



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO  
CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE  
TECNOLOGIA

**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**



**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO  
DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO  
PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

**Paula Cristiane Machado**

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

***Orientador:***

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

***Coorientador:***

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

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

**São Carlos – SP  
2019**

**PAULA CRISTIANE MACHADO**

**DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA  
COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO PINHÃO-MANSO (*Jatropha  
curcas* L.)**

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

**Area de concentração:** Biotecnologia

**Orientador:**

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

**Coorientador:**

Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa

São Carlos, Agosto de 2019

Machado, Paula Cristiane  
DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA  
COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO PINHÃO-MANSO  
(*Jatropha curcas* L.) / Paula Cristiane Machado. -- 2019.  
149 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos,  
São Carlos

Orientador: Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava

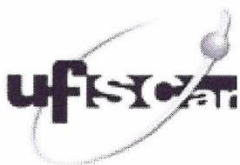
Banca examinadora: Paulo Teixeira Lacava, João Lúcio Azevedo, Antonio  
Orlando Di Mauro, Clóvis Wesley Oliveira de Souza, Fábio Olivieri Nóbile  
Bibliografia

1. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. 2. *Jatropha curcas* L. 3.  
Metagenômica. I. Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III.  
Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática  
(SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

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

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Paula Cristiane Machado, realizada em 13/08/2019:

---

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava  
UFSCar

---

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo  
USP

---

Prof. Dr. Antonio Orlando Di Mauro  
UNESP

---

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza  
UFSCar

---

Prof. Dr. Fabio Olivieri de Nobile  
UNIFEB

*Aos meus amados pais José Roberto e Marionilda pelo amor, respeito e incentivo para que eu conseguisse realizar meus sonhos e ao meu filho José por me apresentar o sentimento mais nobre e poderoso desse universo: o amor de uma mãe.*

**DEDICO**

*Aos meus sobrinhos amados Davi e Miguel, à minha irmã Marielli, ao meu cunhado Caio e ao meu amado esposo Junior Maia por todo apoio e alegria que me proporcionam.*

**OFEREÇO**

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a Deus, sou imensamente abençoada.*

*Aos meus pais, José Roberto e Marionilda por, além de me oferecerem a oportunidade de estudar, sempre estarem presentes e me fornecendo o apoio necessário para que eu alcançasse meus objetivos, sou muito grata e feliz por isto.*

*Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava pela oportunidade, confiança e pelo privilégio de fazer parte de sua equipe de pesquisa.*

*À minha orientadora Profa. Dra. Cristina Paiva de Sousa pela colaboração e amizade.*

*Ao meu Filho, José, que foi gerado durante esta jornada e que com sua chegada me fortaleceu como Mulher, Mãe e Pesquisadora.*

*Ao meu esposo Junior Maia, que durante todas as etapas dessa caminhada me deu o apoio e a estrutura emocional para que eu me mantivesse firme seguisse com meus objetivos e sonhos.*

*À minha irmã Marielli e meu cunhado Caio que participaram desta conquista e principalmente agradeço pelos dois anjos Davi e Miguel, que alegram meu dia-a-dia, sou muito feliz por ter vocês.*

*Ao meu querido amigo e parceiro de trabalho Paulo Henrique M. de Andrade por todos os suportes profissionais e emocionais, você é um irmão que ganhei nessa vida, obrigada por ter feito tanto por mim e pelo José, você sempre estará em nossas vidas. Obrigada por tudo!*

*Ao Prof. Dr. Marcus Vinícius Folegatti, pela receptividade e colaboração em ceder a área de cultivo do pinhão-manso (Proc. FAPESP n. 2013/25686-2) localizada na fazenda Areão, ESALQ/USP, Piracicaba, SP para que isolássemos os microrganismos.*

*Ao Dr João Paulo Francisco, pelas informações técnicas referentes a cultura do pinhão-manso instalado na fazenda Areão e pelo auxílio na coleta das amostras de solo rizosférico do pinhão-manso.*

*Ao Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar, São Carlos, SP pelas colaborações no processamento e análise dos dados de metagenômica e conhecimentos.*

*A DNA Consult (<http://www.dnaconsult.com.br>), São Carlos, SP pela parceria e*

*colaboração no estudo de metagenômica.*

*Ao Sr. Josegueri Céleri e Juliana Braga, pela oportunidade de vivenciar as rotinas de produção de microrganismos a nível industrial na empresa VitalForce, situada na cidade de Barretos. Essa vivência me tornou uma profissional mais preparada.*

*Aos técnicos, funcionários, professores, docentes e amigos do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos -UFSCar, pela amizade e convivência durante toda a etapa do projeto*

*A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - PPGBiotec da UFSCar, São Carlos, SP, pela contribuição na minha formação.*

*À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.*

*A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Proc. n. 2015/10974-8).*

*Aos colegas do LaMiB – Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas pelos anos de convivência e aprendizado. A parceria continua!*

*A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram na elaboração deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.*

## RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido a partir de quatro objetivos: (1) caracterização bioquímica de 63 rizobactérias associadas à cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas*), quanto ao potencial para promoção de crescimento vegetal e produção de enzima; desse total de isolados avaliados, 27% apresentaram resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio, 73% produziram AIA (ácido indol-acético) e 69% solubilizaram fosfato inorgânico. Em relação ao teste de antagonismo os isolados rizosféricos apresentaram atividade antagonista com potencial para biocontrole dos seguintes fungos fitopatogênicos: *Alternaria alternata* (39%), *Colletotrichum* sp. (42%), *Fusarium oxysporum* (30%) e *F. proliferatum* (36%). Os testes de atividade enzimática *in vitro* revelaram que 30% das rizobactérias apresentaram atividade amilolítica, 19% celulolítica, 40% esterolítica, 26% lipolítica, 30% pectinolítica e 70% proteolítica. Dentre os 27 isolados bacterianos identificados por meio do sequenciamento parcial do gene 16S, foi observado a presença dos gêneros *Bacillus*; *Chryseobacterium*; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Pseudomonas*; *Serratia* e *Staphylococcus*. (2) Caracterização e comparação da diversidade por meio de análise metagenômica da comunidade bacteriana de solo rizosférico de pinhão-manso provenientes de três tratamentos: não irrigada/sequeiro; irrigação por gotejamento e irrigação por pivô. Foi possível identificar nas amostras, seqüências dos filos de Acidobacteria e Chloroflexi, 4 ordens (Acidimicrobiales, Chthoniobacterales, Gaiellales e Rhodospirillales), 7 famílias (Solibacteraceae, Chitinophagaceae, Acidobacteriaceae, Tepidisphaeraceae, Nitrosomonadaceae, Gemmatimonadaceae e Xanthobacteraceae) e 8 gêneros (*Acidothermus*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Bryobacter*, *Reyranella*, *Sphingomonas*, *Steroidobacter* e *Variibacter*). Não houve aumento significativo de diversidade em nenhum tratamento avaliado. No entanto, avaliando riqueza de espécies, os grupos bacterianos que se diferenciaram significativamente entre as áreas irrigadas por pivô e o sequeiro foram o gênero *Bryobacter* e o Filo Chloroflexi. O tratamento irrigado por gotejamento é o mais distante de todo o grupo, enquanto que as áreas de pivô e sequeiro apresentaram similaridade entre si. (3) Avaliação da promoção de crescimento vegetal da cultura do milho (*Zea mays*) em casa de vegetação, quando inoculadas com bactérias isoladas endofiticamente do pinhão-manso e consideradas potencialmente positivas na caracterização bioquímica *in vitro*, realizada previamente, em relação ao potencial de promoção de crescimento vegetal desses isolados, onde não foi possível comprovar a capacidade de promoção de crescimento em condições de casa de vegetação por meio da veiculação somente das bactérias endofíticas pelas sementes avaliadas nas metodologias propostas. (4) Avaliação do potencial antagonista de bactérias associadas ao pinhão-manso com potencial para controlar o desenvolvimento de três espécies de *Lasioidiplodia subglobosa*, *L. euphorbicola* e *L. pseudotheobromae*, fitopatogênicos ao pinhão-manso. Foram avaliados 135 isolados bacterianos associados ao pinhão-manso quanto a sua capacidade de inibir o crescimento de fitopatógenos onde 36 isolados (26,67%) apresentaram bons índices de atividade antifúngica destacando-se oito isolados (5,90%) que demonstraram potencial em inibir *in vitro* acima de 75% do crescimento do fitopatógeno. Destacaram-se os isolados rizosféricos dos gêneros *Pseudomonas* sp. e *Bacillus subtilis*.

**Palavras-chaves:** Bactérias promotoras de crescimento vegetal, Controle Biológico, Rizosfera, Metagenômica, *Jatropha curcas* L.



## ABSTRACT

The present work was developed from four objectives: (1) biochemical characterization of 63 rhizobacteria, associated with *Jatropha curcas*, as for potential for promoting plant growth and enzyme production; Of these isolates, 27% tested positive for biological nitrogen fixation, 73% produced IAA and 69% solubilized inorganic phosphate. Regarding the antagonism test the rhizospheric isolates showed antagonistic activity with potential for biocontrol of the following phytopathogenic fungi: *Alternaria alternata* (39%), *Colletotrichum* sp. (42%), *Fusarium oxysporum* (30%) and *F. proliferatum* (36%). *In vitro* enzymatic activity tests revealed that 30% of rhizobacteria showed amylolytic, 19% cellulolytic, 40% sterolytic, 26% lipolytic, 30% pectinolytic and 70% proteolytic activity. Among the 27 bacterial isolates identified by partial sequencing of the 16S gene, the presence of *Bacillus* genera was observed; *Chryseobacterium*; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Pseudomonas*; *Serratia* and *Staphylococcus*. (2) Characterization and comparison of diversity by metagenomic analysis of the bacterial community of jatropha rhizospheric soil from three treatments: non-irrigated / dryland; drip irrigation and pivot irrigation. Where it was possible to identify in the samples, sequences of Acidobacteria and Chloroflexi phyla, 4 orders (*Acidimicrobiales*, *Chthoniobacterales*, *Gaiellales* and *Rhodospirillales*), 7 families (Solibacteraceae, Chitinophagaceae, Acidobacteriaceae, Tepidisphaeraceae, Nitrosomonadaceae, Gemmatimonadaceae and Xanthobacteraceae and 8 genera, *Acidothermus*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Bryobacter*, *Reyranella*, *Sphingomonas*, *Steroidobacter* and *Variibacter*. There was no significant increase in diversity in any evaluated treatment. However, species richness was increased in the drip and pivot areas when compared to the non-irrigated area. The bacterial groups that differed significantly between pivot irrigated treatment and rainfed treatment are the *Bryobacter* genus and Filo Chloroflexi. (3) Evaluation of plant growth promotion of maize (*Zea mays*) in greenhouse when inoculated with bacteria endophytically isolated of *Jatropha curcas*. These bacteria were considered potentially positive in the previously performed *in vitro* biochemical characterization in relation to the potential of plant growth promotion of these isolates. It was not possible to prove the ability to promote growth under greenhouse conditions by the transmission of only endophytic bacteria by seeds evaluated in the proposed methodologies. (4) Evaluation of the antagonistic potential of *Jatropha*-associated bacteria with potential to control the development of three species of *Lasiodiplodia subglobosa*, *L. euphorbicola* and *L. pseudotheobromae*, phytopathogenic to *Jatropha*. We evaluated 135 bacterial isolates associated with *Jatropha curcas* as their ability to inhibit the growth of phytopathogens. 36 isolates (26,67%) had good rates of antifungal activity. Eight isolates (5,9 %) were shown to inhibit *in vitro* growth above 75%. phytopathogen, especially the rhizospheric isolates of the genera *Pseudomonas* sp. and *Bacillus subtilis*.

**Keywords:** Plant growth promoting bacteria, Biological Control, Rhizosphere, Metagenomic, *Jatropha curcas* L.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Plantas de pinhão-manso pertencentes ao projeto sobre “Estimativa da transpiração do pinhão-manso com a utilização do método de dissipação térmica” na Fazenda Areão, ESALQ/USP. Coordenado pelo Prof. Dr. Marcus Vinicius Folegatti. Processo FAPESP 2013/25686-2. .... 50
- Figura 2.** A) e B) Coletas das amostras de solo rizosféricos de pinhão-manso na Fazenda Areão, ESALQ/USP no município de Piracicaba-SP. .... 50
- Figura 3.** Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a metodologia para avaliação massal de antagonismo in vitro dos isolados rizobacterianos associados ao pinhão-manso, em relação ao fungo fitopatogênico. Isolado 1, 2, 3, e 4 representam os isolado. .... 55
- Figura 4.** Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a técnica de pareamento direto in vitro para avaliação do potencial antagonico de rizobactérias associados ao pinhão-manso, em relação ao fungo fitopatogênico. Isolado “X” representa o fungo fitopatogênico e o isolado “Y” representa o isolado rizobacteriano. .... 56
- Figura 5.** Frequência de isolamento de rizobactérias associadas ao pinhão-manso sob diferentes tratamento de irrigação. .... 60
- Figura 6.** Dendograma determinado pelo método Neighbor-Joining e a relação entre as sequências foi inferida usando método Muscle; os dados observados nos ramos indicam valores de bootstrap acima de 70%, total de 1000 repetições. O out-group, foi formado por sequências de Burkholderia cepacia, obtidas no banco de dados do NCBI. pelos códigos de acesso U96927Na ..... 62
- Figura 7.** Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em meio NFB semi-sólido inoculado com o rizobactérias associadas ao pinhão-manso. A) controle sem inóculo, B) isolado (RZ4PM14) não apresenta as características de habilidade em fixar nitrogênio e C) isolado (RZ4PM3) apresentando formação de halo e mudança de cor no meio de cultura NFB semi-sólido. .... 65
- Figura 8.** Quantificação da produção de AIA. A) controle negativo, B) isolado rizosférico RZ4PM51. .69
- Figura 9.** Representação do diâmetro dos halos indicadores de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc), em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, formados por isolados bacteriano positivo. .... 70
- Figura 10.** A) Placa contendo apenas o fungo fitopatogênico Colletotrichum sp. (controle). B) Atividade antagonica do isolado rizobacteriano RZ4PM61 (Serratia sp) contra o fungo fitopatogênicos Colletotrichum sp. .... 72
- Figura 11.** Atividade antagonica dos isolados rizobacterianos associados ao pinhão-manso contra os fungos fitopatogênicos: Alternaria alternata, Colletotrichum sp., Fusarium oxysporium e F. proliferatum. .... 73
- Figura 12.** Atividade enzimática das rizobactérias associadas ao pinhão-manso. .... 76
- Figura 13.** Testes qualitativos de atividades enzimáticas por rizobactérias associadas ao pinhão-manso. A) Produção de amilase; B) Produção de celulase; C) Produção de esterase; E) Produção de lípase; F) Produção de pectinase; G) Produção de protease. .... 76
- Figura 14.** Curva de rarefação de bactérias rizosféricas associadas ao pinhão-manso sobdiferentes tratamentos: sequeiro (SEQ), irrigação por pivô (PIV) e irrigação por gotejamento (GOT) para avaliação da cobertura das sequências em identificação de novas OTUs. .... 89
- Figura 15.** Análise da diversidade microbiana na população de bactérias rizosféricas associadas ao pinhão-manso sob diferentes tratamentos: sequeiro (SEQ), gotejamento (GOT) e pivô (PIV), presente em índices superiores a 1,0 %. Legenda: g=gênero, f=família, o=ordem, c=classe e p=filo ..... 90

- Figura 16.** Índice de diversidade (Shannon) e riqueza de espécies bacterianas (Jackknife) sob diferentes tratamentos avaliados: sequeiro (SEQ), gotejamento (GOT) e pivô (PIV). ..... 92
- Figura 17.** Heatmap de grupos taxonômicos presentes nas diferentes áreas onde foram obtidas amostras de solo rizosférico de pinhão-mansão em diferentes tratamentos. A composição microbiana foi avaliada para identificar a diferença na riqueza nas diferentes áreas. Grupos com abundância menor que 1% não foram considerados..... 92
- Figura 18.** Grupos bacterianos associados a rizosfera do pinhão-mansão que apresentaram diferença significativa de OTU's, observados entre os tratamentos avaliados: sequeiro (SEQ), gotejamento (GOT) e pivô (PIV). ..... 93
- Figura 19.** Figura representativa das suspensões bacterianas endofíticas. A) Controle: TSB sem inóculo bacteriano, B) Suspensão bacteriana em fase log de crescimento. .... 104
- Figura 20.** Figura representativa das sementes de milho (Variedade Al Bandeirante 2015-2015) mantidas nas suspensões bacterianas correspondentes aos até o momento da semeadura em casa de vegetação para teste de promoção de crescimento vegetal. .... 104
- Figura 20.** Figura representativa das sementes de milho (Variedade Al Bandeirante 2015-2015) mantidas nas suspensões bacterianas correspondentes aos até o momento da semeadura em casa de vegetação para teste de promoção de crescimento vegetal. .... 104
- Figura 21.** Figura representativa do ensaio de promoção de crescimento em plantas de milho na casa de vegetação instalada na Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. A) Plantio das sementes de milho em blocos inteiramente casualizados, B) Aplicação da solução nutritiva de Hoagland e Arnon, C) Experimento 20 dias após o plantio. .... 105
- Figura 22.** Figura representativa do ensaio de promoção de crescimento em plantas de milho colhidas aos 60 dias após germinação. A) A esquerda, planta inoculada com T2(EPM-4- *Klebsiella* sp.) e a direita, planta controle C (não inoculada + solução nutritiva completa ..... **Erro! Indicador não definido.**2
- Figura 23.** Figura representativa da avaliação in vitro da atividade antagônica de isolados bacterianos associados ao pinhão-mansão. A- Controle (*Lasiodiplodia subglobosa*). B- Isolado bacteriano endofítico *Bacillus* sp. (EPM55A) versus *Lasiodiplodia subglobosa* ..... 117 **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 24.** Figura representativa da avaliação in vitro da atividade antagônica de isolados bacterianos associados ao pinhão-mansão. A- Controle (*Lasiodiplodia euphorbicola*). B- Isolado rizobacteriano *Pseudomonas* sp. (RZ4PM8) versus *Lasiodiplodia euphorbicola*. ..... 117
- Figura 25.** Figura representativa da avaliação in vitro da atividade antagônica de isolados bacterianos associados ao pinhão-mansão. A- Controle (*Lasiodiplodia pseudotheobromae*). B- Isolado bacteriano endofítico *Bacillus* sp. (RZ4PM6) versus *Lasiodiplodia pseudotheobromae* ..... 117

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Identificação por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA dos isolados rizobacterianos associados ao pinhão-manso. .... 63
- Tabela 2.** Mecanismos de promoção de crescimento vegetal in vitro analisados para os isolados de rizobacterianos associadas ao pinhão-manso pertencentes ao tratamento 4. .... 66
- Tabela 3.** Avaliação das atividades enzimáticas dos isolados rizobacterianos associados ao pinhão-manso pertencentes ao tratamento 4. .... 78
- Tabela 4.** Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados bacterianos endofíticos do pinhão-manso (MACHADO, 2015). .... 103
- Tabela 5.** Variáveis da Altura da parte aérea e Diâmetro da planta analisadas em milho 30 e 60 dias após inoculação bacteriana dos tratamentos. Dados seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ..... 107
- Tabela 6.** Variáveis do Peso seco da parte aérea e Peso seco do sistema radicular analisadas em milho 60 dias após inoculação dos tratamentos. Dados seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) ..... 107
- Tabela 7.** Agrupamento estatístico do índice de redução do fitopatógeno *Lasiodiplodia subglobosa* pelas bactérias endofíticas e rizosféricas associadas ao pinhão-manso. .... 118
- Tabela 8.** Agrupamento estatístico do índice de redução do fitopatógeno *Lasiodiplodia euphorbicola* pelas bactérias endofíticas e rizosféricas associadas ao pinhão-manso. .... 11 **Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 9.** Agrupamento estatístico do índice de redução do fitopatógeno *Lasiodiplodia euphorbicola* pelas bactérias endofíticas e rizosféricas associadas ao pinhão-manso. .... 120

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO .....	16
CAPÍTULO 1 .....	17
REVISÃO DE LITERATURA .....	17
DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO PINHÃO-MANSO ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	17
1 Introdução .....	18
1.1 Aspectos gerais da cultura do pinhão-manso.....	18
1.1.1 Origem e distribuição geográfica .....	18
1.1.2 Características botânicas .....	19
1.1.3 Aspectos fitossanitários.....	19
1.1.4 Potencial biotecnológico da cultura do pinhão-manso .....	22
1.2 Microrganismos associados às plantas promotores de crescimento vegetal .....	25
1.2.1 Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP).....	26
1.2.2 Bactérias endofíticas .....	28
1.3 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias promotoras de crescimento vegetal .	31
1.3.1 Fixação biológica de nitrogênio.....	32
1.3.2 Produção de ácido indol acético (AIA) .....	33
1.3.3 Solubilização de fosfato .....	34
1.3.4 Controle Biológico de fungos fitopatógenos por bactérias associadas as plantas .....	36
1.4 Produção de enzimas microbianas .....	38
1.5 Análise da diversidade genética de bactérias associadas às plantas .....	41
CAPÍTULO 2.....	44
ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E AGRÍCOLA DE RIZOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS ASSOCIADA AO PINHÃO-MANSO ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	44
Resumo.....	45
Abstract.....	46
2 Introdução .....	47
2.1 Objetivos .....	49
2.1.1 Objetivo geral .....	49
2.1.2 Objetivos específicos.....	49
2.2 Materiais e Métodos.....	49
2.2.1 Amostragem do solo rizosférico e isolamento de rizobactérias .....	49
2.2.2 Obtenção, purificação e armazenamento dos isolados de rizobactérias.....	51
2.2.3 Seleção de rizobactérias com potencial agrícola e biotecnológico.....	52
2.2.3.1 Ensaio de promoção de crescimento vegetal <i>in vitro</i> .....	52
2.2.3.1.1 Fixação biológica de nitrogênio (FBN) .....	52
2.2.3.1.2 Produção de ácido indol acético (AIA).....	53
2.2.3.1.3 Solubilização de fosfato inorgânico .....	54
2.2.3.1.4 Atividade antagonica contra fungos fitopatogênicos .....	54

2.2.3.1.4.1 Técnica de pareamento direto <i>in vitro</i> .....	55
2.2.4 Produção de enzimas bacterianas .....	56
2.2.4.2 Atividade celulolítica .....	57
2.2.4.3 Atividade lipolítica e esterolítica .....	57
2.2.4.4 Atividade pectinolítica .....	57
2.2.4.5 Atividade proteolítica.....	58
2.3 Identificação molecular das rizobacterias.....	58
2.3.1 Extração de DNA dos isolados bacterianos .....	58
2.3.2 Amplificação do gene 16S rDNA pela reação de PCR.....	58
2.3.3 Purificação do DNA, sequenciamento da região 16S rDNA e análise das sequências .....	59
2.3.4 Edição e análise das sequências 16S rDNA.....	59
2.4 Resultados e Discussão .....	60
2.4.1 Isolamento de rizobactérias associadas ao pinhão-manso.....	60
2.4.3 Seleção de rizobactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal .....	65
2.4.3.1 Fixação biológica de nitrogênio .....	65
2.4.3.2 Produção de ácido indol acético.....	68
2.4.3.3 Solubilização de fosfato .....	70
2.4.4 Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos .....	72
2.4.5 Produção enzimática .....	75
2.5 Conclusão.....	79
CAPÍTULO 3.....	81
ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA RIZOSFÉRICA ASSOCIADA AO PINHÃO-MANSO POR METAGENÔMICA.....	81
Resumo .....	82
Abstract.....	83
3 Introdução.....	84
3.1 Objetivos .....	85
3.1.1 Objetivo geral .....	85
3.2 Material e Métodos .....	86
3.2.1 Coleta das amostras de solo rizosférico.....	86
3.2.2 Extração do DNA, normalização das amostras e preparo dos <i>pools</i> .....	86
3.2.3 Amplificação do DNA.....	87
3.1.1 Confeção das bibliotecas metagenômicas e sequenciamento.....	87
3.1.2 Análise dos dados de sequenciamento .....	88
3.3 Resultados e Discussão .....	88
3.3.1 Avaliação e análise de unidades taxonômicas operacionais (OTUs).....	88
3.3.2 Classificação taxonômica de OTUs .....	90
3.4 Conclusão.....	97
CAPÍTULO 4.....	98
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DA CULTURA DO MILHO	

( <i>Zea mays</i> L.) POR RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS À CULTURA DO PINHÃO-MANSO ( <i>Jatropha curcas</i> L.).....	98
Palavras-chave: Bioestimulante, bactérias endofíticas, promoção de crescimento, <i>Zea mays</i> L. ....	99
Abstract.....	100
4 Introdução.....	101
4.1 Objetivos.....	102
4.2 Materiais e métodos.....	102
4.2.1 Seleção de isolados bacterianos para o ensaio de promoção de crescimento vegetal em milho.....	102
4.2.2 Eficiência das bactérias endofíticas em promover o crescimento em milho.....	103
4.2.3 Colheita e variáveis determinadas.....	106
4.3 Resultados e Discussão.....	106
4.3.1 Eficiência de bactérias endofíticas em promover o crescimento em milho.....	106
4.4 Conclusão.....	110
CAPÍTULO 5.....	111
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E RIZOSFÉRICAS CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DO PINHÃO-MANSO.....	111
5.1 Objetivos.....	115
5.2 Materiais e métodos.....	115
5.2.1 Atividade antagônica de isolados bacterianos endofíticos contra fungos fitopatogênicos isolados da cultura do pinhão-manso.....	115
5.3 Resultados e Discussão.....	116
5.4 Conclusão.....	123
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124

## APRESENTAÇÃO

O capítulo 1- **Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana associada ao pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)** trata-se de uma Revisão de Literatura incluindo os principais conceitos e métodos envolvidos no estudo de bactérias endofíticas e rizosféricas associadas ao pinhão-manso; para a compreensão da diversidade genética bacteriana e caracterização do potencial biotecnológico.

O capítulo 2- **Isolamento e caracterização do potencial biotecnológico e agrícola de rizobactérias cultiváveis associada ao pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)** trata dos métodos utilizados para o isolamento, estudo de diversidade e avaliação do potencial biotecnológico de rizobactérias cultiváveis associada ao pinhão-manso na área irrigada por gotejamento com reposição de 75% da evapotranspiração da cultura.

O capítulo 3- **Análise da diversidade bacteriana rizosférica associada ao pinhão-manso por metagenômica** - traz o estudo da diversidade bacteriana da rizosfera associada ao pinhão-manso nas áreas de diferentes manejos de irrigação: Não irrigada (sequeiro), irrigadas por pivô e irrigadas com reposição de 75% da lâmina de água, por análise metagenômica.

O capítulo 4- **Avaliação do potencial de promoção de crescimento da cultura do milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do pinhão-manso** – trata-se da avaliação do potencial de bactérias endofíticas isoladas do pinhão-manso em promover crescimento vegetal da cultura milho em condições de casa de vegetação.

O capítulo 5- **Atividade antifúngica de bactérias endofíticas e rizosféricas contra fungos fitopatogênicos do pinhão-manso** - trata-se do potencial antagônico contra fungos fitopatogênicos isolados do pinhão-manso por bactérias associadas a essa cultura.



## **CAPÍTULO 1**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

#### **DIVERSIDADE E POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DA COMUNIDADE BACTERIANA ASSOCIADA AO PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

# 1 Introdução

## 1.1 Aspectos gerais da cultura do pinhão-manso

### 1.1.1 Origem e distribuição geográfica

O nome do gênero *Jatropha* deriva do grego "Jatrós" (doutor) e "trophe" (comida), devido às suas propriedades medicinais (KUMAR e SHARMA, 2008). Este gênero pertencente à família Euphorbiaceae, possui aproximadamente 175 espécies entre as quais a *Jatropha curcas* L. é considerada sua forma mais primitiva. Esta planta é originária da América Central e atualmente está distribuída em diversas áreas tropicais do mundo (HELLER 1996; KUMAR e TEWARI, 2015; MONIRUZZAMAN; YAAKOB; KHATUN, 2016).

