C. P., Junior, W. B., ... & Lacava, P. T. (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.

de Paula Nogueira Cruz, F., Ferreira de Paula, A., Nogueira, C. T., Marques de Andrade, P. H., Borges, L. M., Lacava, P. T., ... & Paiva de Sousa, C. (2021). Discovery of a novel lineage *Burkholderia cepacia* ST 1870 endophytically isolated from medicinal *Polygala paniculata* which shows potent in vitro antileishmanial and antimicrobial effects. *International Journal of Microbiology*, 2021(1), 6618559.

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

Dinato, N. B. Viabilidade de grãos de pólen de espécies de *Paspalum* após a criopreservação visando seu uso em programas de melhoramento genético. Tese (Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2020.

Ding, T., & Melcher, U. (2016). Influences of plant species, season and location on leaf endophytic bacterial communities of non-cultivated plants. *PLoS one*, 11(3), e0150895.

dos Santos Oliveira, G., de Araujo Viana, T. V., de Sousa, G. G., & Santos, O. (2023) Trocas gasosas do amendoim sob formas de adubação e estresse salino em solo com biomaphos®.

Duarte, C. F. D., Cecato, U., Hungria, M., Fernandes, H. J., Biserra, T. T., Galbeiro, S., ... & da Silva, D. R. (2020). Morphogenetic and structural characteristics of *Urochloa* species under inoculation with plant-growth-promoting bacteria and nitrogen fertilisation. *Crop and Pasture Science*, 71(1), 82-89.

Duca, D. R., & Glick, B. R. (2020). Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 104, 8607-8619...

Duncan, R. R.; Carrow, R. N. (2000). Seashore *Paspalum*: The environmental turfgrass. Chelsea Mich.: Ann Arbor Press. xiv, 281. ISBN 978-1-575-04141-4.

Eady, R. R.; Postgate, J. R. (1974) Nitrogenase. *Nature*, v. 249, n. 460, p. 805–810.

ELHAISSOUFI, 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.

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

Fernandes, A. C. V., Lisboa, P. H. G., ANDRADE, P. D., Vigna, B. B. Z., Nogueira, S. R., Fávero, A. P., & Lacava, P. T. (2023). Bactérias endofíticas associadas a *Paspalum vaginatum* Swartz com potencial para promoção de crescimento vegetal e biocontrole.

Ferreira, C. B., França, C. C. R, Maia e Sá, J., Costa, R. de Q., Barbosa, G. M., Nunes, H. B. (2026) Crescimento de milho em função da aplicação de fertilizantes fosfatados a bactérias solubilizadoras de fósforo. *Revista Sociedade e Ambiente*, 4(3), 56-66.

Fialho, C. A., Silva, S. C. D., Gimenes, F. M. D. A., Gomes, M. B., Berndt, A., & Gerdes, L. (2012). Tiller population density and tillering dynamics in marandu palisade grass subjected to strategies of rotational stocking management and nitrogen fertilization. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 34, 245-251.

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 Out. 2024.

Gandra, L. C., dos Santos, W. S., Oliveira, F. S., Santos, H. O., Moreira, S. D., Neiva, I. P., & Santos, E. M. S. (2024). Desempenho de plantas forrageiras bioinoculadas com BiomaPhos®. *Peer Review*, 6(3), 255-275.

Gilberto. **AleloVegetal** **Dados** **abertos.** Disponível em: <<https://av.cenargen.embrapa.br/avconsulta/Passaporte/bancoAcesso.do?idb=77>>. Acesso em: 5 nov. 2024.

Goldstein, A. H. (1994). Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram-negative bacteria. *Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology*. ASM Press, Washington, DC, 197-203.

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.

Goldstein, A. H. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture & Horticulture*, 12(2), 185-193.

Gonçalves, T. M. Modo reprodutivo de acessos de *Paspalum* spp. (grupo informal Plicatula) e busca de marcadores moleculares associados a apomixia. Tese (Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

Govindarajan, M., Kwon, S. W., & Weon, H. Y. (2007). Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 997-1006.

Gurgel, R. G. A. (2003). Principais espécies e variedades de grama. *Simpósio sobre gramados*, 1. Botucatu: UNESP. Disponível em: <<http://infograma.com.br/wp-content/uploads/2015/10/PRINCIPAIS-ESP%C3%89CIAS-E-VARIEDADES-DE-GRAMAS.pdf>>. Acesso em 04 jul. 2022.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98).

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Klopper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian journal of microbiology*, 43(10), 895-914.

Hallmann, J., & Berg, G. (2006). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. *Microbial root endophytes*, 15-31.

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.

Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (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.

Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & van Elsas, J. D. (2008). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in microbiology*, 16(10), 463-471.

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.

Hodgson, J. (1990). *Grazing management. Science into practice* (pp. 203-pp).

Howard, J. B., & Rees, D. C. (1996). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Chemical reviews*, 96(7), 2965-2982.

Hu, M. J., Grabke, A., & Schnabel, G. (2015). Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing peach anthracnose in South Carolina. *Plant disease*, 99(6), 797-805.