No Brasil essa planta é popularmente conhecida no Brasil como pinhão-manso, pinhão do paraguaio, pinhão de purga, pinhão de cerca, purgante de cavalo, mandiguaçu, fogo do inferno. Outros nomes vernáculos desta planta são physic nut, purping nut, barbadus nut e nutmeg plant (Inglês), pourghère (Francês), purgeernoot (Holandês), purgiernuss (Alemão), fagiola d'India (Italiano), galamaluca (Moçambique), kadam (Nepal), yu-lu-tzu (Chinês), habel meluk (Árabe), pinoncillo (México), Tempate (América Central), kadam (Nepal), sabudam (Tailandês) (HELLER, 1996; BRITTAINE e LUTALADIO, 2010; KUMAR e TEWARI, 2015).

A distribuição geográfica do pinhão-manso é bastante vasta devido à sua rusticidade, resistência à seca, às pragas e doenças, se adaptáveis às adversidades de solo e de clima, sendo seu desenvolvimento favorecido por altas temperaturas e umidade, como também por solos mais férteis (CORTESÃO, 1956; PEIXOTO, 1973; ALVES et al., 2008). Apesar de ser pouco exigente a condições edafoclimáticas, para se obter uma alta produtividade é necessário que o pinhão-manso seja cultivado preferencialmente em solos profundos, bem estruturados, pouco compactados, drenados e pouco argilosos (ALVES et al., 2008; ACHTEN et al., 2010; BROUZOS, 2013).

O pinhão-manso vegeta espontaneamente em diversas regiões do país há muito tempo, desde o Nordeste até os Estados de São Paulo e Paraná, no entanto, somente na década de 70 foram iniciados estudos agrônômicos sobre esta cultura, embora se trate de uma planta ainda não domesticada (ROSADO et al., 2010; LAVIOLA et al., 2015).

### 1.1.2 Características botânicas

O pinhão-mansoso, por definição, é uma pequena árvore ou arbusto grande, de ciclo perene e crescimento rápido, podendo atingir mais de 5 metros de altura, dependendo das práticas de manejo. Seu sistema radicular é formado a partir das sementes e geralmente são constituídos por uma raiz central (raiz pivotante), quatro raízes periféricas e diversas raízes secundárias. Suas folhas são esparsas e brilhantes, largas e alternas, em forma de palma com três a cinco lóbulos e pecioladas, com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior, o tamanho e a forma das folhas pode variar de acordo com a variedade. Possui tronco com aproximadamente 0,20 cm de diâmetro, os tecidos vasculares dos caules e ramos contêm látex branco. Os ramos e caules são ocos e a madeira macia e pouco resistente é pouco valorizada. Os frutos são cápsulas, triloculares, e elipsoidais com 1,5 a 3,0 cm de diâmetro. Cada fruto possui, normalmente, três sementes revestidas por um tegumento preto e liso, que envolve uma amêndoa branca, rica em óleo, medindo em média 1,5 a 2,0 cm de comprimento e de 1 a 1,3 cm de largura. Seu teor de óleo varia entre 27 a 59 % e representa cerca de 53 a 79 % do peso do fruto (KUMAR, SRIVASTAVA e JHA, 2016).

O exocarpo mantém-se fresco até que as sementes amadureçam, passando de verde a amarelo e, finalmente, castanho-escuro. A maturação dos frutos de pinhão mansoso não é uniforme, podendo-se observar frutos maduros e imaturos na planta na mesma época (HELLER, 1996; DIAS et al., 2007; BRITTAINE e LUTALADIO, 2010; LAVIOLA et al., 2011).

A vida útil da planta *J. curcas* pode chegar a mais de 50 anos (HENNING, 2009). Devido à presença de várias substâncias tóxicas diferentes, incluindo uma lectina (curcina), ésteres de forbol, saponinas, fitatos e inibidores de protease, as sementes, a torta e o óleo de *J. curcas* não podem ser usados na alimentação humana ou animal (PRASAD et al., 2012).

### 1.1.3 Aspectos fitossanitários

Franco e Gabriel (2008) destacam a falta de dados científicos sobre as plantas daninhas e seu controle na cultura do pinhão mansoso, de acordo com estes autores, as principais plantas daninhas encontradas em cultivo comercial de pinhão-mansoso são: capim-colchão (*Digitaria sanguinalis*), grama seda (*Cynodon dactylon*), beldroega (*Portulaca oleracea*), falsa-serralha (*Emilia fosbergii*), nabiça (*Raphanus raphanistrum*), corda-de-viola (*Ipomoea triloba*), trapoeraba (*Commelina benghalensis*), erva-quente (*Spermacoce latifolia*) e guanxuma (*Sida*

*rhombofolia*). O controle de plantas invasoras é essencial, seja por meio de capinas manuais ou pelo uso de herbicidas e deve ser realizado sempre que necessário, principalmente em estádios iniciais de crescimento devido à competição e, posteriormente por ser abrigo de possíveis pragas e doenças (ARRUDA et al., 2004; SATURNINO et al., 2005; ACHTEN et al., 2010; BROUZOS, 2013).

Apesar de se tratar de uma planta rústica, o pinhão-mansó vem sofrendo ataques de diversas pragas e doenças, podendo ocasionar perdas na produção em condições de monocultivo extensivo (HEIFFIG-DEL AGUILA, 2009). O controle de pragas também é uma prática determinante para obter elevados níveis de produtividade.

As principais pragas da cultura do pinhão-mansó são: (1) Percevejo-do-pinhão-mansó (*Pachycoris torridus*), as ninfas e os adultos sugam os frutos imaturos causando chochamento das sementes (AVELAR et al., 2007, FRANCO e GABRIEL, 2008). (2) Trips (*Sternocoelus notaticeps*), os danos a esta cultura são ocasionados pelas larvas que se alimentam dos tecidos internos do caule e dos ramos, formando verdadeiras galerias no interior dos mesmos. A fase pupal se dá no interior dos tecidos e o inseto emerge para infestar novas plantas. (UNGARO e NETO, 2007; OLIVEIRA; FRIZZAS; DIANESE 2011). (3) Ácaro Branco (*Polyphagotarsonemus latus*), provoca a queda das folhas, a morte do ponteiro, podendo retardar o crescimento da planta e o surgimento de flores e frutos. As plantas atacadas apresentam redução do seu desenvolvimento, sendo seu ataque favorecido na época seca. (4) Ácaro vermelho (*Tetranychus urticae*) ocasiona manchas branco-acinzentadas e prateadas na face inferior das folhas; com a progressão do ataque, as folhas se tornam encarquilhadas, ocorrendo a queda prematura (FRANCO e GABRIEL, 2008; OLIVEIRA; FRIZZAS; DIANESE, 2011). (5) Cigarrinha verde (*Empoasca kraemeri*), ao sugar as plantas, injeta substâncias tóxicas presentes em sua saliva no sistema vascular das plantas do pinhão-mansó, podendo causar fitotoxicidade e abortamento de flores como consequência da ação da sucção da seiva da planta (OLIVEIRA et al., 2016), a cultura do pinhão-mansó, quando atacada severamente pela cigarrinha, pode ter sua produção seriamente comprometida, e as perdas podem ser superiores a 60 % (QUINTELA 2004). (6) Tripes (*Selenothrips rubrocinctu*), atacam as causando desfolha e definhamento de frutos e sementes (ALVES et al., 2008; FRANCO e GABRIEL, 2008). (7) Formigas “rapa-rapa” (*Acromyrmex* spp) e saúvas (*Atta sexdens rubropilosa*), são as que mais atacam o pinhão e atacam principalmente as mudas novas. As formigas “rapa-rapa” alimentam-se da casca da estaca ou da própria muda, por isso há ocorrência de muitas falhas no plantio, já as saúvas atacam com intensidade cortando as plantas novas. Estes insetos devem ser combatidos antes do plantio. (9) Cupins, estes insetos danificam

a casca das plantas na região do colo na parte basal do caule, causando o apodrecimento e levando a morte em qualquer idade da planta. Chegam a derrubar a planta. Atacam em linha e não as plantas de outras linhas (ALVES et al., 2008, FRANCO e GABRIEL, 2008). Outras pragas nocivas ao desenvolvimento do pinhão-manso, que são menos encontradas devido à presença do látex cáustico nas diversas partes da planta, tais como: *Corynorhynchus radula*, *Stiphra robusta*, *Retithrips syriacus*, *Sternocolaspis quatuordecim* e *Nezara viridula* (ALVES et al., 2008).

As doenças que acarretam prejuízos consideráveis em culturas economicamente importantes no País são ocasionadas por fungos fitopatogênicos. Aproximadamente 85% das doenças das plantas são causadas por fungos (PERNEZNY et al., 2014). As principais doenças ocasionadas por fungos fitopatogênicos que podem causar prejuízos à cultura de pinhão-manso são: (1) Oídio ou mofo-branco (*Oidium leucoconium*) responsável por formar uma cobertura branca nas folhas, caule, flores e frutos e, também, ocasionar a seca do broto terminal da muda. (2) Ferrugem (*Phakopsora jatrophiicola* e *P. arthuriana*), esses fungos causam a ferrugem nas folhas e podem provocar a desfolha das plantas. (3) Antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum* sp.), causam manchas foliares que podem evoluir para a queima completa das folhas. Os frutos também podem ser infectados, com lesões de coloração marrom-escura. (4) Mancha marrom de alternária (*Alternaria alternata*), provoca o tombamento de plântulas, manchas foliares e queda prematura de folhas, além disto, este fungo causa redução na germinação e do pinhão-manso. (5) Gomose (*Phytophthora* sp.). Esse fungo ataca a base do caule, com sintoma de podridão mole, que exsuda líquido de odor característico, e os tecidos afetados ficam escuros. Ocorre amarelecimento, murcha e queda de folhas, que pode evoluir para morte descendente de ramos. (6) Mancha de passarola (*Passalora ajrekari*), esta doença se manifesta na forma de lesões foliares arredondadas, de coloração creme a marrom-clara, com estreito halo marrom-escuro. (7) Seca-descendente (*Lasiodiplodia theobromae*), ocorre a seca das extremidades superiores dos ramos, podendo evoluir para o caule da planta e provocar a sua morte (FRANCO e GABRIEL, 2008).

No Brasil, o fungo *Lasiodiplodia theobromae* é associado à seca e a podridão da raiz de várias espécies (MACHADO et al., 2014). Este patógeno constitui-se em ameaça à cultura, cuja manifestação poderá induzir sérios danos, inclusive a morte de plantas, o que é agravado, no Brasil, pela ausência de fungicidas registrados para o controle desse patógeno em pinhão-manso (PEREIRA, 2009). Conforme Kimati et al., (2005); o fungo *L. theobromae* é do tipo oportunista, tornando-se prevalente sob situações de estresse do hospedeiro. Outros fungos fitopatogênicos foram encontrados nas sementes do pinhão-manso tais como: *Rhizoctonia*

*solani*, *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Paecylomices* sp., *Dactyella* sp. e *Penicillium* sp (UNGARO e NETO, 2007; KOBAYASTI et al 2011).

#### **1.1.4 Potencial biotecnológico da cultura do pinhão-mansó**

Durante a primeira metade do século XX o óleo de pinhão-mansó era um produto de exportação importante das Ilhas de Cabo Verde. Quantias consideráveis de sementes do pinhão-mansó foram produzidas em Cabo Verde neste período e isto constituiu uma contribuição importante para a economia do país. As primeiras aplicações comerciais de pinhão-mansó foram relatadas em Lisboa, onde o óleo desta planta importado de Cabo Verde foi utilizado na produção de sabão e lâmpadas (KUMAR e SHARMA, 2008).

Historicamente, o cultivo dessa oleaginosa vinha sendo utilizada para proteção do solo contra erosão, recuperação de áreas degradadas, na contenção de encostas e de dunas, ao longo de canais, rodovias, ferrovias e para estabelecimento de cercas vivas em propriedades rurais, já que os animais evitam toca-lo devido ao látex cáustico que escorre das folhas arrancadas ou feridas, outra vantagem do cultivo desta planta, é que pode ser feito em solos contaminados com elementos tóxico, degradados ou estéreis após correção com matéria orgânica (PEIXOTO, 1973; KUMAR e SHARMA, 2008; DURÃES et al., 2012).

O pinhão-mansó vem sendo estudada para diversas aplicações biotecnológicas, por exemplo, seu principal subproduto obtido a partir da extração do óleo, é a torta de sementes, constitui excelente adubo orgânico, rico em nitrogênio, fósforo e potássio, podendo ser utilizado como um adubo orgânico, além de possuir um efeito nematicida.

Outra estratégia que tem sido abordada é a genética, pela exploração da variabilidade genética para ausência de ésteres de forbol nos grãos provenientes do México (LAVIOLA et al., 2015). Esses resíduos orgânicos também podem ser convertidos em biogás por meio de uma fermentação anaeróbia (KUMAR e SHARMA, 2008). A casca dos pinhões pode ser usada como carvão vegetal e matéria-prima para papel. A madeira do pinhão-mansó pode ser utilizada como material carburante de fornalhas, assim como as cascas dos frutos (HELLER, 1996; KUMAR e SHARMA 2008).

De acordo com Devappa et al., (2012); o óleo extraído das sementes do pinhão-mansó apresenta potencial como um agente de biocontrole contra a Lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*). Esse inseto- praga é uma espécie polífaga, que ataca as culturas do milho, algodão, arroz, milheto, sorgo, soja entre outras (OMOTO et al., 2013).

Todas as partes do pinhão-mansó (sementes, folhas e casca) têm sido utilizados para

fins medicinais por um longo tempo, incluindo a sua utilização como um anti-séptico durante o parto e para o tratamento de doenças de pele e sexualmente transmissíveis (DST) (HELLER, 1996; NAMULI et al., 2011). Depois de disseminada pela África e Ásia pelos portugueses, no começo do século XIX, a planta foi utilizada com fins medicinais em alguns países, para aumentar a ação purgativa do óleo de rícino, com o qual era misturado (ROCHA, 2011).

Os frutos, folhas, cascas e látex contêm taninos, esteroides, fitoesteróis, glicosídeos, flavonoides e sapogeninas que exibem amplas propriedades medicinais. Os produtos vegetais também demonstram atividades antimicrobianas (KUMAR; SRIVASTAVA; JHA, 2016)

O látex possui efeito cicatrizante, hemostático e também purgante, além de propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Candida albicans* (THOMAS, 1989; THOMAS; SAH; SHARMA, 2008). As raízes são consideradas diuréticas, antileucêmicas, além de seu efeito antiofídico. As folhas são utilizadas no tratamento de doenças de pele, reumatismo e doenças sexualmente transmissíveis. A solução obtida após a decocção de folhas é usada contra tosse e como um anti-séptico em partos. Os efeitos anti-inflamatórios dos extratos das folhas, também têm sido relatadas na literatura (OSKOEIAN et al., 2011; KUMAR; SRIVASTAVA; JHA, 2016).

O óleo tem um efeito purgativo forte e também é amplamente utilizado para doenças de pele e para aliviar a dor, tais como as causadas por reumatismo (HELLER, 1996). As sementes são utilizadas como purgativo, verificando-se casos de intoxicação em crianças e adultos quando as ingere em excesso, o que pode ser perigoso e até fatal. A ingestão de uma única semente fresca pode causar tanto vômito e diarreia (PEIXOTO, 1973). Uma possível atividade antitumoral também tem sido investigada, uma proteína denominada de curcina, purificada das sementes de *J. curcas*, pode ser utilizada como agente de destruição celular (OSKOEIAN et al., 2011; KUMAR; SRIVASTAVA; JHA, 2016).

No entanto, o uso mais difundido na atualidade é do óleo extraído da semente que se destaca como alternativa na produção de biodiesel (ARRUDA et al. 2004, KUMAR; SRIVASTAVA; JHA 2016). O interesse comercial no Brasil, ocorreu devido as características desejáveis desta cultura, como uma opção para a renovação da base energética brasileira, por se tratar de uma cultura com amplo potencial agrícola, destacando-se pelo alto rendimento de grãos, superior às oleaginosas tradicionais, qualidade satisfatória e características físico-químicas de óleo favoráveis a produção de biodiesel bem como o favorecimento da agricultura familiar (FRANCIS et al., 2005; DURÃES et al., 2012).

Com a iniciativa do Programa Brasileiro de Biodiesel, a nova orientação da agricultura energética é no sentido de produzir matérias primas para o biodiesel, ou seja, os óleos vegetais,

além do álcool (ACCARINI, 2006). O biodiesel é um combustível obtido a partir de óleos vegetais ou gordura animal, os quais são submetidos a uma reação química, na presença de um catalisador e um álcool (GERPEN; KNOTHE, 2004). É uma alternativa viável para substituir o diesel derivado de petróleo, em qualquer motor de ciclo diesel, com pouca ou nenhuma necessidade de adaptação, possui alta lubrificidade além de ser um combustível de queima limpa (TSANAKTSIDIS, 2016).

Os óleos vegetais destacam-se pelo fato de não possuírem enxofre, produzindo combustíveis menos agressivos ao meio ambiente. O biodiesel emite aproximadamente 4 vezes menos gases de efeito estufa do que o diesel convencional (MÓRRÍGAN, 2010). Por ser biodegradável, não tóxico e praticamente livre de enxofre e aromáticos, é considerado um combustível ecológico (BIODIESELBR, 2013). Quando comparado ao óleo diesel derivado de petróleo, o biodiesel pode reduzir em 78% as emissões de gás carbônico, considerando-se a reabsorção pelas plantas (ACCARINI, 2006). Além disso, pode reduzir em 90% as emissões de fumaça e praticamente elimina as emissões de óxido de enxofre (SOUSA, 2006).

Dentre as principais culturas agrícolas com potencial para produção de biodiesel, encontra-se o pinhão-manso, uma oleaginosa promissora como matéria-prima para a obtenção de óleo destinado à produção de biodiesel (DURÃES e LAVIOLA, 2010). De acordo com Purcino e Drummond (1986) e Carnielli (2003), esta planta é uma excelente produtora de óleo com todas as qualidades necessárias para ser transformado em óleo diesel. Além desta aptidão para produção de biodiesel, o pinhão-manso, por ser perene, é uma planta de fácil cultivo, com baixos custos de produção e possível de ser cultivada economicamente em quase todas as regiões brasileiras. Em avaliações de campo tem se relatado a produtividade de alguns genótipos atingindo aproximadamente 5t. ha<sup>-1</sup>, com a cultura estabelecida e em condições favoráveis, ou seja, com disponibilidade de água e nutrientes, e cerca de 32% deste valor pode ser convertido em óleo vegetal (aproximadamente 1600L. ha<sup>-1</sup>), o que corresponde a três vezes a produtividade de óleo da soja (LAVIOLA et al., 2015). Comparativamente, no caso da mamona (*Ricinus communis*), a produtividade média de 1,5t. ha<sup>-1</sup>, podendo, aproximadamente 48% desse total ser convertido em óleo (aproximadamente 720L. ha<sup>-1</sup>), embora o teor de óleo da mamona seja maior (aproximadamente 16% a mais), a produtividade do pinhão-manso, nestas condições, é de quatro a cinco vezes superiores, em toneladas por hectare, que a mamona, tornando esta cultura competitiva economicamente frente às outras oleaginosas (MIRAGAYA, 2005).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa nº 4, de 14 de janeiro de 2008, autorizou a inscrição, no Registro Nacional de



Cultivares, da espécie *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão), possibilitando sua exploração comercial no Brasil (ROSCOE, 2008).

Contudo são necessários mais estudos sobre essa cultura, baseando-se na expectativa de que a planta possua alta produtividade de óleo, tenha baixo custo de produção, seja perene, e resistente ao estresse hídrico; porém, a pesquisa da cultura do pinhão-mansão ainda é recente no Brasil (SATURNINO et al., 2005). Embora o cultivo da planta apresentar vantagens aparentes, o pinhão-mansão não tem sinalizado resultado expressivo nos lugares aonde vem sendo cultivado (CASTRO; DEVIDE; ANACLETO, 2008; ALTENBURG et al., 2009). Esta cultura foi apontada prematuramente pelo setor privado como opção de matéria-prima para produção de biodiesel, o que resultou em frustrações por falta de conhecimento para o cultivo da planta (cultivares e sistema de produção). Ainda existem diversos desafios relacionados ao sistema de produção que devem ser superados pela pesquisa para que o cultivo seja economicamente viável (LAVIOLA et al., 2015).

Diversas pesquisas direcionadas a adaptações climáticas, produtividade e variabilidade genética têm sido desenvolvidas em diversas regiões do Brasil para validar sistemas de produção para pinhão-mansão. As ações são embasadas em conhecimentos básicos de ecofisiologia e da fenologia/ para melhor adequar os diferentes ambientes às necessidades de cultivo do pinhão-mansão (LAVIOLA et al., 2015). No entanto ainda existem poucos estudos sobre a microbiota associada a esta espécie, bem como suas interações com o hospedeiro (COSTA, 2012; JHA; ANNAPURNA; SARAF, 2012; SCHMIDT, 2012; MADHAIYAN et al., 2012; MADHAIYAN et al., 2013; MACHADO, 2016; MOHANTY; DUBEY; KOLLAH 2017,).

## **1.2 Microrganismos associados às plantas promotores de crescimento vegetal**

Os microrganismos podem interagir de diferentes formas com as plantas, funcionando coletivamente como um microbioma. Podem colonizar todos os tecidos internos das plantas, a superfície das folhas (filosfera) e os três compartimentos da raiz separadamente: rizosfera, rizoplano e endosfera. As interações planta-microrganismo, podem ser classificadas de acordo com seus efeitos sobre o crescimento vegetal: benéficas, neutras ou prejudiciais à planta hospedeira (GRAY e SMITH, 2005; KHARE; MISHRA; ARORA, 2018).

O efeito da interação planta-microrganismo pode ser benéfico para a planta hospedeira, auxiliando no seu desenvolvimento, ou tornar-se prejudicial quando o microrganismo parasita a planta levando à diminuição do seu crescimento ou à morte. Em ambos os casos, mostra-se

importante o estudo dos grupos microbianos que se associam com as plantas visando compreender esta interação para estimular aqueles que auxiliam no desenvolvimento vegetal, bem como estabelecer formas de controle dos fitopatógenos (MENDES et al., 2013). O papel benéfico da comunidade microbiana na promoção do crescimento das plantas pode ocorrer de inúmeras formas, por exemplo, atuando na mobilização e transporte de nutrientes para a planta pela fixação de nitrogênio, aumento da biodisponibilidade de minerais como solubilização/mineralização de fósforo, aumento da área de absorção das raízes, produção de fitormônios, tais como ácido indolacético (AIA) e citocinas, que estimulam o desenvolvimento vegetal e proteção das plantas contra patógenos (BATISTA; QUECINE-VERDI; LACAVA, 2018). As plantas, por sua vez, podem disponibilizar para esses microorganismos carbono e aminoácidos que atuam na nutrição microbiana, metabólitos secundários, como alguns flavonoides específicos (GOMES et al., 2016).

O conhecimento e a manipulação do microbioma das plantas podem configurar um recurso biotecnológico alinhado aos interesses de diminuição dos custos de produção e aumento da sustentabilidade na agricultura, como por exemplo, a inoculação de microrganismos com capacidade de promover o crescimento vegetal ou microrganismos que atuam como agentes de controle biológico de pragas e doenças (LACAVA e AZEVEDO, 2013, 2014; LACAVA, MELO, PEREIRA, 2018;).

### **1.2.1 Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCP)**

O termo "rizosfera" foi conceituado pelo fitopatologista alemão Lorenz Hiltner em 1904. Hiltner ficou convencido de que exsudados liberados das raízes de diferentes plantas sustentam o desenvolvimento de diferentes comunidades microbianas. Sua definição da "rizosfera" no ano de 1904 centrou-se na ideia de que a nutrição das plantas é consideravelmente influenciada pela composição microbiana da rizosfera (BAKKER et al, 2013). Por definição, a rizosfera é a zona de contato entre o solo e as raízes das plantas, sendo um importante nicho microbiológico, que podem ser encontrados fungos, bactérias, nematoides, protozoários, algas, vírus, artrópodes e archaea. Esta zona representa uma região rica em nutrientes devido a liberação de exsudados e outros compostos das raízes para o solo, influenciando na diversidade das comunidades microbianas na rizosfera (GOUDA et al., 2018; PRASAD et al., 2017).

Além de fornecer o suporte mecânico e facilitar a absorção de água e nutrientes, as raízes das plantas também sintetizam, acumulam e segregam uma diversidade de compostos, que são utilizados pelos microrganismos a fim de se multiplicarem, colonizando o ambiente, tal

processo é conhecido como rizodeposição (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016). Esses microrganismos também podem oferecer substâncias de interesse da planta, essa relação benéfica propicia uma alta densidade de microrganismos ao redor das raízes. (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAR-KERS, 2013). A rizodeposição de vários exsudatos modifica as propriedades químicas e físicas do solo, favorecendo a abundância e atividade rizosférica, formando um habitat microbiano do solo mais ativo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; HEMAD e KIBRET, 2014).

A composição da comunidade microbiana que coloniza a rizosfera é influenciada principalmente pelas espécies e pelo estágio de desenvolvimento das plantas, bem como pela estrutura do solo (LATOURE et al., 1996; BROECKLING et al., 2008). Dentre os microrganismos localizados na rizosfera, as bactérias são as que possuem maior abundância, ocupando aproximadamente cerca de 7 a 15% da superfície total das raízes (GRAY e SMITH, 2005).

A rizosfera é um ambiente altamente competitivo para que os microrganismos ocupem espaços e obtenham nutrientes (RAAIJMAKERS et al., 2002). Portanto, esses organismos, potencialmente benéficos ou patogênicos, que são altamente competitivos na colonização de tecidos vegetais e na obtenção de nutrientes, irão colonizar este microambiente e, possivelmente, ter um efeito no crescimento e desenvolvimento das plantas (HAAS e KEEL, 2003).

Das diversas rizobactérias existentes, destacam-se as denominadas Rizobactérias Promotoras de Crescimento das Plantas (RPCP) ou “Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)”. Há diversas maneiras pelas quais essas bactérias podem favorecer o crescimento e desenvolvimento da planta, tais como, por meio da fixação biológica do nitrogênio atmosférico, síntese de sideróforos, produção de hormônios reguladores de crescimento vegetal e pela solubilização de fósforo (JAMES e BALDANI, 2012; QUECINE et al., 2012; LACAVALA e AZEVEDO, 2013; BATISTA; QUECINE-VERDI; LACAVALA, 2018). Além disso essas bactérias podem conferir resistência a diversos fitopatógenos por meio da competição de nutrientes, indução de resistência sistêmica, produção de compostos antimicrobianos ou por produção de enzimas e outros metabólicos que interferem no desenvolvimento dos patógenos (ARAÚJO et al., 2002; LACAVALA e AZEVEDO, 2014; LACAVALA e SOUSA, 2016; LACAVALA; MELO; PEREIRA, 2018). Esses microrganismos também apresentam enorme potencial como fonte de obtenção de várias enzimas com diferentes potencialidades de interesse na agricultura, indústria e medicina (ESPOSITO e AZEVEDO, 2004; VIJAYALAKSHMI et al., 2016; GOUDA et al., 2018).

Os primeiros estudos comprovando os efeitos benéficos das RPCP para a agricultura já haviam sido comprovados em 1958 na antiga União Soviética, quando foi observado um incremento de 10 a 20% na produtividade de algumas culturas, por meio da inoculação de bactérias não simbiotes (GRAÇAS et al., 2015).