Huang, J., Sheng, X., & He, L. (2010). Biodiversity of phosphate-dissolving and plant growth--promoting endophytic bacteria of two crops. *Wei Sheng wu xue bao= Acta Microbiologica Sinica*, 50(6), 710-716.

Hue, N. V., Campbell, S., Li, Q. X., Lee, C. R., & Fong, J. (2002). Reducing salinity and organic contaminants in the Pearl Harbor dredged material using soil amendments and plants. *Remediation Journal*, 12(4), 45-63.

Hungria, M.; Nogueira, M. A.. (2022). Bioinsumos na cultura da soja In: Fixação biológica do nitrogênio.

Hungria, M., & Nogueira, M. (2021). Inoculação multifuncional para pastagens com braquiárias.

Ikeda, S., Okubo, T., Anda, M., Nakashita, H., Yasuda, M., Sato, S., ... & Minamisawa, K. (2010). Community- and genome-based views of plant-associated bacteria: plant-bacterial interactions in soybean and rice. *Plant and Cell Physiology*, 51(9), 1398-1410.

Illmer, P., & Schinner, F. (1995). Solubilization of inorganic calcium phosphates—solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(3), 257-263.

Jain, A., Sarsaiya, S., Wu, Q., Lu, Y., & Shi, J. (2019). A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered*, 10(1), 409-424.

Jimtha, J. C., Smitha, P. V., Anisha, C., Deepthi, T., Meekha, G., Radhakrishnan, E. K., ... & Remakanthan, A. (2014). Isolation of endophytic bacteria from embryogenic suspension culture of banana and assessment of their plant growth promoting properties. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118, 57-66.

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).

Katan, J. (2017). Diseases caused by soilborne pathogens: biology, management and challenges. *Journal of Plant Pathology*, 305-315.

- Kandel, S. L., Joubert, P. M., & Doty, S. L. (2017). Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms*, 5(4), 77.
- Khoshru, B., Nosratabad, A. F., Mitra, D., Chaithra, M., Danesh, Y. R., Boyno, G., ... & Sinha, S. (2023). Rock phosphate solubilizing potential of soil microorganisms: advances in sustainable crop production. *Bacteria*, 2(2), 98-115.
- Kim, K. Y., McDonald, G. A., & Jordan, D. (1997). Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *Escherichia coli* in culture medium. *Biology and Fertility of Soils*, 24, 347-352.
- Kishore, N., Pindi, P. K., & Ram Reddy, S. (2015). Phosphate-solubilizing microorganisms: a critical review. *Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*, 307-333.
- Koo, B.-J., Adriano, D. C., Bolan, N. S., & Barton, C. D. (2005). Root exudates and microorganisms. In D. Hillel (Ed.), *Encyclopedia of soils in the environment* (pp. 421–428). Elsevier.
- Kumar, N., & Dubey, R. C. (2022). Plant growth-promoting attributes of an endophyte *Enterobacter roggenkampii* BLS02 isolated from *Barleria lupulina* Lindl. *Organic Agriculture*, 12(1), 137-145.
- Kumar, A., & Radhakrishnan, E. K. (Eds.). (2020). *Microbial endophytes: functional biology and applications*. Woodhead Publishing.
- Kumar, R. R., & Jadeja, V. J. (2016) Isolation of actinomycetes: A complete approach. *International Journal of Current Microbiology Applied Science*, 5(5), 606-618.
- Lacava, P. T., Bogas, A. C., & Cruz, F. D. 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.
- Lacava, P. T., Machado, P. C., & de Andrade, P. H. M. (2021). Phosphate solubilization by endophytes from the tropical plants. *Endophytes: Mineral Nutrient Management, Volume 3*, 207-226.
- Lacava, P., Melo, I., & Pereira, J. (2018). Controle biológico e simbiótico de insetos-pragas e doenças por micro-organismos endofíticos. *Bioteconol Microb Ambiental*, 1, 83-104.
- Lacava, P. T., & Azevedo, J. L. (2013). Endophytic bacteria: a biotechnological potential in agrobiological system. In *Bacteria in agrobiological: crop productivity* (pp. 1-44). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276-3278.
- Langner M., Berlitz D. L., Leticia S Wiest F., Schünemann R., Knaak N., & Fiuza L. M., (2018). Benefits Associated with the Interaction of Endophytic Bacteria and Plants. 61, 1-11.
- Li, H. P., Han, Q. Q., Liu, Q. M., Gan, Y. N., Rensing, C., Rivera, W. L., ... & Zhang, J. L. (2023). Roles of phosphate-solubilizing bacteria in mediating soil legacy phosphorus availability. *Microbiological Research*, 272, 127375.
- Li, Y., Li, Q., Guan, G., & Chen, S. (2020). Phosphate solubilizing bacteria stimulate wheat rhizosphere and endosphere biological nitrogen fixation by improving phosphorus content. *PeerJ*, 8, e9062.

- Li, J., Gu, F., Wu, R., Yang, J., & Zhang, K. Q. (2017). Phylogenomic evolutionary surveys of subtilase superfamily genes in fungi. *Scientific reports*, 7(1), 45456.
- Lima Filho, O. F. de. (2020). Desordens nutricionais em plantas. Embrapa - Comunicado Técnico - 257, Dourados, MS.
- Lisboa, P. (2024). Avaliação e seleção de rizobactérias associadas a *Paspalum vaginatum* para desenvolvimento de novos bioinsumos. Tese (Doutorado em Biotecnologia) –Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.
- Liu, T. T., Zhai, D. D., Guan, B. T., & Shi, Z. J. (2022). Nitrogen fixation and transformation with main group elements. *Chemical Society Reviews*, 51(10), 3846-3861.
- 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.
- Lonard, R. I., Judd, F. W., & Stalter, R. (2015). Biological Flora of Coastal Dunes and Wetlands: *Paspalum vaginatum* Sw. *Journal of Coastal Research*, 31(1), 213-223.
- Lozada, J. A. R., Silveira, K. C., de Melo, R. O., Baldotto, M. A., & Baldotto, L. E. B. (2024). Selection and agricultural use of potential phosphate-solubilizing bacteria isolated from poultry slaughterhouse sludge in maize. *Semina: Ciências Agrárias*, 45(1), 305-314.
- Ma, Q., He, S., Wang, X., Rengel, Z., Chen, L., Wang, X., ... & Zhang, X. (2023). Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea rhizosphaerae* sp. nov. from *Acer truncatum* rhizosphere soil and its effect on *Acer truncatum* growth. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1218445.
- Malik, M. S., Haider, S., Rehman, A., Rehman, S. U., Jamil, M., Naz, I., & Anees, M. (2022). Biological control of fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum*) by chitinolytic bacterial strains. *Journal of Basic Microbiology*, 62(1), 48-62.
- Mariano, R. D. L. (1993). Métodos de seleção in vitro para o controle microbiológico de patógenos de plantas. *Revisão Anual de patologia de Plantas*, 1, 369-409.
- Marra, L. M., Fonsêca Sousa Soares, C. R., de Oliveira, S. M., Avelar Ferreira, P. A., Lima Soares, B., de Fráguas Carvalho, R., ... & de Souza Moreira, F. M. (2012). Biological nitrogen fixation and phosphate solubilization by bacteria isolated from tropical soils. *Plant and soil*, 357, 289-307.
- Marquez-Santacruz, H. A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M. D. C., Velazquez-Sepulveda, I., & Santoyo, G. (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*, 9(4), 2372-2380.
- 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.
- 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.,

- Moreno-hagelsieb, G., Glick, B.R., Santoyo, G., Moreno-hagelsieb, G., Orozco mosqueda, C., (2015). Plant growth-promoting bacterial endophytes microbiological research plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol.* p. 92–99.
- Morgulis, A., Coulouris, G., Raytselis, Y., Madden, T. L., Agarwala, R., & Schäffer, A. A. (2008). Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics*, 24(16), 1757-1764.
- Murphy, J. A. M. E. S., & Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica chimica acta*, 27, 31-36.
- Mushtaq, Z. (2021). PGPR: present role, mechanism of action and future prospects along bottlenecks in commercialization. *EQA-International Journal of Environmental Quality*, 41, 9-15.
- Muthukumar, A., Udhayakumar, R., & Naveenkumar, R. (2017). Role of bacterial endophytes in plant disease control. *Endophytes: Crop Productivity and Protection: Volume 2*, 133-161.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS microbiology Letters*, 170(1), 265-270.
- Naveed, M., Mitter, B., Yousaf, S., Pastar, M., Afzal, M., & Sessitsch, A. (2014). The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. *Biology and fertility of soils*, 50, 249-262.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2022). *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Artmed Editora.
- Notholt, A. J. G., Sheldon, R. P., & Davidson, D. F. (Eds.). (2005). *Phosphate deposits of the world: volume 2, phosphate rock resources* (Vol. 2). Cambridge University Press.
- Ntoulas, N., & Varsamos, I. (2021). Performance of two seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Sw.) varieties growing in shallow green roof substrate depths and irrigated with seawater. *Agronomy*, 11(2), 250.
- Ntui, V. O., Uyoh, E. A., Ita, E. E., Markson, A. A. A., Tripathi, J. N., Okon, N. I., ... & Tripathi, L. (2021). Strategies to combat the problem of yam anthracnose disease: Status and prospects. *Molecular Plant Pathology*, 22(10), 1302-1314.
- 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: Inormativo Abrates.
- Oteino, N., Lally, R. D., Kiwanuka, S., Lloyd, A., Ryan, D., Germaine, K. J., & Dowling, D. N. (2015). Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, 6, 745.
- Ortiz-Ojeda, C. P., de Andrade, S. L., & Procópio, R. E. L. (2020). Antifungal activity of endophytic microorganisms isolated from *Acmella ciliata* (Asteraceae). *Genetics and Molecular Research*, 19(2), 1-14.
- Oliveira-Paiva, C. A., Cota, L. V., Marriel, I. E., Alves, V. M. C., Gomes, E. A., de SOUSA, S. M., ... & LANA, U. D. P. (2021). Validação da recomendação para o uso do inoculante BiomaPhos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) na cultura de soja.
- Paciullo, D. S. C., Campos, N. R., Gomide, C. A. M., Castro, C. R. T. D., Tavela, R. C., & Rossiello, R. O. P. (2008). Crescimento de capim-braquiária influenciado pelo grau de sombreamento e pela estação do ano. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43, 917-923.