Segundo Gray e Smith (2005), as RPCPs poderiam ser divididas dependendo do grau de proximidade com a raiz e a intimidade da associação, classificando-as como: iPGPR - bactérias que residem dentro das células das plantas, produzindo nódulos e estruturas especializadas na fixação de nitrogênio em leguminosas. As espécies pertencentes ao gênero *Rhizobium* são as mais estudadas deste grupo, mas existem outros gêneros bacterianos em solos que pertencem a essa categoria, tais como *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*, e ePGPR - bactérias que se desenvolvem extracelularmente nos tecidos das raízes de diversas plantas, não produzindo nódulos, mas com capacidade de promover o crescimento vegetal por meio da produção de sinais ou substâncias específicas. Podem ser incluídas nesta categoria as bactérias dos gêneros *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia* e etc. (BHATTACHARYYA E JHA, 2012).

O estudo da diversidade desses microrganismos que colonizam a rizosfera, pode contribuir para o avanço da agricultura sustentável por meio de práticas ecológicas de sustentação da fertilidade do solo, possibilitando a redução do uso de fertilizantes e defensivos químicos, os quais têm ocasionados diversos problemas ambientais nas últimas décadas e conseqüentemente reduzindo custos ao produtor (GRAÇAS et al., 2015). Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal vêm sendo isoladas, multiplicadas, formuladas e utilizadas como prática agrônômica rotineira em alguns países, incluindo o Brasil, favorecendo o desenvolvimento e a produtividade das plantas (GUPTA et al., 2015; KUMAR; KANWAR; PABBI, 2017; GOUDA et al., 2018).

### 1.2.2 Bactérias endofíticas

Originalmente o termo endófito (endo: dentro + fito: planta) foi descrito por De Bary, (1866), que propôs uma possível distinção entre os endofíticos e os patógenos de plantas. Essa comunidade endofítica é constituída principalmente por fungos e bactérias, ao contrário dos microrganismos patogênicos, não causa prejuízos à planta hospedeira (NETO; AZEVEDO; ARAÚJO, 2003).

Os microrganismos endofíticos foram definidos por Carroll (1986) como microrganismos assintomáticos vivendo dentro de plantas, enquanto Petrini (1991), os definiu como microrganismos que habitam os tecidos internos da planta pelo menos durante um período de seu ciclo de vida, sem causar nenhum dano aparente ao hospedeiro (AZEVEDO, 1998). Outra definição, proposta por Hallmann et al., (1997), sugere que endófitos podem ser considerados microrganismos que são isolados de tecidos vegetais desinfetados superficialmente ou do interior destes, e que aparentemente não causam danos às plantas hospedeiras.

Uma definição mais ampla foi proposta por Azevedo e Araújo (2007), os quais definem endófitos como sendo todo microrganismo, cultivado ou não, que coloniza o interior da planta hospedeira e que não causa danos aparentes e nem forma estruturas externas visíveis, incluindo os não cultivados que habitam o interior da planta hospedeira como endófitos. Mendes e Azevedo (2007) propuseram a redefinição deste termo “microrganismo endofítico”, considerando a definição anterior da mesma maneira como outros autores (HALLMANN et al 1997; AZEVEDO et al. 2000; AZEVEDO e ARAÚJO 2007) e, adicionalmente, dividindo os endófitos em dois tipos, sendo: tipo I, os que não produzem estruturas externas à planta; e tipo II, os que produzem estruturas externas à planta, como fungos micorrízicos e bactérias simbiontes fixadoras de nitrogênio (LACAVA e AZEVEDO, 2013). É necessário ressaltar que as distinções de endófitos, epífitos e patógenos tem função meramente didática, pois existe um gradiente que os separam, o que dificulta o estabelecimento de limites para discriminar cada categoria. O endófito pode viver por certo tempo como epífito e dentro da planta em certas condições de estresse, pode tornar-se patogênico, o microrganismo epifítico pode, eventualmente, entrar em uma planta e lá permanecer por um certo período, causando ou não danos à mesma. (AZEVEDO, 1999).

A presença de microrganismos endofíticos foi relatada em praticamente todas as plantas estudadas. Eles foram encontrados em plantas cultivadas em diferentes cenários ambientais, tais como: florestas, manguezais, pastagens, campos agrícolas, etc. (AZEVEDO, 2014). Estes microrganismos estão sendo isolados de flores, frutos, folhas, caules, raízes, e sementes de várias espécies vegetais (AZEVEDO, 1998; AZEVEDO e ARAÚJO 2007; LACAVA e AZEVEDO, 2013; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014; PRASAD e DAGAR; 2014). Sua penetração nos vegetais ocorre por meio de aberturas naturais ou ferimentos. A principal forma de penetração ocorre no sistema radicular; no entanto, podem entrar pela parte aérea das plantas, tais como flores, caules, cotilédones, estômatos, além de aberturas causadas por insetos e até por estruturas de fungos patogênicos (MELO; AZEVEDO, 1998). Podendo disseminar-se de

maneira sistêmica ou restrita em diversas partes da planta, colonizando os espaços inter e intracelulares de diferentes tecidos vegetais (HALLMANN et al., 1997).

Embora possa ocorrer variações dessas populações endofíticas de acordo com cada tipo de planta, as populações bacterianas são geralmente maiores em raízes e menores em caules e folhas. A densidade populacional de bactérias endofíticas encontradas nas plantas depende da espécie, genótipo e tecido da planta, o estágio de crescimento e especificidade das bactérias, diferenças na via de colonização; bem como a exclusão mútua de diferentes populações bacterianas. De acordo com Strobel e Daisy (2003), muitos fatores mudam a biologia endofítica, incluindo a estação, a idade da planta hospedeira, o ambiente e a localização (LACAVA e AZEVEDO, 2013).

No geral, as plantas possuem uma microbiota endofítica característica importante para sua sanidade e manutenção, e essas associações com seus hospedeiros podem ocorrer de forma simbiótica e/ou mutualística (AZEVEDO, 1999; AZEVEDO e ARAÚJO 2007; GUO et al., 2008). Dessa forma, as plantas fornecem nutrientes e proteção a esses microrganismos, que por sua vez, podem oferecer muitos benefícios às plantas, por meio de mecanismos diretos e indiretos, bem como atividades enzimáticas com potencial. O controle biológico de pragas e doenças potencial para a promoção de crescimento da planta, e produção de enzimas é relatado em diversos trabalhos (LACAVA e AZEVEDO, 2013; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014; LACAVA e AZEVEDO, 2014; CASTRO et al., 2014; CASTRO et al., 2018).

As bactérias endofíticas podem apresentar uma vantagem sobre as rizobactérias, uma vez que ao colonizar os tecidos vegetais estão sempre em contato com as células da planta e, portanto, pode exercer mais facilmente efeito benéfico (SANTOYO et al., 2016). Naturalmente, as rizobactérias também podem ter o potencial para entrar e colonizar as raízes das plantas. Este micro ecossistema tem sido amplamente conhecido como uma das fontes primárias para a colonização endofítica. De fato, a diversidade bacteriana endofítica pode ser considerada um subconjunto da rizosfera e/ ou população bacteriana associada a raiz (GERMIDA et al., 1998; SANTOYO et al, 2016; KANDEL; JOUBERT; DOTY, 2017;).

O conhecimento sobre a diversidade genética de bactérias endofíticas é essencial para a compreensão do seu papel na interação com a planta hospedeira, bem como para sua aplicação biotecnológica (ANDREOTE e SILVA, 2018).

### **1.3 Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por bactérias promotoras de crescimento vegetal**

Os mecanismos pelos quais as bactérias podem influenciar o crescimento das plantas diferem entre espécies e estirpes, pelo que tipicamente não existe um mecanismo único para promover o crescimento das plantas.

Estudos têm sido conduzidos em relação às habilidades de várias bactérias para promover o crescimento das plantas. A utilização de Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal (BPCV) é uma alternativa importante para substituir a utilização de produtos químicos na agricultura. Os mecanismos utilizados pelas BPCV para facilitar o crescimento das plantas são razoavelmente bem conhecidos e compreendidos (QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014; TORRE-RUIZ et al., 2016; BATISTA, QUECINE-VERDI, LACAVA, 2018). Conceitualmente, as BPCV podem afetar o crescimento da planta, direta ou indiretamente e algumas são capazes de apresentarem mais de um mecanismo (WHITE et al., 2019).

A promoção direta de crescimento por BPCV ocorre quando aumenta a disponibilização de nutrientes, tais como a fixação biológica do nitrogênio atmosférico, solubilização de fosfato e produção de sideróforos; ou na produção de compostos que funcionam como reguladores vegetais, como giberelinas, citocininas, etileno e aminoácidos (LACAVA e AZEVEDO 2014; SANTOYO et al., 2016). A promoção indireta do crescimento por BPCV ocorre pela supressão de microrganismos fitopatogênicos por meio da competição de nutrientes, indução de resistência sistêmica, produção de compostos antimicrobianos ou por produção de enzimas e outros metabólicos que interferem no desenvolvimento dos patógenos (ARAÚJO et al., 2002; LACAVA e AZEVEDO, 2014; LACAVA e SOUSA, 2016).

O estudo das interações, microrganismos-planta, possibilita a exploração do potencial biotecnológico e agrícola e industrial dessas bactérias, além de uma melhor elucidação da ecologia microbiana e ambiental (ANDREOTE e SILVA, 2018). A utilização de microrganismos com ação de biocontrole e/ou promoção de crescimento vem sendo apontada como alternativa viável para sistemas de produção agrícolas ecológica e economicamente sustentáveis (COMPANT et al., 2005; MORENO et al., 2019).

### 1.3.1 Fixação biológica de nitrogênio

O nitrogênio é o elemento mais abundante do planeta terra, em sua forma molecular ( $N_2$ ), constitui quatro quintos da atmosfera terrestre (NELSON; COX, 2002). O N é o elemento mineral mais demandado pelas plantas, desempenhando um papel em quase todos os processos metabólicos dos vegetais e essencial no desenvolvimento e produtividade das plantas. Este elemento é um componente responsável por várias reações além de fazer parte da constituição das bases nitrogenadas, aminoácidos e conseqüentemente das proteínas, estando presente também na molécula de clorofila e em outros pigmentos, demonstrando assim a sua importância na constituição de moléculas vitais para os organismos vivos (TAIZ e ZAIGER, 2009; RAIJ, 2011). O seu fornecimento em quantidades adequadas estimula o crescimento, regulariza o ciclo e aumenta a produtividade das plantas (CARVALHO et al., 2011).

Dentre as principais fontes de nitrogênio no solo para a planta estão os materiais orgânicos (de origem vegetal e animal), nos quais existe sob a forma de compostos orgânicos complexos, tais como proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e nucleotídeos, fertilizantes industriais, sais de amônio e nitrato trazidos da atmosfera pelas chuvas e fixação biológica de nitrogênio (TAIZ e ZEIGER, 2004; MUNEES e KIBRET, 2014).

Esse processo biológico responsável pela redução do nitrogênio molecular ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ) por meio de microrganismos fixadores de nitrogênio é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN), (EADY e POSTGATE, 1974; FRANCHE et al., 2009). Este processo ocorre devido a presença de um complexo enzimático denominada nitrogenase, presente em bactérias diazotróficas. A nitrogenase é um complexo dependente de molibdênio, consistindo de duas metalo-proteínas, a ferro-proteína (Fe-proteína ou dinitrogenase redutase) e a ferro-molibdênio-proteína (FeMo-proteína ou dinitrogenase). A Fe-proteína é a componente doadora de elétrons e ligadora de nucleotídeos, enquanto a FeMo-proteína contém o sítio redutor do substrato (BULEN e LECOMTE, 1972; MORGANTE, 2003). Deste modo, são incorporados íons  $H^+$  abundantes nas células das bactérias a esta amônia, ocorrendo à transformação em íons  $NH_4^+$ , que serão distribuídos para a planta e incorporados na forma de nitrogênio orgânico (JUNIOR; MENDES; HUNGRIA, 2018).

As bactérias fixadoras de nitrogênio podem ser classificadas de acordo com o modo de vida ou nutrição em: não simbióticas (vida livre, associativa e endófitas), contribuindo para o crescimento vegetativo sem a formação de estruturas diferenciadas tais como cianobactérias (*Anabaena*, *Nostoc*), *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Gluconoacetobacter diazotrophicus* e *Azocarus* etc., ou em simbiose, incluindo membros da família rhizobiaceae que formam



simbiose com plantas leguminosas formando estruturas especializadas denominadas nódulos e árvores não leguminosas (AHEMAD e KIBRET, 2013; JUNIOR; MENDES; HUNGRIA, 2018).

A FBN representa uma alternativa economicamente viável e ambientalmente sustentável diante dos fertilizantes químicos. A utilização dessas bactérias fixadoras de N pode representar uma grande estratégia para reduzir a dependência de fertilizantes nitrogenados sintéticos, e pode suprir parcialmente as necessidades de N requeridas por diversas culturas, reduzindo, dessa forma, o uso de fertilizantes nitrogenados com diminuição de custos para o produtor e a reduzir a poluição ambiental (AHEMAD e KIBRET, 2013; PURI; PADDA; CHANWAY, 2017; BATISTA et al., 2018).

### **1.3.2 Produção de ácido indol acético (AIA)**

Os hormônios vegetais (auxinas, citocininas, giberelinas etileno e ácido abscísico) são substâncias orgânicas que desempenham funções na regulação do crescimento em plantas (TAIZ e ZEIGER, 2009). Bactérias rizosféricas e endofíticas são capazes de produzir substâncias que regulam o crescimento e desenvolvimento das plantas. Essas bactérias que promovem o crescimento vegetal, produzem fitohormônios, como as auxinas, citocininas, giberelinas e etileno (GUPTA et al., 2015; BATISTA et al., 2018).

A síntese do fitohormônio auxina (ácido indol-3-acético/ácido indol acético / IAA) por bactérias é conhecida há muito tempo. As auxinas, do grego “crescer”, são uma classe de fitohormônios capazes de estimular o crescimento vegetal e podem ser sintetizados por plantas (TAIZ e ZAIGER, 2009), bactérias e fungos (LACAVA e AZEVEDO, 2013; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014). As bactérias endofíticas podem promover o crescimento das plantas e suprimir as doenças das plantas, muito provavelmente por meios semelhantes às rizobactérias promotoras do crescimento (KHARE; MISHRA; ARORA, 2018).

A principal auxina encontrada em baixas concentrações nas plantas é o ácido indol acético, conhecido pela sigla AIA. O principal efeito das auxinas é a capacidade de atuar na expansão e no alongamento celular, ajudando também na divisão celular em cultura de tecidos, principalmente no enraizamento. Entretanto, altas concentrações de hormônios podem causar a inibição da alongação celular afetando o desenvolvimento das raízes em algumas culturas (MAJDA e ROBERT, 2018).

Entre os reguladores de crescimento de plantas, o ácido indol acético (AIA) é a auxina natural mais comum encontrada em plantas, conhecido pela sigla AIA (SHARMA et al., 2003).

O AIA promove a proliferação e alongamento das raízes pela divisão e multiplicação celular e, consequentemente, facilitando a absorção de água e nutrientes do solo (TAIZ; ZEIGER, 2009).

A produção microbiana de ácido indol acético (AIA), é em muitos casos, dependente do aminoácido triptofano e realizada sob diversas vias biossintéticas (Patten e Glick et al., 1996). O L-triptofano (LTrp) é um precursor fisiológico para a produção de auxinas em diversas plantas e microrganismos, e que a enzima chamada ipdC (indol-3-piruvato descarboxilase) é a enzima-chave para a biossíntese destes hormônios (LEBUHN; HARTMANN, 1993; SPAEPEN e VANDERLEYDEN, 2011; GRAÇAS et al., 2015).

Relata-se que 80% dos microrganismos isolados da rizosfera de várias culturas possuem a capacidade de sintetizar e libertar auxinas como metabolitos secundários (PATTEN e GLICK, 1996). No entanto, a promoção do crescimento das plantas é frequentemente maior quando é induzida por endófitos em vez de por bactérias restritas à rizosfera e à superfície radicular (CHANWAY et al., 2000).

A habilidade de sintetizar auxinas é amplamente distribuída entre bactérias associadas com plantas (KOCHAR; UPADHYAY; SRIVASTAVA, 2011; LÓPEZVALDEZ et al., 2011; BATISTA, 2012; ETESAMI; ALIKHANI; HOSSEINI, 2015; BATISTA et al., 2018). Diversos gêneros de bactérias associadas às plantas produtoras de AIA e relacionadas ao estímulo de crescimento vegetal têm sido descritas pertencentes aos seguintes gêneros: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Kocuria*, *Gluconacetobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Xanthomonas* podendo promover o crescimento vegetal por meio da produção de fitormônios (QUECINE, BATISTA, LACAVA, 2014; LACAVA e AZEVEDO, 2013; CASTILLO et al., 2015; GOUDA et al., 2018).

### 1.3.3 Solubilização de fosfato

O Fósforo (P), desempenha um papel importante em praticamente todos os principais processos metabólicos das plantas, incluindo fotossíntese, transferência de energia, síntese de ácidos nucléicos, transdução de sinal, biossíntese macromolecular e respiração (GONÇALVES et al., 2000; REED; CLEVELAND; TOWNSEND, 2011). Este macronutriente é o mais usado na adubação, no Brasil, devido a sua forte interação com a fase sólida do solo, sendo essencial para o estabelecimento e desenvolvimento das plantas, pois melhora todo o sistema radicular e, consequentemente a parte aérea.

As plantas necessitam de um fornecimento constante de fosfato durante toda a sua vida.

No início do desenvolvimento as quantidades exigidas são pequenas, aumentando com o tempo, respondendo à limitação de fósforo estendendo as raízes secundárias, de modo a alcançar sítios mais distantes em busca do elemento (WILLIAMSON et al., 2001), ou exsudando ácidos orgânicos (RYAN et al., 2001). O P é abundantemente disponível em solos em ambas as formas orgânicas e inorgânicas. No entanto, as plantas são incapazes de utilizar o fosfato por que apenas uma pequena parte encontra-se disponível às plantas, cerca de 95-99% de fosfato nos solos está disponível na forma insolúvel. (KHAN et al., 2010, MUNEES e KIBRET, 2014). As plantas absorvem o P da solução do solo apenas em duas formas solúveis, os íons monobásicos ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) e dibásico  $\text{HPO}_4^{2-}$  (GLASS 1989; BHATTACHARYYA e JHA, 2012; GUPTA et al., 2015). Os teores de fósforo solúvel no solo são baixos, da ordem de 0,1 mg de P/L de solo, o que decorre da baixa solubilidade dos compostos e da alta capacidade de adsorção pelas partículas de solo. Com a ação do tempo e da temperatura o fósforo adsorvido passa da forma lábil para a não-lábil, havendo uma queda da eficiência relativa do fósforo aplicado (VAN RAIJ, 1991).

Para suprir deficiência de P nos solos, são realizadas aplicações frequentes de fertilizantes fosfatados em campos agrícolas. As plantas absorvem pequenas porções de fertilizantes fosfatados aplicados e o resto é rapidamente convertido em complexos insolúveis no solo (MCKENZIE e ROBERTS, 1990, AHEMAD e KIBRET, 2014). A aplicação regular de fertilizantes de fosfato é dispendiosa bem como ambientalmente indesejável, resultando na busca de alternativas ecologicamente seguras e economicamente viáveis para melhorar a produção agrícola em solos com teores de P baixos (LACAVA E AZEVEDO, 2013).

A utilização de processos biológicos está entre as possíveis medidas para evitar a deficiência nutricional das plantas, cuja maior reserva mineral ocorre nas rochas, ou na forma não disponível para as plantas (RODRIGUEZ e FRAGA, 1999; LACAVA e AZEVEDO, 2013; QUECINE et al., 2014).

Nesse sentido, a utilização de microrganismos solubilizadores de fosfato (MSF), se apresenta como uma alternativa viável ao uso de fertilizantes fosfatados químicos, fornecendo um melhor aproveitamento do fósforo já existente no solo (LACAVA e AZEVEDO 2013; MUNEES e KIBRET, 2014; QUECINE; BATISTA; LACAVA, 2014; BATISTA, QUECINE-VERDI, LACAVA, 2018). A solubilização do fósforo inorgânico ocorre como consequência da liberação de ácidos orgânicos que são sintetizados por diferentes gêneros bacterianos (ZAIDI et al., 2009). Por outro lado, a mineralização do fósforo orgânico ocorre por meio da síntese de uma variedade de diferentes enzimas fosfatases, catalisando a hidrólise de ésteres fosfóricos (GLICK, 2012). É importante ressaltar que a solubilização e mineralização de fosfato podem

coexistir na mesma estirpe bacteriana (TAO et al., 2008).

Devido ao potencial desses microrganismos, estudos vêm sendo realizados para avaliar a capacidade de solubilização de fosfato inorgânico. Entre os gêneros bacterianos isolados como endofíticos e/ou rizosféricos que apresentam esta capacidade, estão os gêneros *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Serratia* (VERMA; LADHA, 2001; GARG et al., 2001; BHATTACHARYYA e JHA, 2012; BATISTA, 2012, QUECINE; BATISTA; LACAVA; 2014; GUPTA et al., 2015).

#### **1.3.4 Controle Biológico de fungos fitopatógenos por bactérias associadas as plantas**

As doenças ocasionadas por fungos fitopatogênicos são um fator limitante na produção agrícola. A utilização de fungicidas é o principal meio de controle da doença, no entanto, a aplicação indiscriminada de agroquímicos nas últimas décadas, tem gerado sérios problemas ao meio ambiente como a contaminação de sistemas hídricos, eliminação de espécies úteis, como insetos controladores de pragas e microrganismos que estão desempenhando um importante papel no ambiente, controlando o crescimento e a multiplicação de outros microrganismos (incluindo microrganismos endófitos e rizosféricos) e o desenvolvimento de cepas de patógenos resistentes a antibióticos convencionais. (DAS; DEVI; YASMINE, 2015; LACAVA e AZEVEDO, 2014; LACAVA, MELO, PEREIRA, 2018).

A necessidade de reduzir o uso de agroquímicos na agricultura despertou o interesse de pesquisadores na utilização do controle natural e biológico de pragas e doenças que afetam plantas cultivadas (AZEVEDO et al. 2000; LACAVA e AZEVEDO, 2014; LACAVA, MELO, PEREIRA, 2018).

O controle biológico pode ser definido como uma técnica aplicada à redução da população de uma espécie-alvo que tem potencial de provocar danos econômico, além de ser recomendado para reduzir as populações insetos-pragas, e combater plantas daninhas, patógenos de plantas, nematoides, entre outros (MENDES e AZEVEDO, 1998 UZAIR et al., 2018).

Geralmente, o controle biológico por meio das bactérias promotoras de crescimento vegetal (endofíticas e rizosféricas) com potencial de biocontrole ocorre por meios de antibiose, competição por espaço e nutrientes, parasitismo, enzimas lácticas, e indução de resistência sistêmica (AHEMAD e KIBRET, 2014; LACAVA e AZEVEDO, 2014; MÉNDEZ-BRAVO et al., 2018). O biocontrole por antibiose é considerada um dos mecanismos mais eficazes e

estudadas nas últimas duas décadas.

A antibiose se dá por meio da produção de antibióticos por bactérias promotoras de crescimento vegetal com potencial antagonico, mas também se aplica a qualquer composto metabolizado capaz de matar, inibir o crescimento ou a reprodução de microrganismos fitopatogênicos: tais como a produção de enzimas que degradam a parede celular destes fitopatogênicos (GRIFFIN, 2014; GUPTA et al., 2015). O parasitismo é a interação entre dois organismos, onde um parasita o outro. Numa relação de parasitismo, o parasita normalmente deriva seus requerimentos nutricionais do hospedeiro. Essa relação é caracterizada por um longo período de contato, que pode ser físico ou metabólico (MELO, 1996; HASSEN et al., 2018).

Outro mecanismo muito importante no controle biológico de doenças ocorre por meio da indução de resistência sistêmica (IRS). As plantas possuem diversos mecanismos de defesa entre elas a IRS. De acordo com Bonaldo; Paschoali e Romeiro (2005), esses mecanismos de defesa aparentemente permanecem inativos ou latentes, sendo acionados e expressando-se após as plantas serem expostas a agentes de indução. A penetração ativa das BPCV induz a síntese de compostos que atuam sobre o patógeno impedindo o processo de infecção e/ou colonização, ou alterando a morfologia vegetal. Estas alterações morfológicas e fisiológicas podem incluir aumento da parede celular por deposição de lignina e glucanas e aumento da espessura da cutícula, bem como a síntese de fitoalexinas, dificultando a entrada do patógeno e o seu desenvolvimento na planta hospedeira (PIETERSE et al., 2014; AHMAD e KIBRET, 2014; ROMERA et al., 2019).

As rizobactérias que apresentam atividade antibiótica, naturalmente, devem apresentar uma capacidade seletiva eficiente quanto à sobrevivência na rizosfera. Desse modo, é de se esperar que nos chamados solos supressivos, bactérias tenham uma vantagem competitiva e, portanto, atuem na inibição dos patógenos causadores de doenças radiculares (MELO, 1998; BENAÏSSA, 2019). No entanto, a capacidade de sobreviver dentro do vegetal é uma vantagem para os microrganismos endofíticos, já que estes não estão expostos as adversidades ambientais e encontram pouca ou nenhuma competição, tornando-os candidatos a testes para controle biológico (AZEVEDO et al., 2000; ORAWAN; SOMCHIT; SAISAMORN, 2019).

Diferentes linhagens de bactérias promotoras de crescimento vegetal, pertencentes a diferentes filos do domínio Bactéria, apresentam atividade antagonista contra diferentes organismos fitopatogênicos, representando uma fonte importante e inexplorada de agentes para biocontrole e manejo integrado de doenças e pragas agrícolas (AZEVEDO e MELO, 1998; ASSUMPCÃO et al., 2009; LACAVA e AZEVEDO, 2014; GRAÇAS et al., 2015). Várias

espécies de *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Flavobacterium*, *Kluyvera*, *Microbacterium* e *Pseudomonas* foram relatadas como antagonistas de fungos fitopatogênicos podendo ser usadas em programas de controle biológico (QUECINE, BATISTA; LACAVA, 2014; LACAVA e AZEVEDO, 2014; GUPTA et al., 2015).

Estudos com o intuito de avaliar a atividade biológica de bactérias promotoras de crescimento vegetal, a fim de se obter novos compostos bioativos vêm sendo conduzidos e resultados muito promissores têm sido alcançados; principalmente com potencial para o biocontrole de microrganismos fitopatogênicos (LAVACA e AZEVEDO, 2013; LACAVA e AZEVEDO, 2014; AHMED e KIBRET, 2014; GRUPTA et al., 2015; SANDILYA et al. 2017; VURUKONDA; GIOVANARDI; STEFAN, 2018; CHU et al., 2019; HASHEM; TABASSUM; ABD-ALLAHD; 2019).

#### **1.4 Produção de enzimas microbianas**

As enzimas são grupos de substâncias orgânicas de natureza normalmente proteica (existem também enzimas constituídas de RNA, as ribozimas) e especializadas na catálise de reações biológicas que aceleram a velocidade de uma. Elas estão presentes em células animais, vegetais e microbianas, e são essenciais para os processos biológicos de todos os organismos vivos (BAILEY e OLLIS, 1986; TORTORA, 2012).

Estão presentes em vários processos industriais como combustíveis, fármacos, cervejaria, alimentos, ração animal, detergente, papel, indústria têxtil, entre outros. O mercado mundial de enzimas industriais representa 60% do mercado de enzimas. Os processos catalisados por enzimas apresentam grandes vantagens frente aos catalisadores químicos (atualmente muito utilizado nos processos industriais), são geralmente mais rápidos, eficientes e ambientalmente sustentáveis (MONTEIRO e SILVA, 2009). O setor industrial está em constante pressão para usar mais processos que beneficiem o meio ambiente e para procurar novos métodos para tornar os produtos mais competitivos. Consequentemente, as enzimas microbianas estão ganhando mercado, substituindo a catálise química convencional em muitos processos industriais (VERMELHO et al., 2013; AMBU et al., 2017).