- 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.
- Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova-Majorova, M., Suman, J., & Uhlík, O. (2020). The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnology advances*, *44*, 107614.
- Parfitt RL (1978) Anion absorption by soils and soil materials. *Adv Agron* 30:1–50
- Paungfoo-Lonhienne, C., Schmidt, S., Webb, R. I., & Lonhienne, T. G. (2013). Rhizophagy—A new dimension of plant–microbe interactions. *Molecular microbial ecology of the rhizosphere*, *1*, 1199-1207.
- Pavinato, P. S., Cherubin, M. R., Soltangheisi, A., Rocha, G. C., Chadwick, D. R., & Jones, D. L. (2020). Revealing soil legacy phosphorus to promote sustainable agriculture in Brazil. *Scientific Reports*, *10*(1), 15615.
- Peng, Y., Li, S. J., Yan, J., Tang, Y., Cheng, J. P., Gao, A. J., ... & Xu, B. L. (2021). Research progress on phytopathogenic fungi and their role as biocontrol agents. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 670135.
- Penuelas, J., Rico, L., Ogaya, R., Jump, A. S., & Terradas, J. J. P. B. (2012). Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest. *Plant Biology*, *14*(4), 565-575.
- Peres, N. A., MacKenzie, S. J., Peever, T. L., & Timmer, L. W. (2008). Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, *98*(3), 345-352.
- 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-Forrajias Tropicales*, *5*(3), 153-162.
- Podschun, R., Pietsch, S., Höller, C., & Ullmann, U. (2001). Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and environmental microbiology*, *67*(7), 3325-3327.
- Prasad, P., Kalam, S., Sharma, N. K., Podile, A. R., & Das, S. N. (2022). Phosphate solubilization and plant growth promotion by two *Pantoea* strains isolated from the flowers of *Hedychium coronarium* L. *Frontiers in Agronomy*, *4*, 990869.
- 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.
- 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.
- Quarín, C. L., Valls, J. F. M., & Urbani, M. H. (1997). Cytological and reproductive behaviour of *Paspalum atratum*, a promising forage grass for the tropics. *Tropical Grasslands*, *31*, 114-116.
- Quiroga, E. N., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. (2001). Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, *74*(1), 89-96.

Ranalli, G., Zanardini, E., & Sartini, C. (2009). *Encyclopedia of Microbiology. Third Edition. Volume 1. ISBN (online) 978-0-12-373944-5.*

Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., ... & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of cleaner production, 283*, 124657.

Raven, P. H. *et al.* Raven: Biologia vegetal. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 856 p. ISBN 9788527723626.

Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 21*(1), 49-68.

Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Van Montagu, M., & Hurek, T. (2006). An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular plant-microbe interactions, 19*(2), 181-188.

Reis, J. C. L. (2007). *Caracterização agrônômica de Paspalum em terras baixas do Litoral Sul do Rio Grande do Sul.* Embrapa Clima Temperado.

Rohini, S., Aswani, R., Kannan, M., Sylas, V. P., & Radhakrishnan, E. K. (2018). Culturable endophytic bacteria of ginger rhizome and their remarkable multi-trait plant growth-promoting features. *Current microbiology, 75*, 505-511.

Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular plant-microbe interactions, 19*(8), 827-837.

Roy, T., Biswas, D. R., Datta, S. C., & Sarkar, A. (2018). Phosphorus release from rock phosphate as influenced by organic acid loaded nanoclay polymer composites in an Alfisol. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 88*, 121-132.

Sadeghian, M., Bonjar, G. H. S., & Sirchi, G. R. S. (2016). Post harvest biological control of apple bitter rot by soil-borne actinomycetes and molecular identification of the active antagonist. *Postharvest Biology and Technology, 112*, 46-54.

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

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological research, 183*, 92-99.

Sarmah, R., & Sarma, A. K. (2023). Phosphate solubilizing microorganisms: A review. *Communications in Soil Science and Plant Analysis, 54*(10), 1306-1315.

SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, Release 9.4, 2023

Sauer, K., & Camper, A. K. (2001). Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *Journal of Bacteriology, 183*(22), 6579-6589.

Sessitsch, A. N. G. E. L. A., Hardoim, P. A. B. L. O., Döring, J., Weilharter, A., Krause, A. N. D. R. E. A. S., Woyke, T. A. N. J. A., ... & Reinhold-Hurek, B. (2012). Functional characteristics of an endophyte community

colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(1), 28-36.

Shah, D., Khan, M. S., Aziz, S., Ali, H., & Pecoraro, L. (2021). Molecular and biochemical characterization, antimicrobial activity, stress tolerance, and plant growth-promoting effect of endophytic bacteria isolated from wheat varieties. *Microorganisms*, 10(1), 21.

Sharma, U. C. (1992). Effect of soil texture and precipitation on phosphorus leaching in Alfisols of Meghalaya. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 40(3), 415-419.

Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 1-14.