Dentre as enzimas mais estudadas são aquelas de origem animal ou vegetal, no entanto, devido à alta capacidade de produção, baixo custo e susceptibilidade à manipulação genética e não estão sujeitas às limitações de produção ou de suprimento, os processos de produção enzimática geraram muito interesse biotecnológico (CASTRO et al., 2014). Na verdade, as enzimas de origem microbiana têm elevado interesse biotecnológico, como no processamento

de alimentos, fabricação de detergentes, têxteis e produtos farmacêuticos, terapia médica e biologia molecular (COSTA et al., 2018).

A importância de atividades produtivas sustentáveis tem sido amplamente reconhecida devido a necessidade da substituição de processos químicos baseados em fontes não renováveis por processos químicos ou bioquímicos que utilizem insumos renováveis. Reconhece-se também a necessidade da substituição das múltiplas etapas de processos químicos por processos biotecnológicos mais eficientes (BON et al., 2008, COSTA, 2014). O Brasil, hoje, é um país essencialmente importador de enzimas, além de apresentar um uso ainda reduzido de enzimas em processos industriais quando comparado com outros países. Assim, a inserção e consolidação do Brasil como produtor de tecnologia enzimática faz-se necessário. Este contexto favorece a utilização de matérias primas renováveis por tecnologias de biotransformação e biocatálise (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Estas tecnologias já estão sendo utilizadas por indústrias, existindo um interesse muito grande no desenvolvimento de novos processos; a sua implementação resulta em produtos de maior qualidade, obtidos por processos de menor consumo energético e de menor impacto ambiental (POLITZER e BOM, 2014).

Portanto, é necessário encontrar microrganismos que produzam enzimas para substratos específicos, com diferentes exigências na faixa de temperatura, pH e presença de diferenças, para diferentes processos de produção (FALCH, 1991). Microrganismos associados com as plantas são considerados um reservatório para novos metabolitos secundários, apresentando grande potencial para a exploração médica, industrial e agrícola, (STROBEL, 2003; LACAVA e AZEVEDO, 2013, GUPTA et al., 2015; COSTA et al., 2018).

Mais de 4000 enzimas são conhecidas e aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo a grande maioria de origem microbiana. Pelo menos 75% de todas as enzimas industrializadas são hidrolases e destas, 90% são produzidas por microrganismos por meio de processos fermentativos (MESSIAS et al., 2013). As principais atividades enzimáticas apresentadas pelos microrganismos são as amilases, celulasas, lipases, esterases, pectinases e proteases (MONTEIRO e SILVA, 2009; CASTRO, 2014; SILVA, 2015; COSTA et al., 2018).

Entre as amilases, as  $\alpha$ -amilases secretadas por bactérias são mais termoestáveis que as de origem fúngica. Entre as bacterianas, aquelas secretadas pelo gênero *Bacillus* são as mais termoestáveis, aumentando ainda mais a sua aplicabilidade industrial. As amilases, principalmente a  $\alpha$ -amilase, apresentam amplo espectro de aplicações industriais como na indústria de alimentos (xaropes utilizados como adoçantes em refrigerantes e panificação); têxtil, (utilizado na degradação do amido que é aplicado nos fios protegendo-os de danos

estruturais durante a tecelagem; papel, na remoção da camada de amido utilizada para proteção do mesmo contra danos mecânicos durante o processamento e também nas etapas de finalização da sua produção); detergentes, (na remoção de manchas amiláceas) (DELATORRE et al, 2010; CHOUBANE; CHEBA; BENOURRAD, 2016).

Celulases de origem microbiana são amplamente utilizadas nas indústrias de papel, vinho, ração animal e têxtil, bem como para produção de biocombustível, processamento de alimentos vegetais tais como suco de frutas, extração de óleo de oliva e carotenóides, além de manejo de efluentes (GUPTA et al., 2011). Os efluentes gerados em agroindústrias e campos de plantio contêm grande quantidade de celulose não utilizada, o que acaba gerando poluição ambiental caso o descarte não seja adequado. Atualmente, porém, estes rejeitos podem ser utilizados para produção de derivados com elevado valor agregado, como enzimas, açúcares, biocombustíveis e outros compostos químicos (GUPTA et al., 2011a; GUPTA et al., 2011b; KUHAD et al., 2010; LASA et al., 2019).

As lípases e esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e a hidrólise dos lipídeos. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também, em células de microrganismos (REED, 1975). As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, importantes grupos de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas (JAEGER e EGGERT, 2002). As principais aplicações envolvem a produção de detergentes, produção de laticínios, processamento de óleos, biotransformações, produtos farmacêuticos, produção de agroquímicos, pesticidas e inseticidas (JAEGER et al., 1997).

Pectinases são utilizadas na indústria têxtil com diversas atuações tais como degradar a camada de pectina que recobre as fibras de celulose, liberando-as para posterior processamento, tratar o resíduo líquido e a degomagem das fibras naturais, maceração das fibras vegetais, na biopreparação de algodão e, no polimento enzimático de tecidos mistos de juta e algodão. Em algodão cru, em condições adequadas substitui o uso da soda cáustica e gera produtos de alta qualidade para posterior tingimento e processo de tecelagem com menor consumo de energia (MONTEIRO e SILVA, 2009).

As proteínas podem ser degradadas por microrganismos, que utilizam os produtos dessa degradação como nutrientes para a sua manutenção. As proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas e participam em inúmeros processos fisiológicos. Dependendo da espécie ou cepas, os microrganismos produzem uma variedade de proteases (JISHA et al., 2013). As proteases originadas de microrganismos têm gerado maior interesse pelas indústrias, uma vez que, seu processamento pode ser realizado em grande escala no laboratório. Essas enzimas estão



envolvidas em várias aplicações nas indústrias de detergente e de alimentos. Com intuito de diminuir a quantidade de poluentes relacionados ao tratamento de couro, a utilização de proteases se apresenta como uma saída “ambiental” na substituição da utilização de compostos tóxicos e poluentes (RAO et al., 1998; CASTRO et al., 2019).

Vários trabalhos descrevem a capacidade de bactérias associadas as plantas com potencial biotecnológico para a produção de enzimas. Essas bactérias já foram isoladas de abacate (PRASAD e DAGAR, 2014); arroz (MEHDIPOUR-MOGHADDAM et al., 2010); dendê (DJAFAR; PURWADARIA; SINURAT, 2010); guaraná (TSUI, 2012; BONATELLI, 2012); jacarandá (CARRIM et al., 2006); manga (KANNAN; DAMODARAN; UMAMAHESWARI, 2015); mangue (CASTRO et al. 2014); morango (DIAS et al., 2009); plantas medicinais (JALGAONWALA e MAHAJAN, 2011; EL-DEEB; FAYEZ; GHERBAWY, 2013) pimenta (AMARESAN; JAYAKUMAR; THAJUDDIN, 2014); soja (ASSUMPÇÃO et al., 2009); tomate (MINOTTO et al., 2014); pinhão-manso (MACHADO, 2015); *Utricularia exoleta* (CHAUDHURI et al., 2017); carvalho (LASA et al., 2019); plantas halófitas.( MUKHTAR et al., 2019)

### **1.5 Análise da diversidade genética de bactérias associadas às plantas**

O solo é um dos ecossistemas microbianos mais ricos do planeta e geralmente conta com uma elevada diversidade de arqueias, bactérias e fungos. Essa diversidade microbiana é determinada por diversos fatores como o pH, umidade, conteúdo de carbono orgânico e relação C: N. A concentração de bactérias na rizosfera é aproximadamente de 10 a 1.000 vezes maior do que no solo não rizosférico (GOUDA et al., 2018).

A biodiversidade microbiana é distribuída em três domínios Bacteria. Archae e Eukarya. Os dois primeiras são exclusivamente compostos por grupos microbianos, o que indica que a real biodiversidade está alocada em células de microbianas, onipresentes nos mais diversos habitats, sendo responsáveis pelas mais diferenciadas transformações biogeoquímicas que regem nossa biosfera (SILVA e ANDREOTE, 2018).

A ecologia microbiana baseia-se no conhecimento da composição e da estrutura das comunidades microbianas como base para o entendimento dos seus papéis e das suas funções ecológicas (NELSON et al., 2014). Os microrganismos possuem uma enorme variabilidade genética que correu durante a sua evolução, o que lhes confere a capacidade de adaptação a diversos ambientes. Porém, algumas regiões do seu genoma foram mantidas conservadas,

permitindo seu estudo taxonômico por meio de técnicas moleculares (SEGHERS et al., 2003).

A diversidade genética e metabólica da microbiota do solo é imensa, constituindo fontes importantes de recursos genéticos para avanços biotecnológicos, como antibióticos, produtos químicos e polímeros com aplicação tecnológica. Portanto, a caracterização da microbiota cultivável e não cultivável do solo é de suma importância para o desenvolvimento da biotecnologia. O avanço das tecnologias de biologia molecular aplicada a estudos de diversidade tem permitido seu acesso mais abrangente e a melhor compreensão das interações das comunidades microbianas nos diferentes ambientes (ANDREOTE E SILVA, 2018).

O sequenciamento do gene 16S rRNA é, de longe, um dos métodos mais utilizados para estudar a filogenia bacteriana e a classificação de gênero/espécie, sendo considerado como cronômetro evolutivo (MARON et al., 2018). O gene 16S é largamente utilizado na identificação de bactérias ao nível de gênero e também ao nível de espécie, e ainda possibilita fazer correlações entre o genótipo e o ambiente estudado, utilizando sequenciamento de DNA, seja ele proveniente de isolados ou metagenoma (TSURUMARU et al., 2015; RASCOVAU et al., 2016). Este gene possui aproximadamente 1.500 pares de bases (pb) e apresenta 9 regiões conservadas intercaladas com regiões variáveis, onde o comprimento de cada região varia de organismo para organismo. Essa estrutura pode ser sequenciada utilizando métodos de Sanger ou Metagenoma (PEIXOTO, 2013).

Análises metagenômicas de amostras ambientais têm sido propostas por ser a mais acurada técnica para descrição de comunidades microbianas presentes em um habitat (MENDES et al., 2014). Dessa forma, a metagenoma elucida genomas de microrganismos incultiváveis com o objetivo de melhorar a compreensão a cerca da ecologia microbiana global e direcionar as pesquisas visando o aumento na descoberta de novas enzimas e biomoléculas (MENDES et al., 2014, MASHIANE et al., 2017).

O DNA total da comunidade microbiana do solo pode ser acessado utilizando-se da metagenoma, que é uma ferramenta crucial para conseguir explorar a ecologia e perfil metabólico do complexo ambiente das comunidades microbianas, bem como identificar novas biomoléculas pelo uso de bibliotecas construídas oriundas de ácidos nucléicos isolados (PEIXOTO, 2013; MENDES et al., 2014). Desde a clonagem e sequenciamento, o processo é relativamente rápido e considerado uma poderosa ferramenta para entendimento da dinâmica e diversidade das comunidades microbianas dos mais diversificados ambientes (CHÁVEZ-ROMERO et al., 2016; MARON et al., 2018).

Os métodos de análise molecular da comunidade microbiana contribuem para o entendimento da biodiversidade microbiana e nos permite caracterizar padrões espaciais e

temporais de diversidade, bem como respostas a mudanças nas condições ambientais, perturbações e tratamentos (GOMIERO; PIMENTEL; PAOLETTI, 2011; VALDERDE; GULLOÓN; MELLADO, 2016). Isto pode ter um papel fundamental em áreas de interesse agrônômico, o que torna crucial o acesso e a preservação da diversidade dos microrganismos do solo, por conterem um grande conjunto de genes desconhecidos que podem codificar novas enzimas e proteínas (RASCOVAU et al., 2016; LEITE et al., 2018; SARHAN et al., 2019).

## **CAPÍTULO 2**

### **ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO E AGRÍCOLA DE RIZOBACTÉRIAS CULTIVÁVEIS ASSOCIADA AO PINHÃO- MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

## Resumo

O interesse comercial do pinhão-manso no Brasil, ocorreu devido as características desejáveis desta cultura como uma opção para a renovação da base energética brasileira, sendo uma matéria-prima promissora para a obtenção de óleo destinado à produção de biodiesel. No entanto, o pinhão-manso ainda é uma planta semi-selvagem não domesticada e sua produção não tem sinalizado resultados expressivos nos lugares onde vem sendo cultivado. Estudos direcionados ao melhoramento genético e adaptações climáticas ainda estão em desenvolvimento. Nesse sentido, a utilização de microrganismos capazes de promover o crescimento vegetal se apresenta como uma alternativa sustentável na busca de elevar a produção de culturas agrícolas. Na interação planta-microrganismo, são encontradas bactérias atraídas por secreções e exsudatos das raízes e algumas dessas são denominadas de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal capazes de colonizar diversos tecidos das plantas e promover o crescimento vegetal; beneficiando o seu desenvolvimento por meio de mecanismos de promoção de crescimento direto, tais como fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção do ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfato inorgânico e indireto pelo biocontrole à fitopatógenos. Além disso, as rizobactérias são consideradas promissoras para a bioprospecção de enzimas de interesse comercial. O presente capítulo teve como objetivo, a caracterização bioquímica de sessenta e três rizobactérias, associadas à cultura do pinhão-manso, com potencial para promoção de crescimento vegetal, direto e indireto e a produção de enzimas. Desse total de isolados avaliados, 27% apresentaram resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio, 73% produziram AIA e 69% solubilizaram fosfato inorgânico. Em relação ao teste de antagonismo os isolados rizosféricos apresentaram atividade antagônica com potencial para biocontrole dos seguintes fungos fitopatogênico: *Alternaria alternata* (39%), *Colletotrichum* sp. (42%), *Fusarium oxysporum* (30%) e *F. proliferatum* (36%). Os testes de atividade enzimática *in vitro* revelaram que 30% das rizobactérias apresentaram atividade amilolítica, 19% celulolítica, 40% esterolítica, 26% lipolítica, 30% pectinolítica e 70% proteolítica. Dentre os 27 isolados bacterianos identificados por meio do sequenciamento parcial do gene 16S, foi observado a presença dos gêneros *Bacillus*; *Chryseobacterium*; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Pseudomonas*; *Serratia* e *Staphylococcus*.

**Palavras-chaves:** Bioprospecção, biocontrole, enzimas, promoção de crescimento, rizosfera.

## Abstract

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is a shrubby plant of perennial cycle, belonging to the family Euphorbiaceae, from Central America and currently vegetates spontaneously in diverse regions of the planet. The commercial interest in Brazil occurred due of the desirable characteristics of that crop as an agricultural option for renewal of the Brazilian energy base, being a promising raw material for biodiesel production. However, the physic nut is a semi-wild plant not domesticated and its production has not signalized significant results in places where it has been cultivated. Studies directed to genetic improvement and climate adaptations are under development. Therefore, a use of beneficial microorganisms capable of promoting plant growth presents a sustainable alternative in the quest to increase the production of agricultural crops. In the plant-microorganism interaction, it is found bacteria attracted by root secretions and exudates some of them are called of plant-growth-promoting rhizobacteria that are capable of colonizing various plant tissues and to promote vegetable *growth*; benefiting its development through direct growth promotion mechanisms, such as biological nitrogen fixation (BNF), Indole acetic acid (IAA) production, solubilization of inorganic phosphate and indirect by biocontrol to phytopathogens. Moreover, the rhizobacteria are considered promising for bioprospecting of enzymes with commercial interest. The present chapter aimed the biochemistry characterization of sixty-three rhizobacteria associated with the *J. curcas* plants, with potential for direct and indirect promoting plant growth and enzyme production. Of this total of tested isolates, 27% showed positive results for fixation of nitrogen, 73% produced IAA and 69% solubilized inorganic phosphate. In relation to the antagonism test, the rhizospheric isolates presented antagonistic activity with potential for biocontrol of the following phytopathogenic fungi: *Alternaria alternata* (39%), *Colletotrichum* sp. (42%), *Fusarium oxysporum* (30%) and *F. proliferatum* (36%). *In vitro* enzyme activity tests revealed that 30% rhizobacteria presented amylolytic activity, 19% cellulolytic, 40% sterolytic, 26% lipolytic, 30% pectinolytic and 70% proteolytic. Among the 27 bacterial isolates identified by partial sequencing of the 16S gene, the presence of genera *Bacillus*; *Chryseobacterium*; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Pseudomonas*; *Serratia* and *Staphylococcus* was observed.

**Keywords:** Bioprospection, biocontrol, enzymes, plant growth promoting, rhizosphere.

## 2 Introdução

A espécie *Jatropha curcas*, é uma planta perene e monóica, pertencente à família das Euforbiáceas. De acordo com Heller (1996), acredita-se que esta planta seja originária da América Central e atualmente está distribuída em todas as regiões tropicais do globo e conhecida por aproximadamente 200 nomes distintos e é descrita como originária da América do Sul e na América Central. Embora haja evidências indicando que de fato essa espécie não é originária do Brasil (ROSADO et al., 2010), essa planta vegeta espontaneamente em diversas regiões do país há muito tempo. No Brasil essa planta é popularmente conhecida como pinhão-manso.

Historicamente, o pinhão-manso tem sido utilizado na agricultura visando o controle de erosão do solo, recuperação de áreas degradadas, como cerca viva de propriedades rurais, na indústria seu óleo é utilizado na produção de sabão caseiro, em lamparinas e candeeiros e na medicina tradicional no combate a diversas doenças (LIMA et al., 2012; KUMAR; SRIVASTAVA; JHA, 2016). No entanto, somente na década de 70 que se iniciou os estudos agronômicos do pinhão-manso.

Atualmente esta cultura tem recebido especial atenção como uma alternativa para o fornecimento de óleo vegetal como matéria-prima para fabricação do biodiesel, devido ao potencial biotecnológico de suas sementes. O Brasil apresenta características favoráveis para o cultivo do pinhão-manso, no entanto, a sua produção não tem sinalizado resultados expressivos nos lugares onde vem sendo cultivado, resultando em frustrações por falta de conhecimento para o cultivo da planta (cultivares e sistema de produção). Ainda existem diversos desafios relacionados ao sistema de produção que devem ser superados pela pesquisa para que o cultivo a sua produção não tem sinalizado resultados expressivos nos lugares onde vem sendo cultivado, resultando em frustrações por falta de conhecimento para o cultivo da planta (cultivares e sistema de produção). Ainda existem diversos desafios seja economicamente viável. (CASTRO; DEVIDE; ANACLETO, 2008; ALTENBURG et al., 2009; LAVIOLA et al., 2015). Diversas pesquisas estão sendo realizadas para estabelecer essa cultura no País, tais como adaptações climáticas, produtividade e variabilidade genética, no entanto, por ser uma cultura de ciclo perene, é necessário um longo período para alcançar os resultados esperados (LAVIOLA et al., 2015). Uma alternativa que pode contribuir com as pesquisas direcionadas ao aumento da produtividade e estabelecimento desta cultura, seria a exploração de sua microbiota.

A utilização de microrganismos capazes de promover o crescimento vegetal se apresenta

como uma alternativa sustentável na busca de promover o aumento da produção de culturas agrícolas (LUZ et al., 2006). Na interação planta-microrganismo, são encontradas bactérias atraídas por secreções das raízes que favorecem a abundância e a atividade na rizosfera. Algumas dessas bactérias são capazes de promover o crescimento vegetal, sendo denominadas de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV) (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAR-KERS, 2013). Esses microrganismos podem promover o crescimento da planta de maneira direta ou indireta. A promoção direta de crescimento vegetal por essas bactérias envolve o aumento da disponibilização de nutrientes, que pode ocorrer por meio da fixação biológica de nitrogênio, já que são capazes de assimilar o  $N_2$  atmosférico e convertê-lo à forma assimilável ( $NH_3$ ) num processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN), solubilização de fosfato mineral e o fornecimento de substâncias como reguladores do crescimento de plantas como ácido indol acético (AIA) (GLICK, 2014; AHMAD e KIBRET, 2014). A promoção indireta do crescimento por esse grupo de bactérias ocorre pela supressão de microrganismos patogênicos na rizosfera e nos tecidos internos da planta por meio de antibiose, competição por espaço e nutrientes, parasitismo e de indução de resistência sistêmica (VEGA, 2007; PAUL e LADE, 2014).

Tais microrganismos também apresentam grande potencial como fonte de obtenção de várias enzimas com diferentes potencialidades de interesse na agricultura, indústria e medicina (NINGTHOUJAM e SHOVARANI, 2008; GEETHA et al., 2014; GHODSALAVI et al., 2013; PATIL; SEBALE; DEVALE, 2015; FIGUEROA-LÓPEZ et al., 2016). A produção de enzimas é fundamental para a indústria biotecnológica atual. As enzimas podem ser obtidas a de diversas fontes; sendo as de origem microbiana a principal fonte de obtenção, devido ao rápido crescimento dos microrganismos e facilidade de manipulação genética (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Nesse sentido, é crescente o interesse no estudo de microrganismos associados às plantas com a finalidade de avaliar e explorar essa diversidade existente em determinado nichos com o objetivo de buscar recursos genéticos e bioquímicos para fins agrícolas e biotecnológicos (GRAÇAS et al., 2015). Tendo em vista o potencial econômico da cultura do pinhão-mansão, o presente trabalho visou caracterização da comunidade bacteriana presente na rizosfera do pinhão-mansão com potencial de promoção de crescimento vegetal e produção de enzimas de interesse biotecnológico.



## 2.1 Objetivos

### 2.1.1 Objetivo geral

Isolar e a caracterizar bactérias rizosféricas associadas à cultura do pinhão-mansão com potencial biotecnológico para promoção de crescimento vegetal e produção de enzimas. Para isso, os objetivos específicos foram:

### 2.1.2 Objetivos específicos

- a) Isolar a comunidade bacteriana cultivável associada a rizosfera do pinhão-mansão;
- b) Avaliar *in vitro* o potencial para fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de ácido indol acético pelos isolados bacterianos obtidos;
- c) Avaliar *in vitro* a produção das enzimas celulase, amilase, protease, lipase e esterase pelos isolados rizosféricos;

## 2.2 Materiais e Métodos

### 2.2.1 Amostragem do solo rizosférico e isolamento de rizobactérias

A coleta de solo rizosférico de Pinhão-mansão, foi realizada no mês de maio/2016 na Fazenda Areão da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), em Piracicaba, SP (latitude 22°42’30”S, longitude 47°30’00” e altitude de 546 m) (Figura 1). O solo é classificado como Nitossolo Vermelho (EMBRAPA, 2018), apresentando textura argilosa e densidade média de 1.300 kg m<sup>-3</sup> na camada de 0 a 1 m de profundidade. O clima é do tipo subtropical úmido (Cwa), segundo a classificação de Köppen, apresentando verão chuvoso e inverno seco, precipitação média anual de 1.257 mm e temperatura média anual de 21,4 °C, sendo a média no inverno de 17,1 °C e a média no verão igual a 24,8 °C.

De acordo com a Base de dados da estação convencional do Posto Meteorológico de Piracicaba, SP, os dados meteorológicos do mês da coleta das amostras de solo foram de 5,7 h/d de insolação, 105,7 mm de precipitação, 81% de umidade relativa, 25,2 °C a temperatura máxima, 13,8 °C a temperatura mínima, 19,5 °C a temperatura média e 3,92 mm de evapotranspiração.

**Figura 1.** Plantas de pinhão-manso pertencentes ao projeto sobre “Estimativa da transpiração do pinhão-manso com a utilização do método de dissipação térmica” na Fazenda Areão, ESALQ/USP. Coordenado pelo Prof. Dr. Marcus Vinicius Folegatti. Processo FAPESP 2013/25686-2.



Para o isolamento de rizobactérias em Pinhão-Manso, foram coletadas cinco amostras de solo aderido as raízes de plantas com 4 anos de idade (uma amostra por planta) por tratamento, cultivadas no mesmo tipo de solo e sob o mesmo clima (Figura 2).

**Figura 3.** A) e B) Coletas das amostras de solo rizosférico de pinhão-manso na Fazenda Areão, ESALQ/USP no município de Piracicaba-SP.



Foram realizadas coletas em quatro tratamentos distintos:

- Tratamento 1: sem irrigação, denominado tratamento de sequeiro;
- Tratamento 2: irrigação por pivô central;
- Tratamento 3: irrigado por gotejamento com reposição de 50% da evapotranspiração da cultura;
- Tratamento 4: irrigado por gotejamento com reposição de 75% da evapotranspiração da cultura;
- Tratamento 5: irrigado por gotejamento com reposição de 100% da evapotranspiração da cultura;

As amostras de raízes foram conservadas em sacos plásticos e acondicionadas a 4°C em caixas de isopor com gelo para o transporte até o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas – LaMiB, Departamento de Morfologia e Patologia - DMP, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – CCBS, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos, SP.

### **2.2.2 Obtenção, purificação e armazenamento dos isolados de rizobactérias**

Para o isolamento das rizobactérias, as cinco amostras coletadas em cada tratamento (item 2.2.1) foram homogeneizadas e então pesados 10g de cada tratamento e adicionados em 90 mL<sup>-1</sup> de solução tampão fosfato-salino esterilizada (NaCl 8,0 g; KCl 0,2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g; 1000 mL<sup>-1</sup> de água destilada; pH 7,4) em *erlenmeyers* previamente autoclavados, os quais foram agitados durante 60 minutos a 150rpm. Procedeu-se então, em tampão fosfato-salino esterilizada, as diluições seriadas 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-5</sup>, das suspensões de solo.

Foram adicionadas alíquotas de 0,1 mL das diluições seriadas utilizadas e espalhadas com o auxílio de uma alça de Drigalski, em duplicata, em placas de Petri contendo o meio de cultura Triptona Soja Ágar (TSA) 10 % (Kasvi) suplementado com benlate (50 µg. mL<sup>-1</sup>) para evitar contaminação fúngica e incubadas invertidas à temperatura de 28 °C por 48 horas.

As colônias obtidas foram contadas e, depois, selecionadas aleatoriamente. Para o cálculo da contagem total de rizobactérias isoladas foi realizada uma média da contagem das duas placas semeadas com alíquotas de cada uma das diluições, e o resultado foi multiplicado pelo fator da diluição que a amostra foi submetida. A purificação das colônias foi feita por estrias de esgotamento em placas de Petri contendo o mesmo meio de cultura Triptona Soja Ágar (TSA 10%), então incubadas invertidas por mais 48 horas.

Depois de confirmada a pureza das culturas, as linhagens bacterianas foram inoculadas em microtubos de 1,5 mL contendo meio TSB 100% (Kasvi) suplementado com glicerol 50% e armazenados em freezer a -80°C.

As linhagens obtidas receberam códigos para facilitar a apresentação dos dados. Todos receberam a sigla RZ (referente à rizosfera) seguida de um mesmo número quando pertencentes ao mesmo tratamento (de 1 a 5). Após o número referente ao tratamento, segue a sigla PM (referente à planta sadia de pinhão-manso) e depois números sequenciais para distinguir as diferentes linhagens. Todos os experimentos foram iniciados com culturas frescas crescidas primeiramente em meio TSA a 28 °C.

As frequências de isolamento dos tratamentos avaliados foram realizadas em triplicata. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o software SISVAR (FERREIRA, 2011). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de significância.

### **2.2.3 Seleção de rizobactérias com potencial agrícola e biotecnológico**

#### **2.2.3.1 Ensaios de promoção de crescimentos vegetal *in vitro***

No total foram avaliados sessenta e três rizobactérias associadas ao pinhão-manso pertencentes ao tratamento 4. Essas rizobactérias foram avaliadas quanto a capacidade de fixação de nitrogênio, produção de AIA, solubilização de fosfato, atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos e atividade enzimática de amilase, celulase, lipase, esterase, pectinase e protease.