Sharpley, A., Meisinger, J. J., Breeuwsma, A., Sims, J. T., Daniel, T. C., & Schepers, J. S. (1999). Impacts of animal manure management on ground and surface water quality. *Animal waste utilization: effective use of manure as a soil resource*, 173.

Shi, Y., Yang, H., Zhang, T., Sun, J., & Lou, K. (2014). Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. *Applied microbiology and biotechnology*, 98, 6375-6385.

Shrivastava, M., Srivastava, P. C., & D'souza, S. F. (2018). Phosphate-solubilizing microbes: diversity and phosphates solubilization mechanism. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Volume 2: Nutrient Management and Crop Improvement*, 137-165.

Siciliano, S. D., Fortin, N., Mihoc, A., Wisse, G., Labelle, S., Beaumier, D., ... & Greer, C. W. (2001). Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Applied and environmental microbiology*, 67(6), 2469-2475.

Silva, L. I. D., Pereira, M. C., Carvalho, A. M. X. D., Buttrós, V. H., Pasqual, M., & Dória, J. (2023). Phosphorus-solubilizing microorganisms: a key to sustainable agriculture. *Agriculture*, 13(2), 462.

Silva, U. C., Cuadros-Orellana, S., Silva, D. R., Freitas-Júnior, L. F., Fernandes, A. C., Leite, L. R., ... & 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.

Silva, C. F. D., Vitorino, L. C., Mendonça, M. A. C., Araújo, W. L. D., Dourado, M. N., Albuquerque, L. C. D., ... & Souchie, E. L. (2020). Screening of plant growth-promoting endophytic bacteria from the roots of the medicinal plant Aloe vera. *South African Journal of Botany*, 134, 3-16.

Silva, U. C., Medeiros, J. D., Leite, L. R., Morais, D. K., Cuadros-Orellana, S., Oliveira, C. A., ... & Dos Santos, V. L. (2017). Long-term rock phosphate fertilization impacts the microbial communities of maize rhizosphere. *Frontiers in microbiology*, 8, 1266.

Silva Filho, G. N., & Vidor, C. (2000). Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24, 311-319.

Thomas Sims, J., & Pierzynski, G. M. (2005). Chemistry of phosphorus in soils. *Chemical processes in soils*, 8, 151-192.

Singh, V. K., Singh, A. K., & Kumar, A. (2017). Disease management of tomato through PGPB: current trends and future perspective. *3 Biotech*, 7, 1-10.

Souza Filho, A. P. S. (2006). Interferência potencialmente alelopática do capim-gengibre (*Paspalum maritimum*) em áreas de pastagens cultivadas. *Planta Daninha*, *24*, 451-456.

SPRINTER. Disponível em: <<https://essere.group/pt/produtos/sprinter/>>. Acesso em: 19 fev. 2025.

Suman, A., Shukla, L., Marag, P. S., Verma, P., Gond, S., & Prasad, J. S. (2020). Potential use of plant colonizing *Pantoea* as generic plant growth promoting bacteria for cereal crops. *Journal of Environmental Biology*, *41*(5), 987-994.

Surovy, M. Z., Dutta, S., Mahmud, N. U., Gupta, D. R., Farhana, T., Paul, S. K., ... & Islam, T. (2024). Biological control potential of worrisome wheat blast disease by the seed endophytic bacilli. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1336515.

Taghavi, S., Garafola, C., Monchy, S., Newman, L., Hoffman, A., Weyens, N., ... & van der Lelie, D. (2009). Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Applied and environmental microbiology*, *75*(3), 748-757.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2017). *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. Artmed Editora. ISBN 978-8582713662.

Talhinhas, P., & Baroncelli, R. (2023). Hosts of *Colletotrichum*. *Mycosphere*, *14*, 158-261.

Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, *38*(7), 3022-3027.

Teixeira, P. J. P., Colaianni, N. R., Fitzpatrick, C. R., & Dangl, J. L. (2019). Beyond pathogens: microbiota interactions with the plant immune system. *Current opinion in microbiology*, *49*, 7-17.

Tekiner, N., Tozlu, E., & Kotan, R. (2019). Investigation of biological control possibility of anthracnose disease agent, *Colletotrichum gloeosporioides*, on orange.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, *22*(22), 4673-4680.

Tisdale, S. L. Soil fertility and fertilizers. 5. ed. Upper Saddle River N.J.: Prentice Hall, 1993. 648 p. ISBN 978-0024208354.

Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S., & Liu, X. (2021). Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology*, *10*(2), 158.

Turechek, W. W. (2004). Apple diseases and their management. *Diseases of Fruits and Vegetables Volume I: Diagnosis and Management*, 1-108.

Turner, T. R., Ramakrishnan, K., Walshaw, J., Heavens, D., Alston, M., Swarbreck, D., ... & Poole, P. S. (2013). Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *The ISME journal*, *7*(12), 2248-2258.

USDA & NRCS. Plant Guide SEASHORE PASPALUM *Paspalum vaginatum* Sw. Plant Symbol = PAVA. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://plants.usda.gov/DocumentLibrary/plantguide/pdf/pg\\_pava.pdf](https://plants.usda.gov/DocumentLibrary/plantguide/pdf/pg_pava.pdf)>. Acesso em: 31 out. 2024.