Diante de um grande número de isolados rizobacterianos obtidos, o presente estudo foi baseado em técnicas *in vitro* para a seleção de linhagens promissoras para promoção de crescimento vegetal e produção de enzimas. Tais técnicas fornecem uma base para a seleção inicial de bactérias promotoras de crescimento de plantas e que poderão ser utilizadas em testes futuros sob condições *in vivo*.

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

A capacidade dos isolados em realizar o processo de FBN foi avaliada qualitativamente *in vitro*. O meio de cultura NFb, livre de nitrogênio, foi preparado contendo a seguinte composição em g.L<sup>-1</sup>: ácido málico, 5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2; NaCl, 0,1; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,02; KOH, 4,5; e em mL: solução de micronutrientes, 2; solução de azul de

bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4; e solução vitaminas, 1; pH 6,8 (DÖBEREINER ET AL. 1976; DÖBEREINER et al., 1995; BALDANI et al., 2014). Foram utilizados tubos de ensaio de 13 x 100 mm, contendo 4 mL de meio de cultura NFb semi-sólido, onde as linhagens foram inoculadas com alça de platina, a partir de culturas crescidas em meio NFb semi-sólido, foram realizadas três repetições para cada isolado (QUECINE et al., 2012; ARAÚJO et al., 2014). A incubação foi realizada por 96 horas a 28°C. Após esse período foi verificada a formação de película de crescimento próximo à superfície dos tubos. Esse procedimento foi realizado mais uma vez. A reinoculação sucessiva das linhagens é realizada para confirmar se o crescimento não está ocorrendo à custa de reservas de nitrogênio das células, bem como para verificar a estabilidade dessa característica das linhagens (CATTELAN, 1999). Como controle positivo foi utilizado a linhagem bacteriana do gênero *Burkholderia* sp. (BATISTA, 2012).

#### **2.2.3.1.2 Produção de ácido indol acético (AIA)**

Para a detecção e quantificação da produção de AIA, utilizou-se a metodologia originalmente proposta por Bric et al., (1991), que foi adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2003). Os isolados bacterianos foram cultivados em tubos de ensaio contendo 3mL de meio tripticaseína de soja (TSB) 10% + Ltriptofano (5mM) e incubadas a 28°C no escuro por 72 horas, sob agitação constante. Após este período coletou-se 2ml da suspensão bacteriana, centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 rpm e 900µL do sobrenadante foi coletado e colocados em cubetas de 1,5ml e adicionados 400 µL do Reagente de Salkowski (2mL de FeCl<sub>3</sub> (0,5mol L<sup>-1</sup>) e 98 mL de HClO<sub>4</sub> (35%). Após 30 minutos de incubação a 28°C foi realizada a leitura das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520nm de absorbância. Como controle negativo utilizou-se apenas o meio de cultura TSB 10% com L<sup>-1</sup> triptofano (5mM) acrescido do Reagente de Salkowski. As leituras foram normalizadas por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas seguintes concentrações: 1, 5, 25, 50, 75; 100; 125; 150; 175 e 200µg. mL<sup>-1</sup>. A coloração rosa-avermelhada das amostras indicou a produção de auxinas. Os testes foram realizados em triplicata.

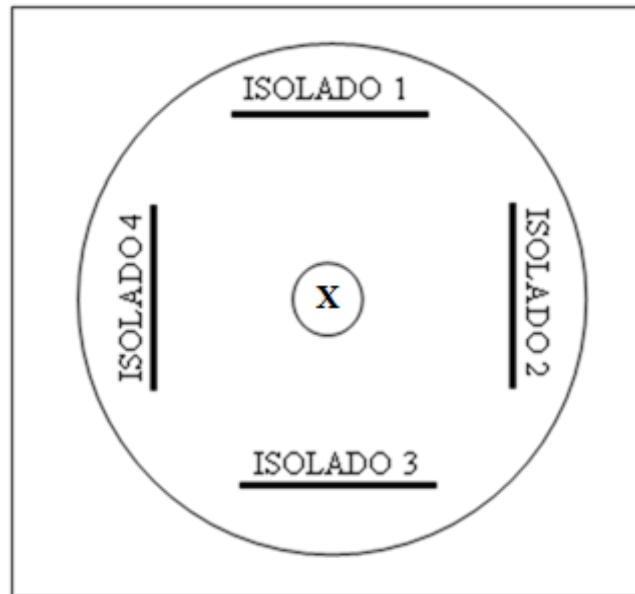
### 2.2.3.1.3 Solubilização de fosfato inorgânico

Para a análise da capacidade de solubilizar fosfato sessenta e três isolados bacterianos foram inoculados, em quadruplicada, em meio de cultura sólido contendo: 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose; 5 g.L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl; 1 g.L<sup>-1</sup> de NaCl; 1 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,8 g.L<sup>-1</sup> de CaHP0<sub>4</sub>; 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar; pH 7,2 a 28°C por 120 horas. A presença de halo incolor ao redor das colônias indicou a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico. Para fins semi-quantitativos, foram medidos os diâmetros dos halos claros formados ao redor de cada colônia (Dh), com auxílio de um paquímetro, e os diâmetros das colônias correspondentes (Dc). Com os dados, pôde-se calcular a razão: (Dh)/(Dc). De modo que linhagens que solubilizam mais fosfato, obtêm maiores razões e, portanto, apresentam maiores Índices de Solubilização de Fosfato (ISF) (BERRAQUERO et al., 1976). De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), a solubilização pode ser classificada como baixa (ISF<2), média (2<ISF<3) e alta (ISF>3).

### 2.2.3.1.4 Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos

Para analisar antagonismos dos isolados rizosféricos associados ao pinhão-mansinho contra fungos fitopatógenos foram realizados testes de antagonismo *in vitro*. Os fungos fitopatogênicos utilizados nos ensaios foram: *Alternaria alternata*, *Colletotrichum* spp., *Fusarium oxysporium* e *F. proliferatum*. Os isolados bacterianos foram avaliados quanto à capacidade antagonista a diferentes gêneros de fungos fitopatogênicos pelo método da cultura pareada (MARIANO, 1993; ASSUMPCÃO et al., 2009; SILVA, 2015). Para isso, primeiramente foi realizada uma seleção massal, onde os isolados bacterianos foram repicados em forma de estrias em quatro pontos equidistantes nas extremidades das placas contendo o meio batata-dextrose-ágar (BDA) e discos de meio BDA, com as estruturas dos fungos fitopatogênicos medindo 0,5 cm de diâmetro foram depositadas no centro de cada placa conforme apresentados na figura 3. As placas foram incubadas a 28°C por até 120 horas. Uma placa contendo apenas um disco com micélio do fitopatógeno no centro serviu de parâmetro para indicar o momento de avaliar a inibição (momento em que o fungo atingiu as extremidades da placa), realizada por meio de análise visual e em apenas uma repetição por isolado.

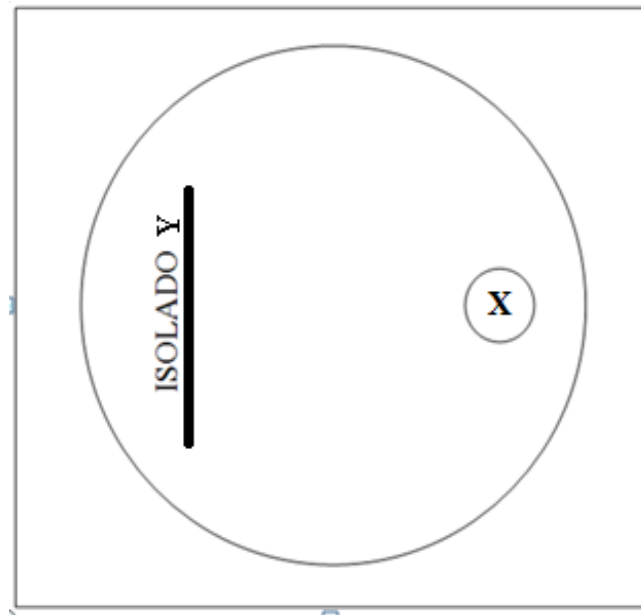
**Figura 5.** Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a metodologia para avaliação massal de antagonismo *in vitro* dos isolados rizobacterianos associados ao pinhão-mansão, em relação ao fungo fitopatogênico. Isolado 1, 2, 3, e 4 representam os isolado.



#### 2.2.3.1.4.1 Técnica de pareamento direto *in vitro*

Para a realização deste ensaio, discos contendo cerca de 0,5 cm de diâmetro cortados de placas de Petri contendo os fungos fitopatogênicos já cultivados em meio BDA foram colocados em um dos lados de uma outra placa de Petri e, do outro lado (Figura 4), os isolados bacterianos rizosféricos selecionados na primeira etapa anterior, foram inoculados com o auxílio de um palito descartável e esterilizado, de acordo com o Método da cultura pareada ou Pareamento (MARIANO, 1993). A presença de um halo de inibição no crescimento do fungo indica isolados com atividade antagonônica. A avaliação do experimento foi realizada quando o controle (placa contendo apenas o disco fúngico) apresentou o crescimento de uma extremidade a outra da placa de Petri. As placas foram incubadas por 3 a 7 dias a temperatura de 28°C, sendo o teste realizado em triplicata.

**Figura 7.** Modelo esquemático de uma placa de Petri; representando a técnica de pareamento direto in vitro para avaliação do potencial antagonístico de rizobactérias associados ao pinhão-mansão, em relação ao fungo fitopatogênico. Isolado “X” representa o fungo fitopatogênico e o isolado “Y” representa o isolado rizobacteriano.



#### 2.2.4 Produção de enzimas bacterianas

A atividade enzimática dos isolados bacterianos foram avaliados qualitativamente (ARAÚJO et al., 2014). Os isolados foram cultivados em meio líquido tripticaseína de soja (TSB) e em seguida semeados em placas de Petri contendo os meios de cultura específico para cada enzima e, após o crescimento microbiano foi observado a presença ou ausência de determinada atividade enzimática, por meio de formação de halo em torno da colônia.

##### 2.2.4.1 Atividade amilolítica

Os isolados foram cultivados em meio mínimo M9 contendo  $200\text{mL}^{-1}$  de solução estoque ( $64\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $15\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ;  $2,5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaCl}$ ;  $5\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ );  $2\text{mL}^{-1}$  de  $\text{MgSO}_4$  1M;  $0,1\text{mL}^{-1}$  de  $\text{CaCl}_2$  1M,  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glicose e  $15\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de ágar, pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura e 1% de amido solúvel a  $28^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10mL de solução de Iodo e então lavados quase que imediatamente com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a produção de amilase.



#### **2.2.4.2 Atividade celulolítica**

As bactérias foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo: 200mL<sup>-1</sup> de solução estoque (64g.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 15g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5g.L<sup>-1</sup> de NaCl; 5g. L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl); 2mL<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> 1M; 0,1mL<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> 1M, 10g.L<sup>-1</sup> de glicose e 15g.L<sup>-1</sup> de ágar, pH 7,2 contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de carboximetilcelulose (CMC) a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10mL do corante Vermelho Congo, depois de 15 minutos as placas foram lavadas com NaCl 5M segundo a metodologia proposta por Teather e Wood (1982). A presença de um halo amarelado ou incolor em torno da colônia após a adição de NaCl indicou a secreção de celulase.

#### **2.2.4.3 Atividade lipolítica e esterolítica**

As bactérias foram cultivadas em meio de Lípase/Esterase contendo: 10g.L<sup>-1</sup> de Peptona; 5g. L<sup>-1</sup> de NaCl; 0,1g.L<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 15g.L<sup>-1</sup> de Agar, pH 7,4. Após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 20, previamente esterilizado. Após a incubação a 28°C durante 48 horas, a formação de um halo formado por cristais ao redor da colônia bacteriana indicou a secreção de lípases. A metodologia utilizada para a avaliação da produção de esterase foi a mesma utilizada para a lípase, porém após a esterilização do meio de cultura foi adicionado 1% (v/v) de Tween 80, previamente esterilizado. A formação de um halo claro ao redor da colônia bacteriana indicou a secreção de esterases.

#### **2.2.4.4 Atividade pectinolítica**

As bactérias foram cultivadas em meio mínimo M9 contendo: 200 mL<sup>-1</sup> de solução estoque (64g. L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 15g. L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5g. L<sup>-1</sup> de NaCl; 5 g. L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Cl); 2mL<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub> 1M; 0,1mL<sup>-1</sup> de CaCl<sub>2</sub> 1M, 10g. L<sup>-1</sup> de glicose e 15g. L<sup>-1</sup> de ágar, pH 5,0 contendo 0,5% de extrato de levedura, 1% de pectina (v/v) a 28°C durante 48 horas. Após o crescimento bacteriano foram adicionados 10mL de lugol e em seguida efetuou-se a lavagem com água. A presença de um halo incolor em torno da colônia indicou a secreção de pectinases. O pH desse meio pode ser modificado para caracterização de duas diferentes pectinases: o meio com pH 8,0 (ajustado com NaOH) é utilizado para caracterização de pectato liase e o meio com pH 5,0 (ajustado com HCl) para poligalacturonase.

#### 2.2.4.5 Atividade proteolítica

As bactérias foram cultivadas em meio Protease contendo: 5g. L<sup>-1</sup> de triptona; 2,5g. L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 1g. L<sup>-1</sup> de glicose; 2,5g. L<sup>-1</sup> de NaCl e 15g.L<sup>-1</sup> de Agar, pH 7,0. Após a esterilização adicionou-se 100mL de leite desnatado. Após a incubação a 28°C durante 48 horas, a formação de um halo ao redor da colônia indicou a secreção de proteases.

### 2.3 Identificação molecular das rizobactérias

#### 2.3.1 Extração de DNA dos isolados bacterianos

O DNA dos isolados bacterianos foram purificados pelo método de fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989) e sua integridade foi avaliada por meio de gel de eletroforese em gel de agarose (0,8% p/v) a (3 volts.cm<sup>-1</sup>) em tampão TEB 1x e corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (1,0 mg. mL<sup>-1</sup>) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (KASVI, Itália).

Das 63 rizobactérias avaliadas quanto ao potencial biotecnológico e agrícola, 27 foram identificadas por sequenciamento parcial do gene 16S. O critério de seleção dos isolados para o sequenciamento foi baseado no potencial para promoção de crescimento vegetal *in vitro* por meio da solubilização de fosfato (SF), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido indol acético (AIA), antagonismo aos fungos fitopatogênicos e atividade enzimática. As sequências obtidas do gene 16S rDNA foram comparadas com sequências do *GenBank* por meio do programa *BLASTn* (NCBI – [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)).

#### 2.3.2 Amplificação do gene 16S rDNA pela reação de PCR

A amplificação do gene 16S rDNA dos isolados foi realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), com volume final de 15µL, com 1µL de DNA-molde (20ng), 0,2µM dos primers V3F (5'CCAgACTCCTACGGGAGGCAG-3') e V6R (5'ACATtTCACaACACGAGCTGACGA-3') (CHAKRAVORTY et al., 2007); 0,2µM de cada dNTP; 3,75 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 U de Taq DNA polimerase (CELLCO, Alemanha) e Tampão10X.

A PCR foi realizada em termociclador (EPPENDORF) programado para desnaturação inicial de 10 minutos a 95°C, seguida de 45 ciclos de 20 segundos a 95°C, 30 segundos a 52°C, 30 segundos a 72°C e uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

A amplificação do fragmento de aproximadamente 750pb foi confirmada por eletroforese em gel de agarose gel de agarose (1,0 % p/v) a (3 volts.cm-1) em tampão TAE 1X e corado com GelRed Nucleic Acid Gel Stain (1,0 mg. mL<sup>-1</sup>) juntamente com o marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder RTU (KASVI, Itália).

### **2.3.3 Purificação do DNA, sequenciamento da região 16S rDNA e análise das sequências**

Os fragmentos do gene 16S rDNA foram purificados com um kit de purificação (Illustra™), de acordo com as especificações do fabricante. Os fragmentos obtidos foram enviados para sequenciamento no Centro de Estudos do Genoma Humano - USP/ São Paulo. O sequenciamento foi realizado com o primer V3F (CHAKRAVORTY et al., 2007).

As sequências obtidas a partir do gene 16S rDNA foram utilizadas para identificação dos isolados nos bancos de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information – <http://ncbi.nlm.nih.gov>), por meio do *Blastn*. Foram consideradas sequências com dissimilaridade menor ou igual a 3% com as do banco de dados.

### **2.3.4 Edição e análise das sequências 16S rDNA**

As sequências obtidas foram visualizadas e editadas utilizando-se o software MEGA 5 (TAMURA et al. 2011). O início e o final de algumas sequências foram desprezados e os espaços (gaps) foram deletados de modo que todas as sequências ficaram do mesmo tamanho.

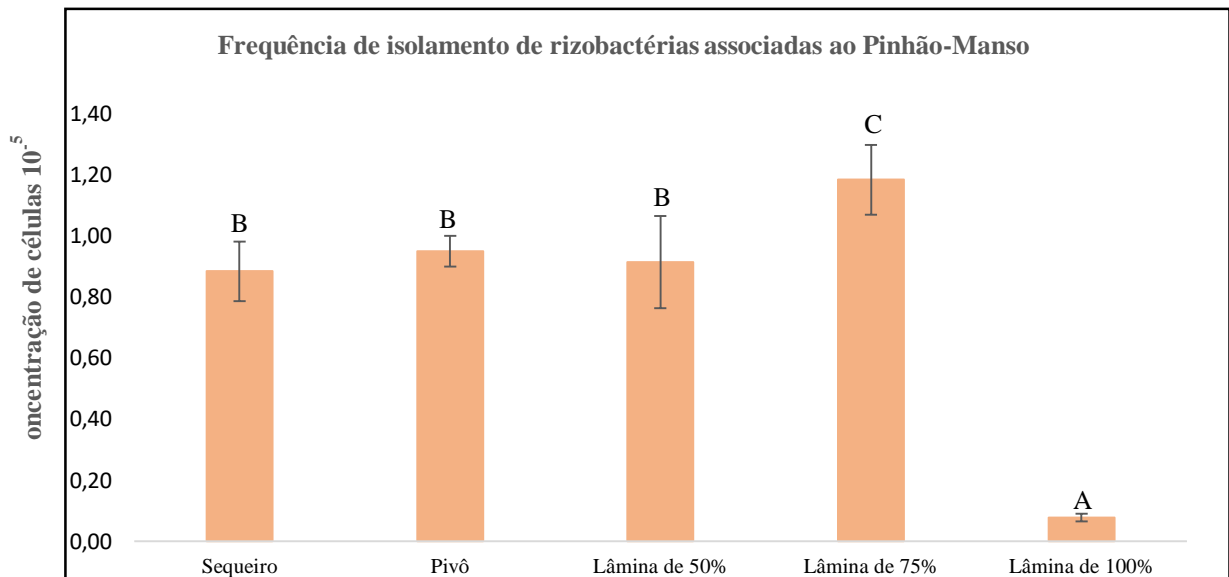
Essas sequências foram comparadas com sequências depositadas no *GenBank* do National Center for Biotechnology Information (NCBI), utilizando, para tal propósito, a ferramenta *BLASTn* (ALTSCHUL et al., 1997). Esse programa está disponível no site [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Pôde-se, aqui, determinar a identidade das linhagens com sequências existentes no banco de dados.

## 2.4 Resultados e Discussão

### 2.4.1 Isolamento de rizobactérias associadas ao pinhão-mansão

A partir do isolamento de rizobactérias, foi possível estimar a abundância bacteriana por meio da contagem de células viáveis expressas em Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo (UFC.g<sup>-1</sup> de solo). Os valores médios de isolados encontrados nos diferentes tratamentos avaliados foram: tratamento 1 (sem irrigação/sequeiro) 0,9x10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> solo, tratamento 2 (irrigação por pivô central) 0,63 x10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> solo, tratamento 3 (irrigado por gotejamento com reposição de 50% da evapotranspiração da cultura) 0,91 x10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> solo e tratamento 4 (irrigado por gotejamento com reposição de 75% da evapotranspiração da cultura) 1,18x10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> solo e no tratamento 5 (irrigado por gotejamento com reposição de 100% da evapotranspiração da cultura) 0,08x10<sup>5</sup> UFC.g<sup>-1</sup> solo conforme apresentado na figura 5. As médias foram comparadas a 5% de significância pelo teste de Tukey.

**Figura 9.** Frequência de isolamento de rizobactérias associadas ao pinhão-mansão sob diferentes tratamento de irrigação.



No total foram isolados 255 rizobacterias associadas ao pinhão-mansão. Sendo 44 pertencentes ao tratamento 1; 48 ao tratamento 2; 58 ao tratamaento 3; 63 ao tratamento 4 e 42 ao tratamento 5. As plantas de pinhão-mansão utilizadas no presente estudo pertencem ao mesmo genótipo e estão cultivadas com os mesmos tratos culturais diferindo apenas por diferetes reposições de água no solo durante todo seu ciclo de desenvolvimento (FRANCISCO, 2017).

De acordo Miethling et al. (2000), plantas do mesmo genótipo, crescendo em diferentes

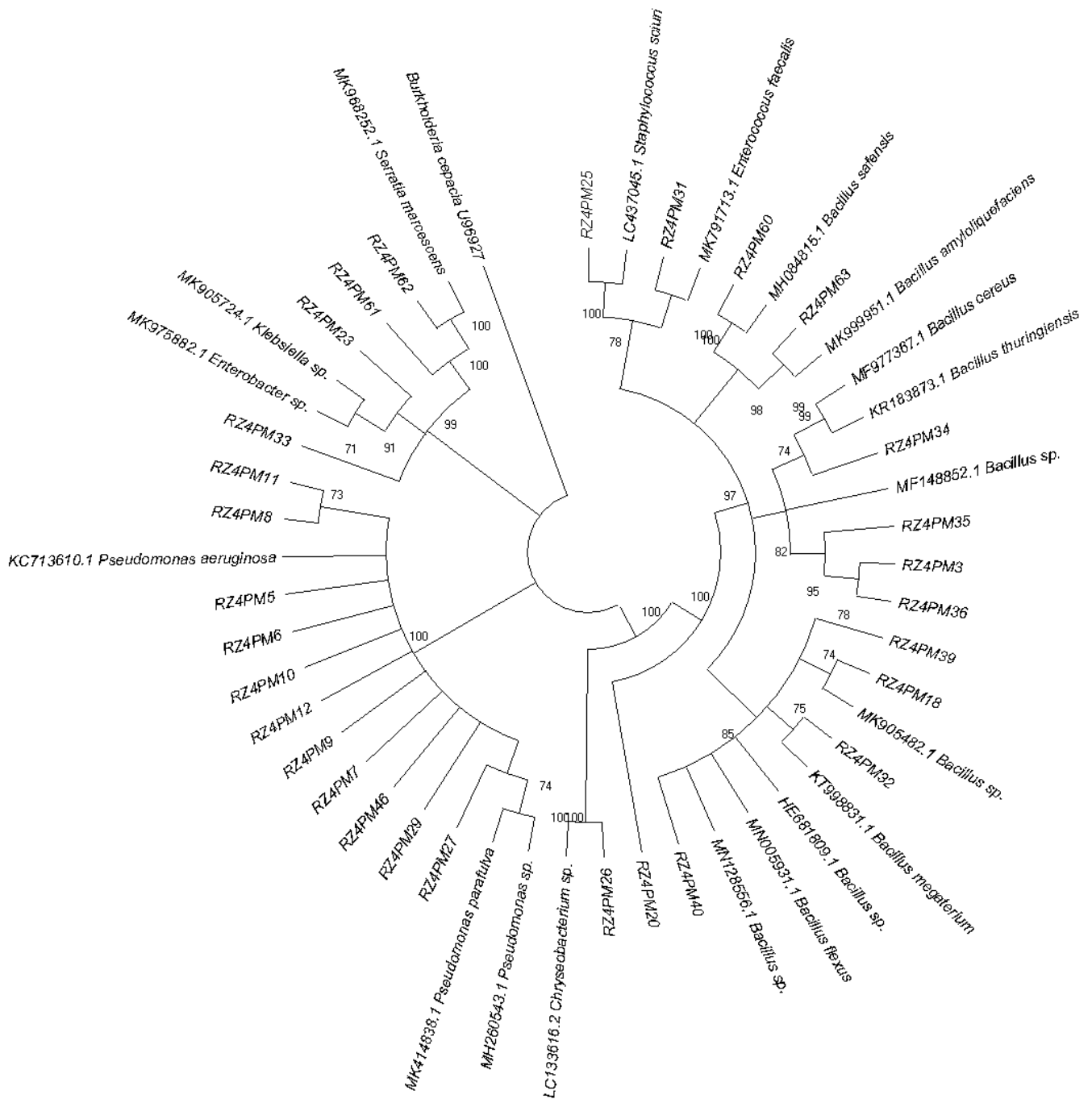
tipos de solos, podem formar comunidades microbianas semelhantes o que condiz com as semelhanças de frequência dos tratamentos 1 (sem irrigação); 2 (irrigado por pivô) e 3 (irrigado por gotejamento com reposição de 50% da evapotranspiração da cultura), onde não apresentaram diferenças significativas. No entanto, observou-se que a área com maior abundância de bactérias foi do tratamento 4, onde havia uma reposição de 75% da evapotranspiração da cultura. Foi possível observar que no tratamento 5 onde houve uma reposição de 100% da evapotranspiração da cultura do pinhão-manso a frequência de isolamento foi reduzida e apresentou diferenças significativas.

A ocorrência e abundância de microrganismos em um ambiente são determinados pela disponibilidade de nutrientes, pH, temperatura, textura e umidade do solo (MATTOS, 2015). Possivelmente essa variação de atividade bacteriana se deve ao aumento da aplicação de lâminas crescentes de água. À medida que aumenta a quantidade de água aplicada, aumenta no solo o fluxo de massa, favorecendo o transporte de nutrientes para o sistema radicular atraindo microrganismos rizoféricos. No entanto essa redução de bactérias isoladas no tratamento 5 pode estar relacionada com uma maior umidade do solo, reduzindo a sua condutividade gasosa, fazendo com que possa alterar a atividade microbiana dessa região (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

#### **2.4.2 Sequenciamento parcial do gene 16S rDNA**

Pela análise da diversidade rizobacteriana do pinhão-manso encontrada nos 27 isolados identificados, observou-se a presença dos gêneros diferentes *Bacillus*; *Chryseobacterium*; *Enterobacter*; *Enterococcus*; *Klebsiella*; *Pseudomonas*; *Serratia* e *Staphylococcus* (Figura 6).

**Figura 11.** Dendograma determinado pelo método Neighbor-Joining e a relação entre as sequências foi inferida usando método Muscle; os dados observados nos ramos indicam valores de bootstrap acima de 70%, total de 1000 repetições. O out-group, foi formado por sequências de *Burkholderia cepacia*, obtidas no banco de dados do NCBI.



Na tabela 1 são apresentadas as linhagens de rizobacterias e suas respectivas identificações ao gene 16S rDNA considerando o mínimo de 90% por similaridade. Os 27 isolados identificados 41% são pertencentes do gênero *Pseudomonas* e 37% do gênero *Bacillus*.

**Tabela 1.** Identificação por sequenciamento parcial do gene 16S rDNA dos isolados rizobacterianos associados ao pinhão-mansão.

Isolado	Identificação	Similaridade	Nº de acesso ( <i>Gebank</i> )
RZ4PM5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	KC713610.1
RZ4PM6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	KC713610.1
RZ4PM7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	KC713610.1
RZ4PM8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	KC713610.1
RZ4PM9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	KC713610.1
RZ4PM10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	KC713610.1
RZ4PM11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	KC713610.1
RZ4PM12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100%	KC713610.1
RZ4PM18	<i>Bacillus</i> sp.	100%	MK905482.1
RZ4PM23	<i>Enterobacter</i> sp	99%	MK975882.1
RZ4PM25	<i>Staphylococcus sciuri</i>	100%	LC437045.1
RZ4PM26	<i>Chryseobacterium</i> .	100%	LC133616.2
RZ4PM27	<i>Pseudomonas</i> sp.	100%	MH260543.1
RZ4PM29	<i>Pseudomonas parafulva</i>	99%	MK414838.1
RZ4PM31	<i>Enterococcus faecalis</i>	96%	MK791713.1
RZ4PM32	<i>Bacillus megaterium</i>	98%	KT998831.1
RZ4PM33	<i>Klebsiella</i> sp.	96%	MK905724.1
RZ4PM34	<i>Bacillus cereus</i>	99%	MF977367.1
RZ4PM35	<i>Bacillus thuringiensis</i>	98%	KR183873.1
RZ4PM36	<i>Bacillus cereus</i>	99%	MN004801.1
RZ4PM39	<i>Bacillus</i> sp.	99%	MN128556.1
RZ4PM40	<i>Bacillus</i> sp.	99%	MN128556.1
RZ4PM46	<i>Pseudomonas</i> sp.	98%	MN128405.1
RZ4PM60	<i>Bacillus safensis</i>	99%	MH084815.1
RZ4PM61	<i>Serratia marcescens</i>	100%	MK968252.1
RZ4PM62	<i>Serratia marcescens</i>	99%	MK968252.1
RZ4PM63	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	100%	MK999951.1

Diversos estudos demonstram a diversidade de *Bacillus* spp. encontrados nos solos, Polanczyk et al., (2004) isolando microrganismos de solos oriundos de lavouras orizícolas, encontraram 772 colônias bacterianas, das quais 50,27% pertenciam ao gênero *Bacillus*. Em estudo semelhante, Fritz et al., (2010) analisaram a frequência de espécies desse gênero no solo de diferentes cultivos de arroz irrigado e obtiveram 336 bactérias, das quais 35,42% foram identificadas como *B. thuringiensis*, 16,96% como *B. cereus*, 9,52%, *B. sphaericuse* 38,10% e

*Bacillus* sp.

Além da diversidade do gênero, o desenvolvimento de plantas mediado por *Bacillus* é realizada por meio de vários mecanismos de promoção de crescimento, tais como: fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de fitohormônios, antibióticos e etc (REQUE et al., 2017; GOUDA, et al., 2018; RICCI et al., 2019; HASHEM; TABASSUM; ABD-ALLAHD; 2019). *Bacillus* spp. também foram descritas como produtoras de exopolissacarídeos e sideróforos, promovendo o movimento da água nos tecidos vegetais e inibindo o crescimento de microrganismos fitopatogênicos (RADHAKRISHNA et al., 2017).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* estão entre as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas mais estudadas (DORJEY, DOLKAR, SHARMA, 2017). (FINKEL et al., 2017; GOUDA et al. 2018). De acordo com Hernández (2000) e Dorjey, Dolkar, Sharma, 2017, esse gênero predomina entre todos os microrganismos que habitam a rizosfera devido a sua ocorrência de forma natural e em elevadas populações, capacidade de suprimir patógenos do solo, ao fato de serem nutricionalmente versáteis e possuem habilidade de crescer numa ampla faixa de condições ambientais, além de produzirem uma grande variedade de metabolitos secundários. Essas bactérias apresentam alta capacidade de colonizar as raízes das plantas e promover o seu crescimento, devido a sua capacidade de supressão aos fitopatógenos e aumentando a disponibilidade de nutrientes para as plantas e indiretamente com indução de resistência (JACOBSEN et al., 2004). As espécies que mais possuem importância dentro destes gêneros são *Pseudomonas fluorescense* e *P. putida*, geralmente estudadas com o objetivo de se avaliar a ação das mesmas na promoção de crescimento e biocontrole (SANDILYA et al. 2017; CHU et al., 2019; HASHEM; TABASSUM; ABD-ALLAHD; 2019).

CHU et al., 2019; identificaram uma linhagem de *Pseudomonas putida* (PS01) capaz de influenciar positivamente na taxa de germinação de sementes de *Arabidopsis* em condições de stress salino (NaCl 150 mM). As plantas de *A. thaliana* inoculadas com essa linhagem sobreviveram condições de stress salino até 225 mM NaCl, enquanto todas as plantas não inoculadas estavam mortas acima de 200 mM NaCl .

Sandilya et al. 2017 isolaram 85 linhagens de *Pseudomonas* foram isoladas de solo rizosférico de mamona (*Ricinus communis* L.) e sua potencialidade *in vitro* foi avaliada quanto à capacidade de promover crescimento e potencial antifúngico. A maioria das *Pseudomonas* sp. produziram ácido indol-acético, ácido giberélico, actividade da ACC deaminase, amoníaco, cianeto de hidrogênio e sideróforo, quando testados *in vitro*.. Formulações a base da linhagem de *Pseudomonas* MAJ PIA03 aplicadas em campo, foi capaz de reduzir em 50% fertilizantes inorgânicos indicados para esta cultura.



Diante do exposto é possível compreender a abundância desses gêneros na rizosfera e seu potencial biotecnológico e agrícola (BATISTA et al., 2018; CHU et al., 2019; HASHEM; TABASSUM; ABD-ALLAHD; 2019)

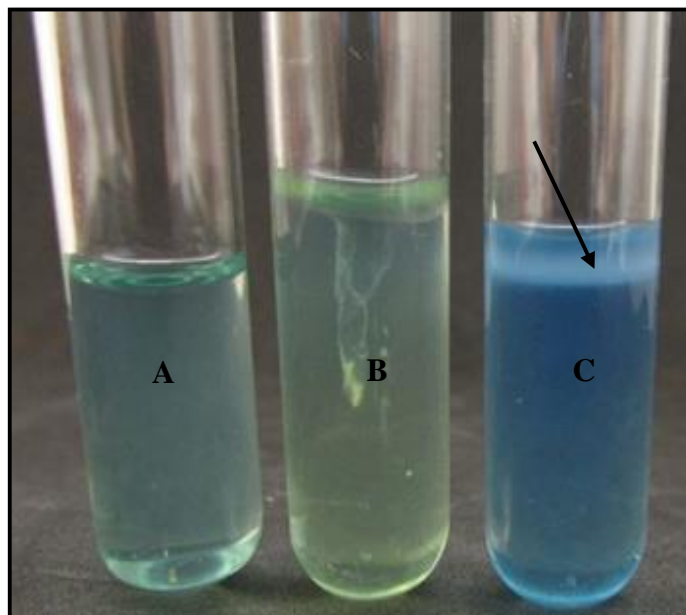
Os principais gêneros descritos associados a cultura do pinhão-mansão são *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pleomorphomonas*, *Pseudomonas*, *Promicromonosporaceae*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Sanguibacter*, *Sphingomonas* and, *Staphylococcus* e *Serratia* (JHA; ANNAPURNA; SARAF, 2012; MADHAIYAN et al., 2012; MADHAIYAN et al., 2013; MACHADO et al., 2016; MOHANTY; DUBEY; KOLLAH, 2017).

### 2.4.3 Seleção de rizobactérias com potencial para promoção de crescimento vegetal

#### 2.4.3.1 Fixação biológica de nitrogênio

No presente estudo foi constatado que 25% dos isolados bacterianos avaliados apresentaram a capacidade de fixar nitrogênio (Tabela 2). Estes isolados foram capazes de crescer e formar película em meio de cultura semi-sólido livre de nitrogênio conforme demonstrado na Figura 7.

**Figura 13.** Fixação de nitrogênio observada pela formação da película em meio NFb semi-sólido inoculado com o rizobactérias associadas ao pinhão-mansão. A) controle sem inóculo, B) isolado (RZ4PM14) não apresenta as características de habilidade em fixar nitrogênio e C) isolado (RZ4PM3) apresentando formação de halo e mudança de cor no meio de cultura NFb semi-sólido.



**Tabela 2.** Mecanismos de promoção de crescimento vegetal in vitro analisados para os isolados de rizobacterianos associadas ao pinhão-manso pertencentes ao tratamento 4.

Isolados	Promoção de crescimento			Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos			
	NFb <sup>a</sup>	ISF <sup>b</sup>	AIA <sup>c</sup> µg/ml	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>
RZ4PM1	-	-	3,5	+	+	+	+
RZ4PM2	-	-	4,5	+	+	+	+
RZ4PM3	+	-	9,8	-	-	-	-
RZ4PM4	-	2,4	6,5	-	-	+	+
RZ4PM5	+	4,4	10,4	+	+	+	+
RZ4PM6	+	4,1	3,5	+	+	+	+
RZ4PM7	+	3,9	3,5	+	+	+	+
RZ4PM8	-	5	2,1	+	+	+	+
RZ4PM9	-	4,9	13,0	+	+	+	+
RZ4PM10	-	4,5	2,5	+	+	+	+
RZ4PM11	-	3,2	20,1	+	+	+	+
RZ4PM12	-	4,7	3,3	+	+	+	+
RZ4PM13	-	2,5	15,1	-	-	-	+
RZ4PM14	-	2,3	0,78	-	-	-	-
RZ4PM15	-	2,3	5,9	+	-	-	-
RZ4PM16	-	-	17,4	+	-	-	-
RZ4PM17	-	1,6	36,8	+	-	-	+
RZ4PM18	-	3,1	50,9	+	-	-	+
RZ4PM19	-	-	3,9	-	-	-	-
RZ4PM20	-	2,3	9,2	-	-	-	-
RZ4PM21	-	2,9	5	-	-	-	-
RZ4PM22	-	-	16,6	-	-	-	-
RZ4PM23	-	2,1	3,3	-	-	-	-
RZ4PM24	-	-	91,7	-	-	-	-
RZ4PM25	-	2,0	5,3	-	-	-	-
RZ4PM26	-	-	27,2	+	+	-	-
RZ4PM27	+	2,4	40,7	-	-	-	-
RZ4PM28	+	4,1	14,2	-	-	-	-
RZ4PM29	+	3,5	30,9	-	-	-	-
RZ4PM30	+	2,7	3,12	-	-	-	-
RZ4PM31	+	2,9	12,5	-	-	-	-
RZ4PM32	-	-	4,8	-	-	-	-
RZ4PM33	-	4,5	217,8	-	+	-	-
RZ4PM34	-	-	7,4	+	+	-	-
RZ4PM35	-	2,7	7,3	+	+	-	-
RZ4PM36	-	-	20,4	-	-	-	-
RZ4PM37	-	-	23,8	-	-	-	-
RZ4PM38	-	2,0	2,4	-	-	-	-
RZ4PM39	-	-	31,8	-	-	+	-
RZ4PM40	-	-	65,9	-	+	+	+
RZ4PM41	-	-	9,5	-	+	-	-
RZ4PM42	-	3,0	120,2	-	-	-	-
RZ4PM43	+	5,0	84,7	-	-	-	-
RZ4PM44	-	3,0	79,4	-	-	-	-
RZ4PM45	+	3,2	64,3	-	-	-	-

a Fixação Biológica de Nitrogênio;

b Índice de Solubilização de Fosfato

c Concentração da produção de Ácido Indol Acético bacteriano em µg/mL;

**Tabela 2.** Mecanismos de promoção de crescimento vegetal *in vitro* analisados para os isolados de rizobacterianos associadas ao pinhão-manso pertencentes ao tratamento 4. (continuação)

Isolados	Promoção de crescimento			Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos			
	NFb <sup>a</sup>	ISF <sup>b</sup>	AIA <sup>c</sup> µg/ml	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Colletotrichum</i> sp.	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>
RZ4PM46	-	4,9	95,1	-	-	-	-
RZ4PM47	-	4,1	182,6	+	+	-	-
RZ4PM48	+	-	6,4	-	-	-	-
RZ4PM49	-	-	22,3	-	-	-	-
RZ4PM50	+	3,0	91,4	-	+	-	-
RZ4PM51	+	3,1	81,5	-	+	+	-
RZ4PM52	+	2,0	10,1	-	+	-	-
RZ4PM53	-	4,4	44,3	-	-	-	-
RZ4PM54	-	2,3	41,5	-	-	-	-
RZ4PM55	-	6,6	227,4	+	-	-	+
RZ4PM56	-	2,5	19,7	-	-	-	+
RZ4PM57	-	5,0	10,6	+	+	-	+
RZ4PM58	-	2,5	10,7	+	+	+	+
RZ4PM59	-	4,8	9,4	-	-	-	+
RZ4PM60	+	-	63,7	-	+	-	-
RZ4PM61	-	3,7	17,7	+	+	+	+
RZ4PM62	-	4,0	10,9	+	+	+	+
RZ4PM63	-	-	5,3	+	+	+	+

a Fixação Biológica de Nitrogênio;

b Índice de Solubilização de Fósforo

c Concentração da produção de Ácido Indol Acético bacteriano em µg/mL;

A formação de halo indicando o potencial de fixação de nitrogênio foi observada tanto no meio semi-sólido de NFb de pH básico (de cor verde sem alteração do pH proposto pela metodologia) quanto no meio de cultura com o pH ácido (de cor azul indicando a acidificação do meio NFB semi-sólido). A formação desta película é uma estratégia desenvolvida pelos microrganismos para regular a concentração de oxigênio no meio, com a finalidade de manter baixa a sua tensão (BRASIL, 2005); permitindo assim, uma condição de crescimento bacteriano onde o oxigênio não influencia negativamente na sua sobrevivência; proporcionando uma melhor atividade da nitrogenase que é extremamente sensível a altas concentrações de oxigênio (PELZER, 2010). Embora seja uma metodologia que possibilite apenas qualificar as bactérias quanto a fixação biológica do nitrogênio *in vitro*, é um teste rápido e eficiente de avaliação utilizado nos laboratórios, pois em um meio livre de fonte nitrogenada e sob a condição semi-sólida, há um ambiente ideal para o desenvolvimento dos microrganismos e para a fixação biológica do nitrogênio atmosférico (SILVEIRA, 2008; ARAÚJO et al., 2014).

Silva et al., observou que dentre 55 isolados bacterianos capazes de formar a película no meio livre de nitrogênio conhecido por favorecer o crescimento de diazotróficos, apenas 24 foram positivos para amplificação do gene *nifH* (que codifica a subunidade nitrogenase redutase do complexo enzimático nitrogenase).

Gêneros de bactérias diazotróficas associativas têm sido isoladas da rizosfera, raízes e

partes aéreas do pinhão-mansão tais como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Pseudomonas*. Estes gêneros já vêm sendo relatado de forma recorrente como fixadores de nitrogênio (AHEMAD e KIBRET, 2014; RODRIGUES et al., 2017; LI et al., 2017; BATISTA et al., 2018). Em estudos realizados por Machado (2016) com bactérias endofíticas associadas ao pinhão-mansão foram encontradas dez linhagens de *Bacillus* sp. com habilidade em fixar nitrogênio *in vitro*. Já Madhaiyan et al., (2012), relataram a capacidade de uma linhagem de *Enterobacter arachidis* (R4-368) isolada endofiticamente do pinhão-mansão, em colonizar os tecidos radiculares e promover o crescimento de mudas de pinhão-mansão.

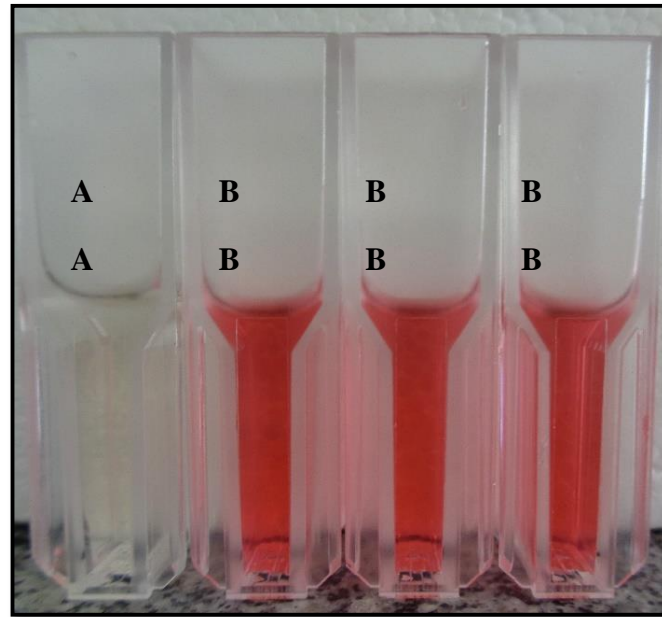
Mohanty et al. (2017), obtiveram respostas positivas à redução de nitrato ao trabalhar com bactérias isoladas endofiticamente do pinhão-mansão quando inoculadas em plantas de milho sem a adição de nitrogênio como fonte de nutrientes.

De acordo com Trinh et al. (2018), uma linhagem de *Pseudomonas nitroreducens*, estirpe IHB B 13561 (PnIHB) foram capazes de promover o crescimento de *Arabidopsis thaliana* e *Lactuca sativa* por meio da estimulação do desenvolvimento celular e absorção de nitratos. Essa linhagem foi inoculada em mudas saudáveis de *A. thaliana* e *L. sativa*, onde ambas as espécies de plantas exibiram um crescimento notavelmente superior, particularmente em relação à biomassa. Esses autores sugerem que o a linhagem PnIHB melhora o crescimento de *A. thaliana* e *L. sativa* por meio de vias específicas envolvidas na promoção do desenvolvimento celular e aumento da absorção de nitrato.

#### **2.4.3.2 Produção de ácido indol acético**

Todos os isolados rizobacterianos avaliados foram capazes de produzir AIA. Os valores de produção de AIA com valores variando de 0, 78  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  até 227,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os valores obtidos neste estudo foram comparados com os resultados obtidos por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas concentrações de 5, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**Figura 14.** Quantificação da produção de AIA. A) controle negativo, B) isolado rizosférico RZ4PM51.



Sugere-se que mais de 80% das bactérias isoladas da rizosfera são aptas a produzir o ácido indol acético (IAA) devido a presença de triptofano presentes dos exsudatos liberados pelas raízes, estimulando a síntese de auxina na rizosfera (GRAÇAS et al., 2015).

Sabe-se que a maioria dos isolados de rizobactérias são capazes de sintetizar AIA na rizosfera de diferentes plantas, sendo que a grande variação não está tanto no número de produtores e sim na quantidade de AIA produzida (MORDUKHOVA et al., 1991 citado por CATTELAN, 1998). No presente estudo foi observado que todas as rizobactérias avaliadas foram capazes de sintetizar o AIA. Destacando-se os isolados RZ4PM56 e RZ4PM48 com valores de  $227,4 \mu\text{g/mL}^{-1}$  e  $182,6 \mu\text{g/mL}^{-1}$  respectivamente. Os valores obtidos no presente estudo são muito superiores aos relatados por Jha; Annapurna; Saraf, (2012) em estudos avaliando o potencial de promoção de crescimento bactérias associadas ao pinhão-manso.

Reetha et al., 2014 observaram a capacidade de *Pseudomonas fluorescens* e *Bacillus subtilis* em sintetizar AIA e promover aumento no comprimento da raiz, comprimento da parte aérea, peso da raiz e biomassa da parte aérea de cebola inoculadas com esses isolados.

Rizobactérias isoladas de rizosfera da cultura do alho (*Allium ascalonicum*) cultivados em diferentes áreas na ilha de Sulawesi foram avaliados quanto ao potencial de sintetizar de AIA *in vitro* e promover de crescimento em plantas de alho. Os isolados MK6-1; LB8 e MK11 promoveram um melhor desenvolvimento da planta. A inoculação da linhagem MK 6-1-1 nas fases iniciais do plantio, proporcionou os melhores resultados no crescimento vegetativo (número de folha e perfilhos). Plantas inoculadas com o isolado MK11, apresentaram maior

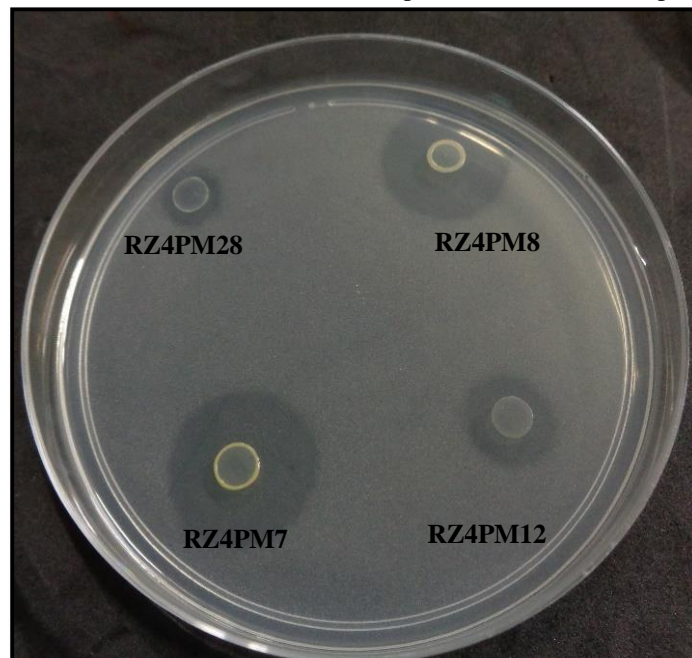
enlongação da parte aérea, peso e biomassa dos bulbos. Já o isolado bacteriano LB8 influenciou positivamente no peso da biomassa fresca dos bulbos (KAFRAWI et al., 2017).

Batista et al. (2018) avaliando o potencial para promoção de crescimento de rizobactérias isoladas do guaraná, foi demonstrada os efeitos positivos de dois isolados rizobacterianos em promover o crescimento em plantas de milho, sendo uma linhagem de *Bacillus* sp. (produzindo 67,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e uma linhagem de *Burkholderia* sp. (produzindo 175  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

#### 2.4.3.3 Solubilização de fosfato

Dos sessenta e três isolados rizobacterianos avaliados quanto à capacidade de solubilização de fosfato em meio sólido contendo  $\text{CaHPO}_4$ ; quarenta e quatro isolados apresentaram halo em torno das colônias (Figura 8); representando 70% do total de isolados testados e indicando o potencial de solubilização de fosfato pelos mesmos. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

**Figura 15.** Representação do diâmetro dos halos indicadores de solubilização ( $D_h$ ) e do diâmetro da colônia ( $D_c$ ), em meio contendo fosfato de cálcio insolúvel, formados por isolados bacteriano positivo.



Os microrganismos presentes nos solos também possuem um papel importante no ciclo natural do fósforo. Outro mecanismo de promoção de crescimento vegetal pelas RPCP pode ser realizado por meio da disponibilização do fósforo insolúvel presentes nos solos tornando-os

solúveis e disponibilizando-o às plantas (VEGA, 2007; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016). Entre os gêneros bacterianos que são conhecidos por esta capacidade, estão *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Serratia* (VERMA; LADHA, 2001; GRAÇAS et al., 2015; FINKEL et al., 2017). Dessa forma, nas últimas décadas tem ocorrido o interesse para seu uso como biofertilizante comercial para maximizar o aproveitamento do P existente no solo ou do adicionado como fertilizante (DUARTE et al., 2014).

De acordo com Silva Filho e Vidor (2000), podemos organizar os isolados com resultados positivos para solubilização de fosfato em três classes: Isolados com baixo potencial de solubilização ( $ISF < 2$ ), com médio potencial de solubilização ( $2 < ISF < 3$ ) e com alto potencial de solubilização ( $ISF > 3$ ). Os isolados (RZ4PM “5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18, 28, 29, 33, 43, 44, 45, 46, 47, 50, 53, 57, 59, 61 e 62”) apresentaram alto potencial de solubilização ( $ISF > 3$ ). Já o isolado RZ4PM17 apresentou baixo potencial de solubilização ( $ISF < 2$ ).

No presente estudo 70% das rizobactérias foram capazes de solubilizar fosfato. Dentre as vinte e sete rizobactérias identificadas, é possível observar a predominância dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* apresentando altos índices de solubilização. Machado (2015) avaliou linhagens bacterianas endofíticas, isoladas do pinhão-mansão, pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Citrobacter* e essas linhagens mostraram um alto índice de solubilização de fosfato. Esses gêneros também foram relatados por outros autores. Andrade (2012), observaram a capacidade em seis diferentes linhagens de *Bacillus* sp. de solubilizar fosfato de cálcio com índices de solubilização variando de 0,42 a 2,28 em. Em uma análise do potencial de solubilização de fosfato em bactérias endofíticas isoladas de morango, Dias et al. (2009) relataram linhagens de *Bacillus subtilis* e de *B. megaterium*, capazes de solubilizar fosfato.

Quatro linhagens do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* isoladas de raízes e colmos de cana-de-açúcar também solubilizaram P em testes *in vitro* e, quando avaliadas em experimento de campo, afetaram positivamente o desenvolvimento vegetal com um aumento da germinação (55%), número de colmos (20%), altura (18%), circunferência e peso de colmos (8 e 51%, respectivamente), produtividade (39%) e a porcentagem de açúcares disponíveis (6%), quando comparados ao controle (CHAUHAN; BAGYARAJ; SHARMA, 2013).

Wang et al., (2017), comprovou a capacidade de colonização endofítica de um isolado bacteriano solubilizador de fosfato (YL6) em plantas de repolho. Essa linhagem já demonstrou elevado potencial de dissolução de P, sendo capaz de promover o crescimento dessas plantas em condições de campo.

Ibarra-Galeana et al., (2017), observaram a capacidade de linhagens de *Sinorhizobium meliloti*, *Bacillus flexus* e *Bacillus megaterium* em solubilizar fosfato tricálcico e hidróxiapatita. Durante esse processo algumas enzimas extracelulares (várias fosfatases) e importantes compostos orgânicos são liberados para dissolver o minerais.

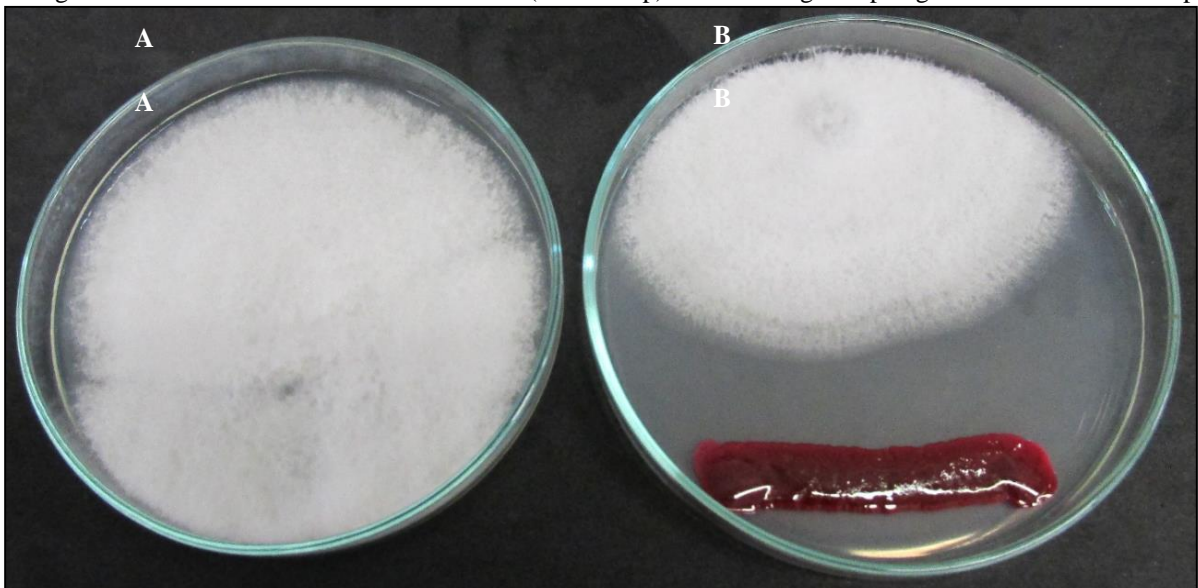
A importância da identificação de bactérias solubilizadoras de fosfato capazes de transformar o P insolúvel em formas solúveis e acessíveis às plantas não está apenas no fato de contribuir para o desenvolvimento vegetal, mas também em reduzir a necessidade ou maximizar o uso de fertilizantes manufaturados, sendo considerada como a melhor opção ecológica para fornecer P barato às plantas (HASSEN et al., 2016).