- Vandenkoornhuysen, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytologist*, 206(4), 1196-1206.
- Vechiato, M. H., & Aparecido, C. C. (2008). Fungos em sementes de gramíneas forrageiras: restrição fitossanitária e métodos de detecção. *Arquivos do Instituto Biológico*, (89).
- Vegro, c., & Angelo, J. (2023). Diversificação nas Origens de Fertilizantes Importados Suplanta a Escassez Causada pelo Conflito Russo-Ucraniano. *Análises e Indicadores do Agronegócio. São Paulo*, 18(4), 1-8.
- Veloso, J. S., Lima, W. G., Reis, A., Doyle, V. P., Michereff, S. J., & Câmara, M. P. (2021). Factors influencing biological traits and aggressiveness of *Colletotrichum* species associated with cashew anthracnose in Brazil. *Plant Pathology*, 70(1), 167-180.
- 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.
- Vyas, P., & Gulati, A. (2009). Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC microbiology*, 9, 1-15.
- Walpola, B. C., & Yoon, M. H. (2012). Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: A review. *African Journal of Microbiology Research*, 6(37), 6600-6605.
- Xu, W., Wang, F., Zhang, M., Ou, T., Wang, R., Strobel, G., ... & Xie, J. (2019). Diversity of cultivable endophytic bacteria in mulberry and their potential for antimicrobial and plant growth-promoting activities. *Microbiological research*, 229, 126328.
- Yaron, S., & Römling, U. (2014). Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial biotechnology*, 7(6), 496-516.
- Yin JL, Cao CR, Shi RH (尹金来, 曹翠玉, & 史瑞和) (1989) Study on the phosphorus fixation of calcareous soils in Xu-Huai districts. *Acta Pedol Sin* 26:131–136.
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., & Seo, H. (2017). Introducing EzBioCloud: A 396 taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *International Journal of*, 397.
- Zaidi, A., Khan, M., Ahemad, M., & Oves, M. (2009). Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 56(3), 263-284.
- Zhang, J., Guo, T., Tao, Z., Wang, P., & Tian, H. (2020). Transcriptome profiling of genes involved in nutrient uptake regulated by phosphate-solubilizing bacteria in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 611-626.
- Zhang, X. (2017). A plan for efficient use of nitrogen fertilizers. *Nature*, 543(7645), 322-323.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational biology*, 7(1-2), 203-214.
- Zicca, S., De Bellis, P., Masiello, M., Saponari, M., Saldarelli, P., Boscia, D., & Sisto, A. (2020). Antagonistic activity of olive endophytic bacteria and of *Bacillus* spp. strains against *Xylella fastidiosa*. *Microbiological research*, 236, 126467.
- Zihong, S., Lixiao, D., Bojun, M., Wenzhe, L., & Ruhong, M. (1999). Studies on the population and dynamic analysis of peanut endophytes. *Acta Phytophylacica Sinica*, 26(4), 309-314.

Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., ... & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and environmental microbiology*, 68(5), 2198-2208.

Zou, X., Binkley, D., & Doxtader, K. G. (1992). A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils. *Plant and Soil*, 147, 243-250.

Zhu, Y. G., Peng, J., Chen, C., Xiong, C., Li, S., Ge, A., ... & Liesack, W. (2023). Harnessing biological nitrogen fixation in plant leaves. *Trends in Plant Science*, 28(12), 1391-1405.

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

APÊNDICE A – Identificação dos 70 isolados bacterianos endofíticos de *Paspalum vaginatum*

<b>Código do isolado</b>	<b>Identificação</b>	<b>Número de acesso ao GenBank®</b>
146	<i>Bacillus</i> sp.	PQ187708
149		PQ187711
155		PQ187714
156		PQ187715
175		PQ187728
177		PQ187730
181		PQ187734
183		PQ187735
187		PQ187739
194		PQ187746
195		PQ187747
199		PQ187751
205		PQ187756
207		PQ187757
208		PQ187758
221		PQ187769
223		PQ187771
224		PQ187772
226		PQ187774
227		PQ187775
229		PQ187776

---

230		PQ187777
231		PQ187778
232		PQ187779
152	<i>Agrobacterium</i> sp.	PQ187712
154		PQ187713
169		PQ187723
170		PQ187724
171		PQ187725
186		PQ187738
188		PQ187740
164	<i>Micrococcus</i> sp.	PQ187722
189		PQ187741
191		PQ187743
196		PQ187748
200		PQ187752
202		PQ187753
213		PQ187761
161	<i>Enterobacter</i> sp.	PQ187720
184		PQ187736
185		PQ187737
216		PQ187764
217		PQ187765
219		PQ187767
157	<i>Staphylococcus</i> sp.	PQ187716
158		PQ187717