#### 2.4.4 Atividade antagônica contra fungos fitopatogênicos

Das sessenta e três rizobactérias avaliadas contra os fungos fitopatogênicos, vinte e cinco isolados apresentaram alguma atividade antagônica contra o fungo *Alternaria alternata*, vinte e sete contra *Colletotrichum* sp, dezenove contra *Fusarium oxysporium* e vinte e três contra *F. proliferatum*, conforme demonstrado na Tabela 2.

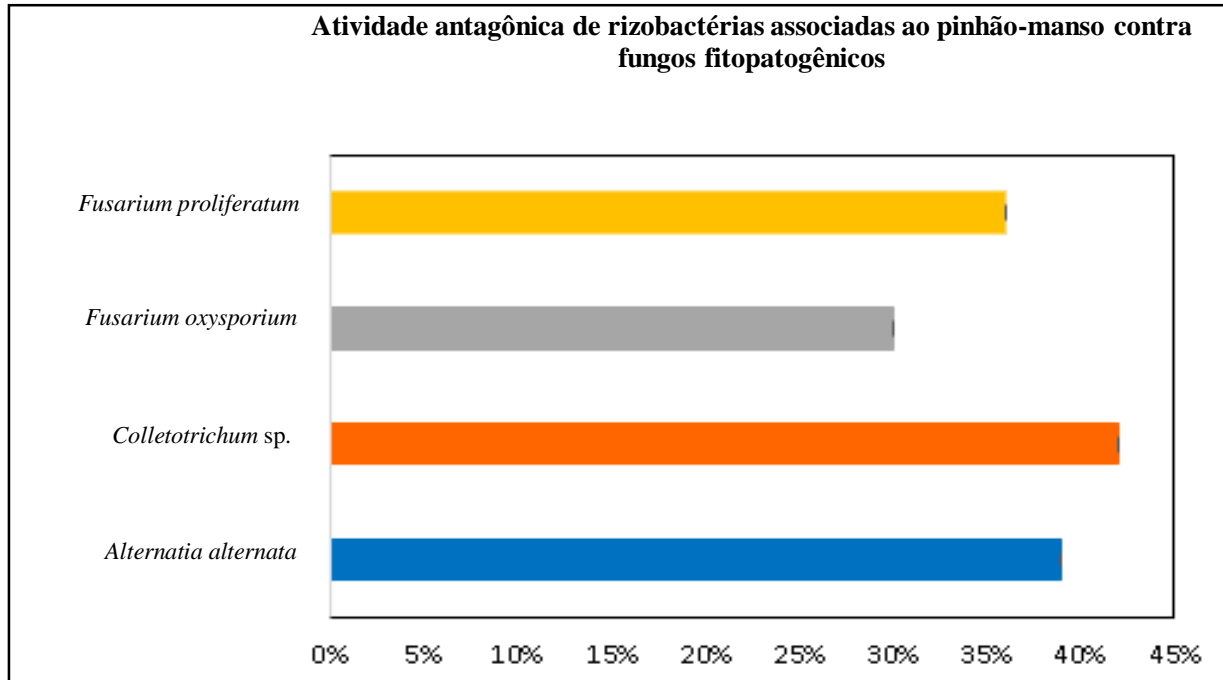
Os resultados positivos na seleção massal foram também avaliados pela técnica de pareamento direta *in vitro* conforme apresentada na Figura 10. As porcentagens totais de isolados bacterianos endofíticos com potencial antagônico testados contra as quatro espécies de fungos fitopatogênicos são apresentados na Figura 11.

**Figura 17.** A) Placa contendo apenas o fungo fitopatogênico *Colletotrichum* sp. (controle). B) Atividade antagônica do isolado rizobacteriano RZ4PM61 (*Serratia* sp) contra o fungo fitopatogênicos *Colletotrichum* sp.





**Figura 19.** Atividade antagônica dos isolados rizobacterianos associados ao pinhão-mansão contra os fungos fitopatogênicos: *Alternaria alternata*, *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporium* e *F. proliferatum*.



Nos testes *in vitro* de antagonismos contra fungos fitopatogênicos, observou-se que das 63 rizobactérias avaliadas 39% apresentaram atividade antagônica contra o fungo *Alternaria alternata*, 42% contra o fungo *Colletotrichum* spp., 30% contra o fungo *Fusarium oxysporium* e 36% contra o fungo *F. proliferatum*. Destacando-se os isolados (RZ4PM “1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 57, 58, 61, 62, 63”), onde em sua maioria destaca-se por rizobactérias pertencentes aos gêneros de *Bacillus* e *Pseudomonas*, bem como confirma o potencial de bactérias demonstrando o seu potencial antagônico contra os quatro fungos fitopatogênicos avaliados. Existem na literatura vários exemplos de estudos de biocontrole utilizando bactérias rizosféricas e endoíticas com potencial antagônico contra fungos fitopatogênicos.

Bactérias do grupo *Bacillus* são microrganismos que habitam um grande número de diferentes habitats. Eles são bem conhecidos como produtores de uma ampla gama de compostos antagonistas de diferentes estruturas predominantemente por meio de atividade inibitória no crescimento de fitopatógenos, bem como induzindo resistência sistêmica em plantas e competindo por nichos ecológicos com patógenos de plantas. As moléculas bioativas mais importantes desse gênero são peptídeos, lipopeptídeos, compostos policetídeos, bacteriocinas e sideróforos que podem ser utilizados como substitutos da utilização de fungicidas ou como um complemento ao uso desses. Em geral, esse grupo bacteriano possui um amplo espectro de ação antagônica contra bactérias, fungos e vírus patogênicos de plantas (FIRA et al., 2018).

Os resultados obtidos no presente capítulo, corroboram com os resultados obtidos por Machado (2015), onde 14 linhagens de bactérias endofíticas isoladas do pinhão-mansão identificadas como pertencentes aos gêneros *Serratia* sp. e *Bacillus* sp., demonstraram a capacidade de inibir mais de uma espécie dos fungos fitopatogênicos: *Alternaria alternata*, *Ceratocystes paraxoxa*, *Fusarium proliferatum* e *F. verticillioides*.

FRIDA et al., 2018 testou diversas cepas de *Bacillus* sp. com atividade antibacteriana e antifúngica contra fitopatógenos por meio da produção de iturina, bacilomicina, fengicina e surfactina. O sobrenadante da suspensão bacteriana livre de células demonstraram potencial antagonico contra muitos fungos fitopatogênicos e bacterianos em testes *in vitro* e *in vivo*.

De acordo com Lizárraga-Sánchez et al., 2015, a microbiolização de sementes de milho com bactérias do gênero *Bacillus* sp., tem demonstrado capacidade em reduzir a incidência e gravidade da doença causada por *F. verticillioides* em milho

Da mesma forma, a capacidade de espécies de *Serratia*, estão sendo descritas com potencial antagonico a diversos fungos fitopatogênicos. *Serratia. plymuthica* HRO-C48 tem sido usado como um agente de biocontrole bem-sucedido contra doenças fúngicas transmitidas pelo solo em morangos e colza (MÜLLER E BERG, 2008).

Uma linhagem de *Serratia nematodiphila* foi observada com potencial antagonico contra o fungo *Aspergillus parasiticus* em sementes de amendoim, sendo também capaz de reduzir os níveis de aflatoxinas produzidas por esse fitopatógeno. A capacidade dessa espécie como agente de biocontrole foi relacionada com a capacidade de produzir quitinases, enzimas capazes de degradar as paredes celulares fúngicas (WANG et al., 2013). A estirpe de *S. marcescens* 90-166 foi isolada e seleccionada com base no seu potencial como agente de controle biológico contra o *Rhizoctonia solani no algodão*, sendo uma linhagem capaz de induzir a resistência sistêmica da planta contra diversos fitopatógenos, como *Colletotrichum orbiculare*, vírus do mosaico do pepino, *Erwinia tracheiphila*, *Pseudomonas syringae* pv. *lacrimonios* e *Fusarium oxysporum* (KHEN et al., 2017).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* também são encontradas em abundancia em solos rizosféricos e tem sido amplamente relatados como potenciais agentes de biocontrole (CHU et al., 2019). O fator crucial para o sucesso do controle biológico por *Pseudomonas* está relacionado a sua capacidade de colonizar a rizosfera, podendo colonizar as raízes das plantas exercendo um efeito protetor por meio do antagonismo contra fungos e bactérias fitopatogênicas (DORJEY; DOLKAR; SHARMA, 2017)

Diniz (2018), relata uma linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (IPR45) apresentando grande capacidade de produção de metabólitos, inibindo o crescimento de *F. verticillioides* em

72,8% em testes *in vitro*, também foi observado a capacidade inibitória do filtrado do isolado IPR45 capaz de inibir 100% a germinação de conídios de *F. verticillioides*, o que foi descrito como resultado da produção de antibióticos pela bactéria.

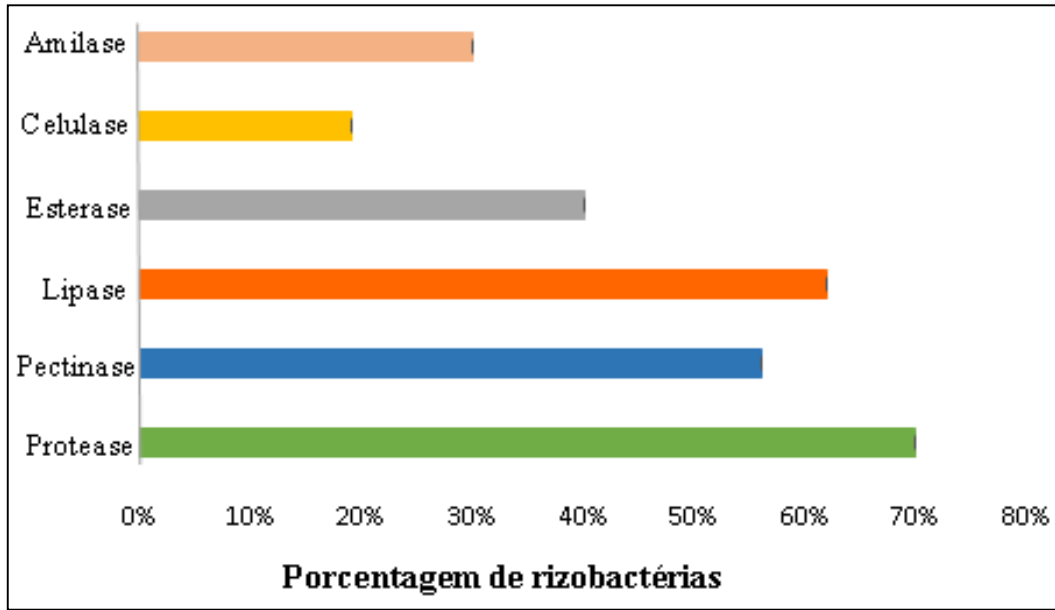
Uma das abordagens biológicas para o controle de diferentes agentes fitopatogênicos é o uso de rizobactérias com potencial de biocontrole, que é capaz de suprimir ou prevenir o dano ao fitopatógeno. O gênero de bactérias *Pseudomonas* são considerados um dos mais promissores e eficazes. *Pseudomonas fluorescences* são adequadas para aplicação como agentes de controle biológico devido à sua abundante população em solos rizosféricos, capacidade de utilizar diversos exsudatos de plantas como fonte de nutrientes, adesão às partículas do solo e ao rizoplane, síntese de antibióticos e produção de enzimas hidrolíticas (PANPATTE et al., 2016; DORJEY; DOLKAR; SHARMA, 2017).

#### **2.4.5 Produção enzimática**

Dentre os setenta e três isolados bacterianos avaliados, dezenove apresentaram atividade amilolítica, doze apresentaram atividade celulolítica, trinta isolados apresentaram atividade esterolítica, quarenta isolados apresentaram atividade lipolítica, para a atividade pectinolítica trinta e seis apresentaram atividade enzimática da poligalacturonase, dezenove isolados para pectato liase e quarenta e cinco isolados apresentaram atividade proteolítica. As porcentagens totais de atividade enzimática de todos os isolados rizobacterianos testados são apresentados na Figura 12.

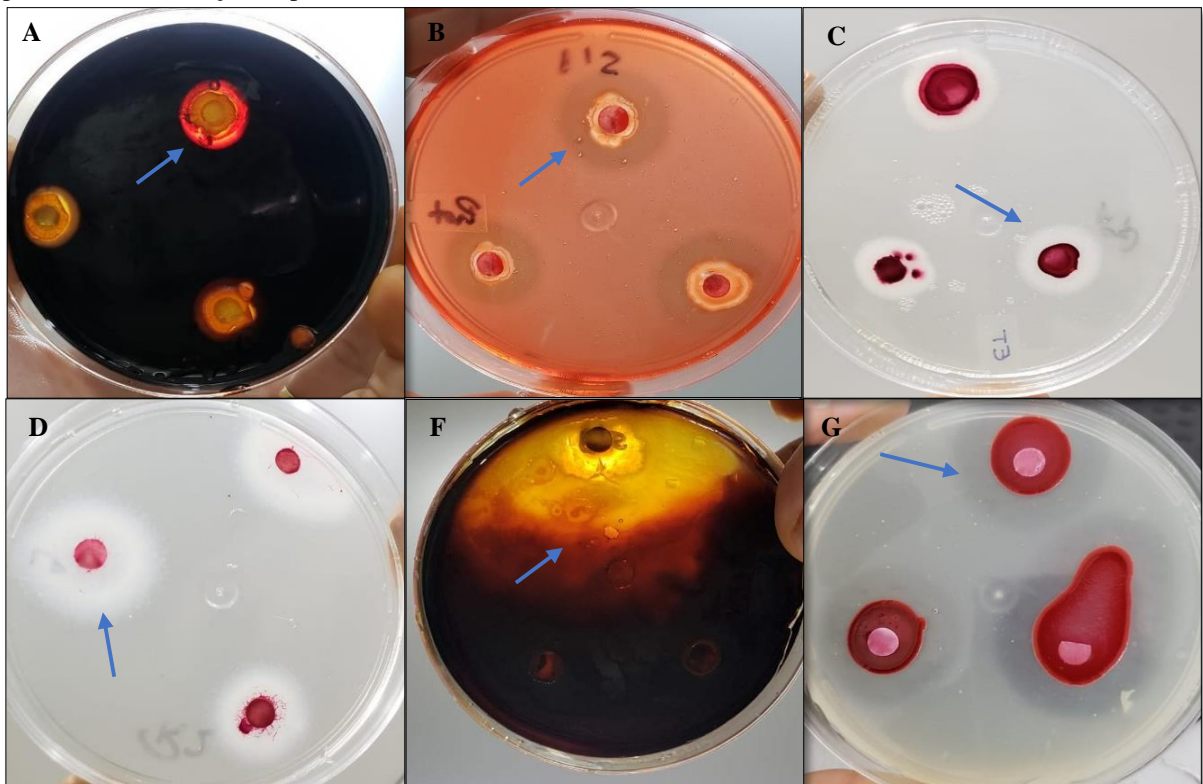
O estudo do perfil enzimático, *in vitro*, revelou que dentre as sessenta e três rizobactérias avaliadas no presente estudo, cinquenta e seis (84%) foram capazes de produzir algum tipo de atividade enzimática tais como: amilases, lipases, esterases, pectinases e proteases como parte do seu metabolismo secundário (Tabela 3).

**Figura 21.** Atividade enzimática das rizobactérias associadas ao pinhão-mansão.



No presente trabalho definiu-se como positivo os isolados que apresentaram características específicas para cada atividade enzimática conforme descrito nos itens 2.2.4.2 a 2.2.4.5. Conforme apresentado e indicado com setas na Figura 13.

**Figura 22.** Testes qualitativos de atividades enzimáticas por rizobactérias associadas ao pinhão-mansão. A) Produção de amilase; B) Produção de celulase; C) Produção de esterase; E) Produção de lípase; F) Produção de pectinase; G) Produção de protease.



Em pesquisa semelhante apresentada no presente capítulo, Bonatelli (2012), avaliou a atividade enzimática de bactérias endofíticas isoladas de folhas do guaraná da Amazônia e verificou a capacidade de 13,4% dos isolados produzir amilases, 14,8% celulases, 19,9% lípases, 20,8% esterases, 22,7% pectinases e 44% proteases. Foi observado que celulase, amilase, lípase, esterase, pectinase e protease foram produzidas por várias bactérias tanto provenientes de plantas com sintomas de antracnose e plantas aparentemente saudáveis, ressaltando valores expressivos para amilase, lípase, e poligalacturanase nas plantas sem sintomas da doença, sugerindo um efeito benéfico dessas enzimas no controle biológico.

Já Khianggam et al. (2013), isolaram e selecionaram bactérias endofíticas de plantas de manga na Tailândia para a presença de enzimas hidrolíticas. Uma linhagem de *Bacillus safensis*, que foi isolada do fruto de *Rhizophora mucronata*, foi capaz de produzir proteases, lipases, amilases. Mais de 50% dos isolados avaliados por Castro et al., (2014), produziram endoglucanase. Prasad e Dagar (2014), relatam a capacidade de isolados do abacate e de uvas pretas em produzir catalase, lípase e esterase.

Diniz (2018) descreve a capacidade de quatorze isolados endofíticos de milho capazes de produzir enzimas líticas, onde desses, onze isolados produziram pelo menos uma das enzimas líticas, 78% dos microrganismos foram capazes de produzir protease, 71% de celulase e pectinase, e somente um isolado (7%) apresentou atividade lipolítica. As enzimas hidrolíticas produzidas por microrganismos promotores de crescimento vegetal desempenham um papel importante na degradação de matéria orgânica, promoção do crescimento vegetal e redução de doenças (KAVAMURA et al., 2013).

Isolados bacterianos isolados das folhas de plantas medicinais (*Mangifera indica*, *Calotropis gigantea* e *Hibiscus rosa-sinensis*) foram testados quanto a atividade enzimática e apresentaram capacidade em sintetizar amilase, protease e celulase (VIJAYALAKSHMI et al.; 2016). Já Silpa et al. (2018), observaram a capacidade enzimática de diferentes linhagens bacterianas isoladas da rizosfera de bananeiras em produzir amilase. Dentre 23 isolados bacterianos avaliados, 10 linhagens com características morfológicas e bioquímicas distintas foram capazes de formar um halo de degradação em meio amido, indicando o potencial de diferentes espécies bacterianas em produzir enzimas hidrolíticas.

A atividade de enzimas hidrolíticas no solo da rizosfera está envolvida na decomposição de resíduos orgânicos, ciclagem de nutrientes e na manutenção da fertilidade do solo e produtividade da planta. Os microrganismos da rizosfera liberam enzimas extracelulares para a degradação inicial de polímeros de alto peso molecular, o que também pode resultar na supressão direta dos fungos patogênicos das plantas (SILPA et al., 2018).

Isto revela que estes microrganismos são uma fonte com potencial para a aplicação biotecnológica em diferentes áreas, tais como: produção de detergentes, papel, fármacos, têxtil e indústria de couro; onde a utilização de enzimas é de fundamental importância (COSTA et al., 2018).

**Tabela 3.** Avaliação das atividades enzimáticas dos isolados rizobacterianos associados ao pinhão-mansão pertencentes ao tratamento 4.

Isolados	Amilase	Celulase	Lipase	Esterase	Pectato liase	Poligalacturonase	Protease
RZ4PM1	-	-	+	+	-	-	+
RZ4PM2	-	-	+	+	-	-	+
RZ4PM3	+	-	-	-	-	-	+
RZ4PM4	-	-	+	+	+	+	+
RZ4PM5	-	-	+	+	-	-	+
RZ4PM6	-	-	+	+	+	-	+
RZ4PM7	-	-	+	+	+	-	+
RZ4PM8	-	-	+	+	+	-	+
RZ4PM9	-	-	+	+	-	-	+
RZ4PM10	-	-	+	+	+	-	+
RZ4PM11	-	-	+	+	-	-	+
RZ4PM12	-	-	-	+	+	-	+
RZ4PM13	+	-	+	+	+	+	+
RZ4PM14	+	-	+	+	-	+	+
RZ4PM15	+	-	+	+	+	+	+
RZ4PM16	+	-	+	+	+	-	+
RZ4PM17	+	-	+	+	+	-	+
RZ4PM18	+	-	+	+	-	+	+
RZ4PM19	+	-	+	+	+	-	+
RZ4PM20	-	-	-	+	-	-	+
RZ4PM21	+	-	+	+	-	-	+
RZ4PM22	-	-	-	-	+	-	+
RZ4PM23	-	-	-	-	+	-	+
RZ4PM24	-	-	+	+	+	+	+
RZ4PM25	-	-	-	-	-	-	+
RZ4PM26	-	-	+	+	-	-	+
RZ4PM27	-	-	-	-	+	-	-
RZ4PM28	-	-	-	-	+	-	-
RZ4PM29	-	-	-	-	+	-	-
RZ4PM31	-	-	-	-	-	+	-
RZ4PM34	-	+	+	+	+	+	+
RZ4PM35	-	+	+	+	+	+	+
RZ4PM36	-	-	+	+	+	-	+
RZ4PM37	-	-	-	+	+	-	+
RZ4PM38	-	-	-	+	-	-	+
RZ4PM39	-	-	-	+	-	-	+

**Tabela 3.** Avaliação das atividades enzimáticas dos isolados rizobacterianos associados ao pinhão-mansão pertencentes ao tratamento 4. (continuação)

Isolados	Amilase	Celulase	Lipase	Esterase	Pectato liase	Poligalacturonase	Protease
RZ4PM40	-	+	-	+	-	+	+
RZ4PM41	-	+	-	+	+	+	+
RZ4PM42		-	+	+	+	+	+
RZ4PM43	-	-	-	-	+	-	+
RZ4PM44	+	-	+	-	+	+	+
RZ4PM46	+	-	-	-	-	-	-
RZ4PM49	-	-	-	-	+	-	+
RZ4PM52	-	+	-	+	-	+	+
RZ4PM53	+	+	-	-	+	+	-
RZ4PM54	+	-	-	+	+	-	-
RZ4PM55	-	-	-	-	+	-	-
RZ4PM56	+	-	+	+	+	-	+
RZ4PM57	-	+	-	+	-	-	+
RZ4PM58	+	-	-	+	+	+	+
RZ4PM59	-	+	-	-	+	-	-
RZ4PM60	-	+	-	-	-	-	+
RZ4PM61	-	-	+	+	-	-	+
RZ4PM62	-	-	+	+	-	-	+
RZ4PM63	+	+	+	+	+	+	+

## 2.5 Conclusão

Tendo em vista os objetivos propostos e os resultados obtidos no presente capítulo, as seguintes considerações podem ser apresentadas:

- a) Foi possível cultivar um total de 250 isolados bacterianos rizosféricos associados ao pinhão-mansão de diferentes tratamentos de irrigação, sendo selecionado 63 isolados do tratamento irrigado por gotejamento com reposição de 75% da evapotranspiração, pois apresentou maior diversidade de morfologia dos isolados e maior frequência de isolamento.
- b) Pela análise da diversidade rizobacteriana do pinhão-mansão encontrada nos 27 isolados identificados pelo sequenciamento parcial do gene 16S rDNA; observou-se a presença dos gêneros *Bacillus*; *Chryseobacterium*; *Enterobacter*; *Klebsiella*; *Pseudomonas*; *Staphylococcus* e *Serratia*.

- c) Das 63 rizobacterias avaliadas para fatores de crescimento *in vitro*, 25% foram capazes de fixar nitrogênio, 100% sintetizaram AIA e 70% solubilizaram fosfato inorgânico. Para avaliação do controle biológico, 39% dos isolados rizobacterianos apresentaram atividade antagônica contra *Alternaria alternata*, 42% contra *Colletotrichum* sp., 30% contra *Fusarium oxysporum* e 36% contra *F. proliferatum*.
- d) Os testes de atividade enzimática *in vitro* revelaram que 30% dos isolados rizobacterianos apresentaram atividade amilolítica, 19% celulolítica, 40% esterolítica, 26% lipolítica, 30% pectinolítica e 70% proteolítica.



### **CAPÍTULO 3**

## **ANÁLISE DA DIVERSIDADE BACTERIANA RIZOSFÉRICA ASSOCIADA AO PINHÃO-MANSO POR METAGENÔMICA**

## Resumo

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma planta arbustiva de ciclo perene, pertencente à família das Euforbiáceas, originária da América Central e atualmente vegeta espontaneamente em diversas regiões do planeta. A rizosfera é a zona de contato entre o solo e as raízes das plantas, sendo um importante nicho microbiológico. Esta composição das comunidades microbianas que colonizam a rizosfera é influenciada principalmente pelas espécies de plantas e características do solo. Na interação planta-microrganismo, são encontradas bactérias atraídas por secreções exsudados das raízes e algumas dessas são denominadas de rizobactérias. Essas bactérias são consideradas promissoras para as áreas agrícolas e industriais. Diversas pesquisas buscam conhecer a diversidade e a distribuição dessas comunidades microbianas bem como o seu potencial biotecnológico. Neste capítulo objetivou-se caracterizar e comparar a diversidade da comunidade bacteriana de solo rizosférico de pinhão-manso provenientes de três tratamentos: não irrigada/sequeiro, irrigação por gotejamento e irrigação por pivô, mostrando a abundância relativa dos principais grupos bacterianos presentes nesses tratamentos. No amplo nível taxonômico, foi possível identificar nas amostras, sequências dos filós Acidobacteria e Chloroflexi, 4 ordens (Acidimicrobiales, Chthoniobacterales, Gaiellales e Rhodospirillales), 7 famílias (Solibacteraceae, Chitinophagaceae, Acidobacteriaceae, Tepidisphaeraceae, Nitrosomonadaceae, Gemmatimonadaceae e Xanthobacteraceae e 8 gêneros (*Acidothermus*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Bryobacter*, *Reyranela*, *Sphingomonas*, *Steroidobacter* e *Variibacter*). Os resultados demonstram que não houve aumento significativo de diversidade em nenhum tratamento avaliado. No entanto, a riqueza de espécies foi aumentada nas áreas de gotejamento e pivô quando comparadas com a área não irrigada. Os grupos bacterianos que se diferenciaram significativamente entre o tratamento irrigados por pivô e o tratamento sequeiro são o gênero *Bryobacter* e o Filo Chloroflexi. Os resultados mostraram que o tratamento irrigado por gotejamento é o mais distante de todo o grupo, enquanto que as áreas de pivô e sequeiro apresentaram similaridade entre si.