203		PQ187754
209		PQ187759
214		PQ187762
220		PQ187768
148	<i>Pantoea</i> sp.	PQ187710
160		PQ187719
179		PQ187732
180		PQ187733
198		PQ187750
193	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	PQ187745
215		PQ187763
218		PQ187766
159	<i>Lysinibacillus</i> sp.	PQ187718
176		PQ187729
204	<i>Paenibacillus</i> sp.	PQ187755
222		PQ187770
163	<i>Jeotgalicoccus</i> sp.	PQ187721
173	<i>Curtobacterium</i> sp.	PQ187726
174	<i>Neobacillus</i> sp.	PQ187727
178	<i>Delftia</i> sp.	PQ187731
190	<i>Psychrobacillus</i> sp.	PQ187742
192	<i>Pseudomonas</i> sp.	PQ187744
197	<i>Rhodococcus</i> sp.	PQ187749
210	<i>Myroides</i> sp.	PQ187760

---

APÊNDICE B – Resultados dos descritores de comprimento (COMP), número de perfilhos basais (NPB) e número de perfilhos aéreos (NPA) para os tratamentos em *P. vaginatum* ao longo das semanas

Tratamento	Semana 1			Semana 2			Semana 3			Semana 4			Semana 5			Semana 6		
	COMP	NPB	NPA	COMP	NPB	NPA	COMP	NPB	NPA	COMP	NPB	NPA	COMP	NPB	NPA	COMP	NPB	NPA
Controle	57,13 <sup>a</sup>	6,75 <sup>ab</sup>	12,17 <sup>a</sup>	63,25 <sup>ab</sup>	7,13 <sup>a</sup>	14,00 <sup>a</sup>	67,69 <sup>ab</sup>	7,50 <sup>a</sup>	14,17 <sup>a</sup>	70,75 <sup>ab</sup>	7,75 <sup>a</sup>	13,50 <sup>a</sup>	74,75 <sup>ab</sup>	7,75 <sup>a</sup>	13,17 <sup>ab</sup>	80,94 <sup>ab</sup>	8,50 <sup>a</sup>	18,50 <sup>a</sup>
Bac 160	44,69 <sup>a</sup>	7,43 <sup>ab</sup>	9,75 <sup>a</sup>	49,44 <sup>ab</sup>	8,86 <sup>a</sup>	9,13 <sup>ab</sup>	51,06 <sup>ab</sup>	9,71 <sup>a</sup>	9,13 <sup>ab</sup>	53,13 <sup>ab</sup>	9,71 <sup>a</sup>	8,88 <sup>ab</sup>	55,13 <sup>ab</sup>	9,86 <sup>a</sup>	9,25 <sup>ab</sup>	59,29 <sup>ab</sup>	10,57 <sup>a</sup>	11,25 <sup>ab</sup>
Bac 161	67,39 <sup>a</sup>	7,25 <sup>ab</sup>	11,78 <sup>a</sup>	77,17 <sup>a</sup>	8,38 <sup>a</sup>	13,67 <sup>ab</sup>	81,39 <sup>a</sup>	8,50 <sup>a</sup>	14,22 <sup>a</sup>	84,06 <sup>a</sup>	8,75 <sup>a</sup>	13,89 <sup>a</sup>	88,06 <sup>a</sup>	8,75 <sup>a</sup>	15,22 <sup>a</sup>	93,06 <sup>a</sup>	8,88 <sup>a</sup>	17,44 <sup>ab</sup>
Bac 179	37,81 <sup>a</sup>	8,50 <sup>a</sup>	7,63 <sup>a</sup>	42,81 <sup>ab</sup>	9,25 <sup>a</sup>	7,75 <sup>ab</sup>	44,94 <sup>ab</sup>	9,75 <sup>a</sup>	8,50 <sup>ab</sup>	46,44 <sup>ab</sup>	9,88 <sup>a</sup>	8,75 <sup>ab</sup>	49,25 <sup>ab</sup>	10,38 <sup>a</sup>	9,13 <sup>ab</sup>	52,50 <sup>ab</sup>	10,88 <sup>a</sup>	10,75 <sup>ab</sup>
Bac 185	42,93 <sup>a</sup>	7,00 <sup>ab</sup>	10,56 <sup>a</sup>	51,00 <sup>ab</sup>	7,63 <sup>a</sup>	12,89 <sup>ab</sup>	54,71 <sup>ab</sup>	7,88 <sup>a</sup>	13,78 <sup>ab</sup>	57,57 <sup>ab</sup>	8,25 <sup>a</sup>	14,00 <sup>a</sup>	60,79 <sup>ab</sup>	8,38 <sup>a</sup>	15,00 <sup>a</sup>	69,71 <sup>ab</sup>	9,63 <sup>a</sup>	19,11 <sup>ab</sup>
Bac 198	51,50 <sup>a</sup>	6,67 <sup>ab</sup>	12,00 <sup>a</sup>	58,68 <sup>ab</sup>	6,92 <sup>a</sup>	14,63 <sup>a</sup>	62,51 <sup>ab</sup>	7,17 <sup>a</sup>	16,00 <sup>a</sup>	65,00 <sup>ab</sup>	7,50 <sup>a</sup>	16,38 <sup>a</sup>	68,27 <sup>ab</sup>	7,75 <sup>a</sup>	17,38 <sup>a</sup>	73,09 <sup>ab</sup>	8,58 <sup>a</sup>	18,88 <sup>a</sup>
BiomaPhos	33,86 <sup>a</sup>	5,20 <sup>b</sup>	4,57 <sup>a</sup>	52,36 <sup>ab</sup>	7,20 <sup>a</sup>	11,43 <sup>ab</sup>	53,71 <sup>ab</sup>	7,20 <sup>a</sup>	11,29 <sup>ab</sup>	54,93 <sup>ab</sup>	7,50 <sup>a</sup>	11,43 <sup>ab</sup>	56,50 <sup>ab</sup>	7,60 <sup>a</sup>	11,43 <sup>ab</sup>	60,71 <sup>ab</sup>	7,80 <sup>a</sup>	13,00 <sup>ab</sup>
Biopasto	22,67 <sup>a</sup>	5,42 <sup>b</sup>	5,25 <sup>a</sup>	38,33 <sup>b</sup>	6,17 <sup>a</sup>	8,75 <sup>b</sup>	39,50 <sup>b</sup>	6,42 <sup>a</sup>	8,25 <sup>b</sup>	41,17 <sup>b</sup>	6,58 <sup>a</sup>	8,50 <sup>b</sup>	43,00 <sup>b</sup>	6,67 <sup>a</sup>	8,50 <sup>b</sup>	47,50 <sup>b</sup>	7,67 <sup>a</sup>	11,00 <sup>b</sup>

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

APÊNDICE C – Resultados dos descritores de comprimento (COMP) e número de perfilhos basais (PB) para os tratamentos em *P. maritimum* ao longo das semanas

Tratamento	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6	
	COMP	PB	COMP	PB	COMP	PB	COMP	PB	COMP	PB	COMP	PB
Controle	12,23 <sup>a</sup>	5,33 <sup>a</sup>	15,75 <sup>a</sup>	6,00 <sup>a</sup>	21,40 <sup>a</sup>	6,33 <sup>a</sup>	28,31 <sup>a</sup>	6,75 <sup>a</sup>	32,19 <sup>a</sup>	7,83 <sup>a</sup>	34,31 <sup>a</sup>	8,50 <sup>a</sup>
Bac 160	16,85 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>	21,45 <sup>a</sup>	5,67 <sup>a</sup>	26,07 <sup>a</sup>	6,00 <sup>a</sup>	30,68 <sup>a</sup>	6,75 <sup>a</sup>	33,27 <sup>a</sup>	7,92 <sup>a</sup>	33,41 <sup>a</sup>	8,17 <sup>a</sup>
Bac 161	20,35 <sup>a</sup>	5,83 <sup>a</sup>	24,75 <sup>a</sup>	6,67 <sup>a</sup>	29,84 <sup>a</sup>	7,00 <sup>a</sup>	32,81 <sup>a</sup>	8,08 <sup>a</sup>	33,63 <sup>a</sup>	8,50 <sup>a</sup>	33,66 <sup>a</sup>	8,75 <sup>a</sup>
Bac 179	18,20 <sup>a</sup>	6,33 <sup>a</sup>	22,05 <sup>a</sup>	6,67 <sup>a</sup>	25,00 <sup>a</sup>	6,58 <sup>a</sup>	25,92 <sup>a</sup>	7,83 <sup>a</sup>	29,52 <sup>a</sup>	9,50 <sup>a</sup>	30,82 <sup>a</sup>	9,83 <sup>a</sup>
Bac 185	16,55 <sup>a</sup>	6,50 <sup>a</sup>	21,04 <sup>a</sup>	6,92 <sup>a</sup>	26,18 <sup>a</sup>	7,42 <sup>a</sup>	30,15 <sup>a</sup>	8,42 <sup>a</sup>	33,57 <sup>a</sup>	9,42 <sup>a</sup>	34,09 <sup>a</sup>	9,83 <sup>a</sup>
Bac 198	18,15 <sup>a</sup>	5,75 <sup>a</sup>	21,45 <sup>a</sup>	6,25 <sup>a</sup>	24,18 <sup>a</sup>	6,33 <sup>a</sup>	28,55 <sup>a</sup>	7,00 <sup>a</sup>	30,50 <sup>a</sup>	8,17 <sup>a</sup>	31,36 <sup>a</sup>	9,25 <sup>a</sup>
BiomaPhos	15,53 <sup>a</sup>	6,09 <sup>a</sup>	19,81 <sup>a</sup>	6,45 <sup>a</sup>	21,63 <sup>a</sup>	6,55 <sup>a</sup>	22,73 <sup>a</sup>	6,73 <sup>a</sup>	23,13 <sup>a</sup>	7,00 <sup>a</sup>	23,14 <sup>a</sup>	7,36 <sup>a</sup>
Biopasto	12,82 <sup>a</sup>	5,50 <sup>a</sup>	15,55 <sup>a</sup>	5,75 <sup>a</sup>	18,68 <sup>a</sup>	6,08 <sup>a</sup>	23,12 <sup>a</sup>	6,33 <sup>a</sup>	28,73 <sup>a</sup>	6,67 <sup>a</sup>	31,07 <sup>a</sup>	6,92 <sup>a</sup>

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