**Palavras-chave:** Metagenômica, Rizosfera, Comunidade Bacteriana, Gene 16S.

## Abstract

The physic nut (*Jatropha curcas* L.) is a shrubby perennial-growing plant belonging to the Euphorbiaceae family, which originates in Central America and currently grows spontaneously in several regions of the planet. The rhizosphere is the contact zone between the soil and the roots of the plants, being an important microbiological niche, this composition of the microbial communities that colonize the rhizosphere are influenced mainly by the species of the plants and characteristics of the soil. In the interaction plant-microorganism, bacteria are attracted by secretions of the roots and some of these are denominated of rhizobacteria and are considered promising for the agricultural and industrial areas. Several researches seek to know the diversity and distribution of these microbial communities as well as their biotechnological potential. In this chapter we aimed to characterize and compare the diversity of the bacterial community of jatropha rhizospheric soil from three treatments: non-irrigated/dryland, drip irrigation and pivot irrigation, showing the relative abundance of the main bacterial groups present in these treatments. In the broad taxonomic level, it was possible to identify in the samples, sequences of the Acidobacteria and Chloroflexi phyla, 4 orders (Acidimicrobiales, Chthoniobacterales, Gaiellales and Rhodospirillales), 7 families (Solibacteraceae, Chitinophagaceae, Acidobacteriaceae, Tepidisphaeromonade and Genuseeraceae) (*Acidothermus*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Bryobacter*, *Reyranella*, *Sphingomonas*, *Steroidobacter*, and *Variibacter*). Results show no significant increase in diversity in any evaluated treatment. However, species richness was increased in drip and pivot areas when compared to The non-irrigated area. The bacterial groups that differed significantly between pivot-irrigated and rain-fed treatments are the *Bryobacter* genus and the Chloroflexi Phylum. The results showed that drip irrigated treatment is the most distant from the whole group, while that the areas d and pivot and rainfed presented similarity to each other.

**Keywords:** Metagenomics, Rhizosphere, Bacterial Community, 16S Gene

### 3 Introdução

A região biologicamente ativa do solo ao redor das raízes das plantas é conhecida como rizosfera, e que abriga micróbios do solo, incluindo bactérias e fungos, que influenciam as raízes por meio de suas interações biológicas, físicas e químicas. . Parte essencial do sistema solo, os organismos que o habitam possuem funções de grande importância, tais como a degradação de compostos orgânicos, ciclagem de nutrientes, a fixação biológica de nitrogênio, ou o auxílio às plantas na absorção de nutrientes (ANDREOTE e SILVA, 2018). Portanto, é imperativo estudar as interações entre plantas e esses microorganismos do solo para entender vários processos relacionados à planta. Diferentes gêneros bacterianos são componentes vitais dos solos. Eles estão envolvidos em várias atividades bióticas do ecossistema do solo para torná-lo dinâmico para o retorno de nutrientes e sustentável para a produção agrícola (AHEMAD e KIBRET 2014).

A caracterização dessas comunidades microbianas permite elucidar os processos ecológicos que direcionam interações microrganismo e seus hospedeiros. O conhecimento da composição e da estrutura das comunidades microbianas é suma importância para que o entendimento dos seus papéis e das suas funções ecológicas (NELSON et al., 2014).

A maioria dos microrganismos presentes no solo ainda não está caracterizada e representam um reservatório enorme de diversidade genética e metabólica ainda não muito explorado (MENECHINE, 2016). Os genomas destas espécies, principalmente as não-cultiváveis, codificam um reservatório inexplorado de novas de moléculas bioativas e importantes metabólitos (PARIKH, 2012).

Aspectos físicos e químicos do solo tais como temperatura, aeração, disponibilidade de nutrientes substratos orgânicos, exercem forte influencia na composição da comunidade microbiana presente da rizosfera (VARGAS et al., 2004).

O avanço das tecnologias de biologia molecular aplicada a estudos de diversidade tem permitido seu acesso mais abrangente e a melhor compreensão das interações das comunidades microbianas nos diferentes ambientes.

A metagenômica pode ser descrita como a análise funcional e genômica de uma comunidade microbiana contidos em uma amostra ambiental sem que haja necessidade do cultivo (HANDELSMAN, 2004; WOOD; SALZBERG, 2014). Essa análise é realizada por meio da extração do DNA total dos organismos das amostras e utilização de metodologias de biologia molecular envolvendo a clonagem de fragmentos de tamanho grande.

Os métodos independentes de cultivo permitem o acesso a espécies microbianas que não

podem ser cultivadas em condições normais de laboratório e apresentam grande impacto sobre o entendimento das comunidades microbianas no ambiente. Os avanços científicos e tecnológicos, incluindo os novos procedimentos de extração de ácidos nucléicos e o sequenciamento de nova geração (SNG), permitem análises da diversidade da comunidade microbiana, da sua abundância e das suas funções no ambiente (PYLRO et al., 2014).

A identificação de microrganismos presentes na rizosfera das diferentes culturas agrícolas permite realizar pesquisas que avaliam a biodiversidade genética bacteriana desses ambientes. Tais estudos podem promover avanços consideráveis, como a busca por enzimas envolvidas no processo de obtenção de biocombustíveis, por exemplo.

É o caso do pinhão-mansão, que é uma oleaginosa promissora como matéria-prima para a obtenção de óleo destinado à produção de biodiesel (LAVIOLA et al., 2015; KUMAR; SRIVASTAVA; JAI, 2016) e vem sendo estudada amplamente por ser uma planta rústica de fácil cultivo, com baixos custos de produção e possível de ser cultivada economicamente em quase todas as regiões brasileiras.

### **3.1 Objetivos**

#### **3.1.1 Objetivo geral**

Avaliar a biodiversidade da comunidade bacteriana do solo rizosférico de pinhão-mansão em três diferentes áreas de cultivo na região central do Estado de São Paulo. Dessa forma, poderemos inferir o quanto o manejo, no que se refere à irrigação, está afetando a comunidade bacteriana do solo, seja por meio de perda ou alteração da diversidade bacteriana local.

#### **3.1.2 Objetivos específicos**

- 1) Sequenciar por metagenômica a microbiota do solo rizosférico de três áreas de cultivo e manejo de irrigação do pinhão-mansão: sequeiro, gotejamento e pivô;
- 2) Caracterização da diversidade taxonômica a partir da microbiota do solo rizosférico de pinhão-mansão.

## 3.2 Material e Métodos

### 3.2.1 Coleta das amostras de solo rizosférico

As amostras de solo rizosférico de pinhão-mansão foram coletadas em maio de 2017 na Fazenda Areão da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP em Piracicaba, Estado de São Paulo; latitude 22°42’30”S, longitude 47°30’00” e altitude de 546 m. A área experimental onde as amostras de solos rizosféricos foram coletadas faz parte do Proc. FAPESP 2013/25686-2 (Título do projeto: “Estimativa da transpiração do pinhão-mansão com a utilização do método de dissipação térmica”) sob a coordenação Prof. Marcos Vinícius Folegatti do Departamento de Engenharia de Biosistemas, ESALQ/USP.

O solo foi classificado como Nitossolo Vermelho (EMBRAPA, 2018), apresentando textura argilosa e densidade média de 1.300 kg m<sup>-3</sup> na camada de 0 a 1 m de profundidade. O clima é do tipo subtropical úmido (Cwa), segundo a classificação de Köppen, apresentando verão chuvoso e inverno seco, precipitação média anual de 1.257 mm e temperatura média anual de 21,4 °C, sendo a média no inverno de 17,1 °C e a média no verão igual a 24,8 °C.

Os seguintes locais de estudo foram selecionados com base em suas diferenças de manejo do solo:

- Sequeiro (SEQ): sem irrigação;
- Gotejamento (GOT): irrigação por gotejamento com reposição de 75% da evapotranspiração da cultura;
- Pivô (PIV): irrigação por pivô central.

De cada área amostrada, foi coletado solo rizosférico de nove plantas saudáveis de forma aleatória, respeitando a profundidade de 30 cm abaixo da superfície do solo e aderido às raízes. As amostras foram armazenadas em sacos de plástico para o transporte para o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas - LaMiB, UFSCar, São Carlos, SP.

### 3.2.2 Extração do DNA, normalização das amostras e preparo dos *pools*

O DNA total de cada amostra foi extraído usando o PowerSoil DNA Isolation Kit (Catálogo # 12888) de acordo com o protocolo do fabricante (MoBio Laboratories, Inc.). Para o protocolo de extração, foram utilizados aproximadamente 0,25 g de solo rizosférico.

A integridade do DNA extraído foi avaliada por gel de eletroforese em gel de agarose (0,7% p/v) a (3 volts.cm<sup>-1</sup>) em 1 x tampão TEB e corado com GelRed™, utilizando marcador molecular (1 kb DNA Ladder RTU - KASVI).

O DNA genômico de cada amostra foi purificado usando o Kit QIAamp Fast DNA Stool Mini (QIAGEN, Hilden, Alemanha) de acordo com o fabricante, e então a quantificação e qualidade do DNA foram avaliadas usando o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Healthcare, Marlborough, EUA). O DNA extraído foi mantido à temperatura de -20 °C até o momento do ensaio.

### 3.2.3 Amplificação do DNA

Após a confecção dos *pools*, todos os DNAs foram purificados com *beads* magnéticas para realizar as amplificações da região hipervariável do gene 16S rDNA pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

As reações da PCR foram feitas em triplicata de amostras, tendo como volume final de 20 µL, contendo 10 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0,3 µM de oligonucleotideo forward e 0,3 µM de oligonucleotideo reverse, 20 ng de DNA genômico e água ultrapura esterilizada suficiente para 20 uL.

### 3.2.4 Confecção das bibliotecas metagenômicas e sequenciamento

Foram amplificadas aproximadamente 460 pb do DNA que codifica para o RNA ribossomal 16S por PCR, usando iniciadores específicos que amplificam as regiões variáveis V3 e V4 deste gene.

As sequências iniciadoras utilizadas para a amplificação desta região e suas respectiva sequências foram:

16S	Amplicon	PCR	Forward	Primer:
5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG3'				
16S	Amplicon	PCR	Reverse	Primer:
5'TCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC				
3'				

Os produtos de PCR foram utilizados para construir a biblioteca metagenômica para sequenciamento utilizando o kit de Reagente MiSeq v3 (ciclo 600) (Illumina Inc.).

Cada amostra foi identificada unicamente a partir de adaptadores específicos que foram

ligados a cada biblioteca.

O sequenciamento parcial do gene que codifica para o RNA ribossômico 16S foi realizado pelo método de sequenciamento de última geração usando a plataforma Illumina MiSeq que produziu milhares de leituras de 300 pb ( $2 \times 300$  pb) para cada biblioteca.

### **3.2.5 Análise dos dados de sequenciamento**

As leituras de sequenciamento da porção V3-V4 do gene 16S rRNA foram analisadas, utilizando o software USEARCH v10.0.240 (EDGAR, 2010). Inicialmente, os pares de leituras complementares foram montados e em seguida filtrados por qualidade para remoção sequências com baixa qualidade.

As unidades taxonômicas operacionais (OTU) foram identificadas com base nas sequências de DNA das amostras. Em seguida, os índices de diversidade, dominância, equabilidade e riqueza de cada amostra (índices de Shannon, Simpson, Buzas-Gibson e Chao, respectivamente com estatística) foram calculados.

A identificação taxonômica das OTUs encontradas foi realizada a partir da comparação com a base de dados SILVA v123 LTP (<https://www.arb-silva.de/>). Foi realizado o agrupamento da composição de espécies entre as amostras (amostras  $\geq 1\%$ ).

Para analisar a significância de nossos resultados foram feitas comparações múltiplas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparações par-a-par com teste não paramétrico de Wilcoxon.

Todos os tratamentos foram comparados entre si. Adotou-se o nível de significância estatística 0,05. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando o software R (<https://www.r-project.org/>).

## **3.3 Resultados e Discussão**

### **3.3.1 Avaliação e análise de unidades taxonômicas operacionais (OTUs)**

A análise de metagenoma foi realizada em amostras de solo rizosférico de pinhão-manso cultivados sob diferentes tratamentos: sequeiro (SEQ), gotejamento (GOT) e pivô (PIV). Foram sequenciadas a porção 16S do DNA ribossômico das bactérias que tiveram os DNAs extraídos. As amostras foram tratadas por bioinformática e classificadas de acordo com sua similaridade

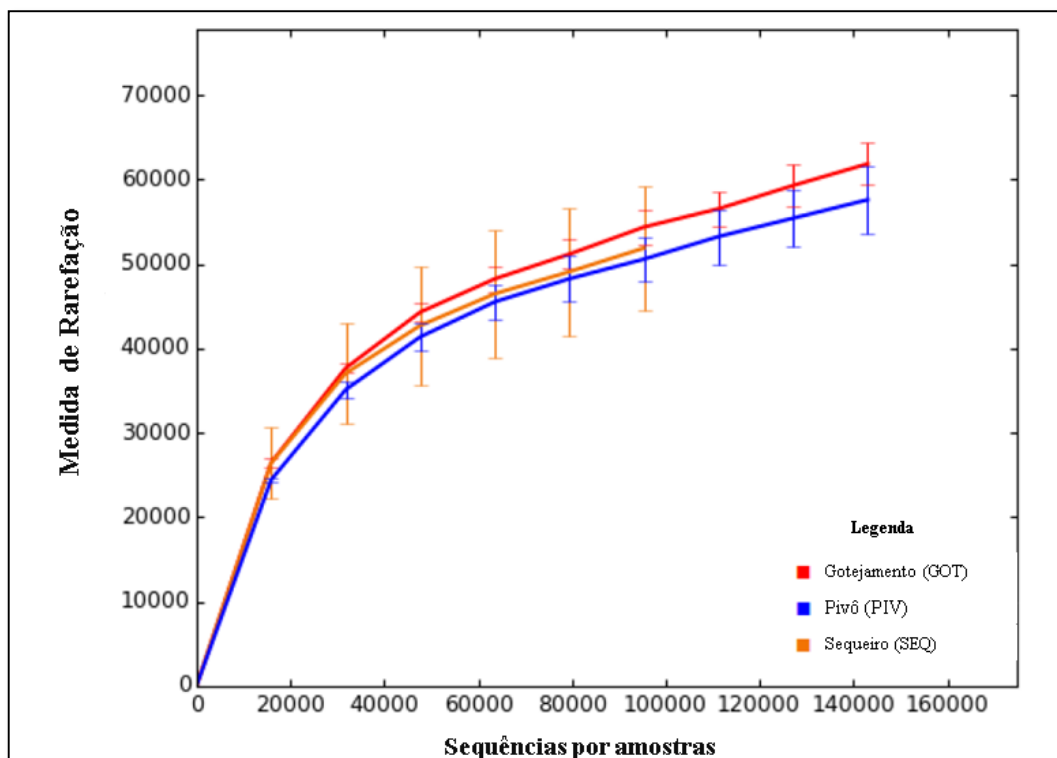


sendo agrupada na forma de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU- do inglês Operational Taxonomic Unit). Cada OTUs refere-se a uma bactéria específica sequenciada.

A análise metagenômica da microbiota da rizosfera do pinhão-mansô revelou uma média considerando 99% de similaridade entre as espécies. Em qualquer amostragem de uma comunidade, o número de tipos de organismos observados aumenta com o número de amostras, até que todos os tipos sejam observados. Essa relação fornece informações sobre a diversidade total da comunidade amostrada. Esse padrão pode ser visualizado por meio da curva de rarefação (Figura 14).

Uma curva cumulativa é o gráfico do número acumulado de tipos observados pelo número de indivíduos amostrados. Como todas as comunidades contêm um número finito de espécies, se a coleta de amostras continuasse, as curvas eventualmente alcançariam uma reta no número real de riqueza da comunidade. Assim, essas curvas contêm informações sobre quão boa é a amostragem da comunidade estudada. Quanto mais a curva se aproximar de uma reta horizontal, melhor é a amostragem. Nesse caso, a curva expressa a quantidade de sequências em relação a novas OTUs identificadas. Para verificar se os números de sequências foram suficientes para uma cobertura importante de todas as bactérias, realizou-se a construção de uma curva de rarefação.

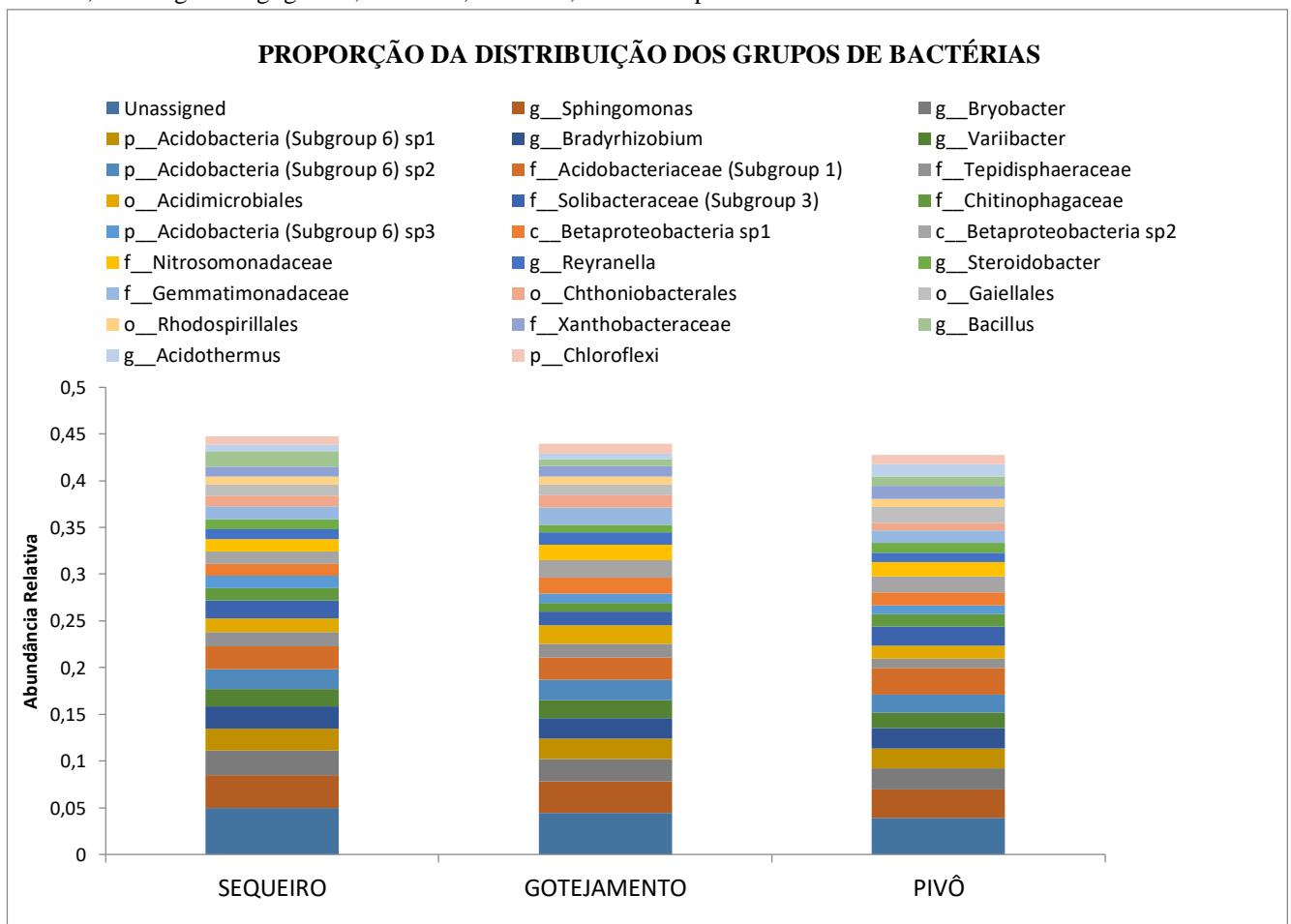
**Figura 24.** Curva de rarefação de bactérias rizosféricas associadas ao pinhão-mansô sob diferentes tratamentos: sequeiro (SEQ), irrigação por pivô (PIV) e irrigação por gotejamento (GOT) para avaliação da cobertura das sequências em identificação de novas OTUs.



### 3.3.2 Classificação taxonômica de OTUs

As OTUs presentes na população de amostras acima de 1,0 % foram agrupadas de acordo com o nível mais profundo de classificação taxonômica. Os resultados evidenciaram que para as populações mais abundantes, assim como para todo o universo de dados analisados, as comunidades bacterianas também não diferiram significativamente entre si nos diferentes tratamentos (Figura 15).

**Figura 26.** Análise da diversidade microbiana na população de bactérias rizosféricas associadas ao pinhão-mansô sob diferentes tratamentos: sequeiro (SEQ), gotejamento (GOT) e pivô (PIV), presente em índices superiores a 1,0 %. Legenda: g=gênero, f=família, o=ordem, c=classe e p=filo



### 3.3.3 Avaliação da diversidade de grupos bacterianos

Para a avaliação da diversidade e riqueza de grupos bacterianos presentes na população total de OTUs entre os tratamentos, foram calculados os índices de Shannon e Jackknife de 1ª ordem, respectivamente. Estes índices são baseados nas abundâncias proporcionais das espécies

e são muito utilizadas em ecologia de população, levando em conta, tanto a uniformidade (equitabilidade) quanto a riqueza de espécies. O aumento do número de espécies ou o aumento da uniformidade das abundâncias aumenta a diversidade.

O índice mais utilizado para a determinação de diversidade é o índice de Shannon-Wiener ( $H'$ ), procedente da teoria da informação de 1948. Este índice dá maior peso para as espécies raras, e é obtido pela equação:

$$H' = -\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i$$

Onde  $S$  é o número de espécies,  $p_i$  é a proporção da espécie  $i$ , estimada como  $ni/N$ , onde  $ni$  é a medida de importância da espécie  $i$  (número de indivíduos, biomassa), e  $N$  é o número total de indivíduos (Shannon, 2001).

Já o método Jackknife de 1ª ordem estima a riqueza total utilizando o número de espécies que ocorrem em apenas uma amostra (*uniques*). A estimativa de riqueza é calculada pela equação:

$$E_D = S_{obs} + S_1 \left( \frac{f-1}{f} \right)$$

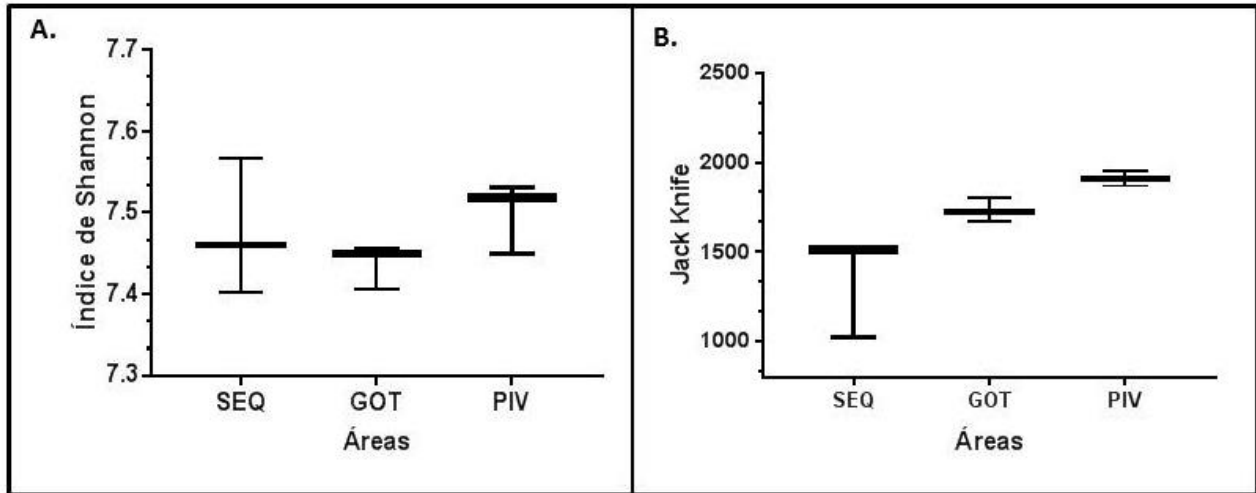
Em que:  $S_{obs}$  = número de espécies observadas;  $S_1$  = o número de espécie que está presente em somente um agrupamento (espécie de um agrupamento) e  $f$  = o número de agrupamento que contém *iésima* espécie de um agrupamento (Palmer 1990).

Os resultados demonstram que em nenhum dos tratamentos avaliados houve aumento significativo de diversidade, o que significa dizer que todas as populações, nos tratamentos avaliados apresentavam, aproximadamente, o mesmo conjunto de populações bacterianas.

A

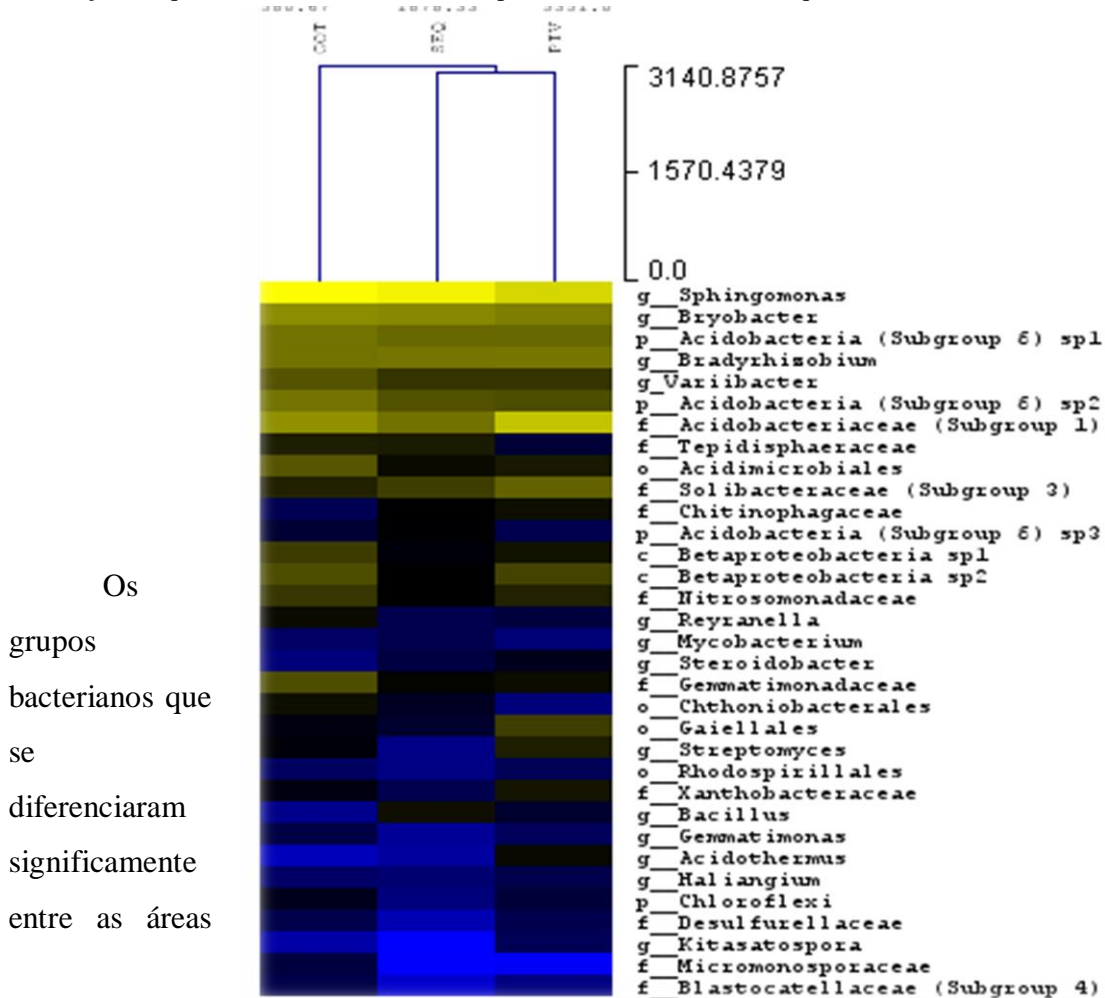
riqueza de espécies foi aumentada nas áreas de gotejamento e pivô, segundo o índice de Jackknife, que consiste em uma função do número de espécies únicas que ocorrem em somente uma amostra (Heltshel and Forrester 1983) (Figura 16). Quanto maior o valor observado maior será o número total de espécies presentes nessa comunidade. Ou seja, ô estavam enriquecidas (tinham maior quantidade) de um ou mais grupos de bactérias.

**Figura 28.** Índice de diversidade (Shannon) e riqueza de espécies bacterianas (Jackknife) sob diferentes tratamentos avaliados: sequeiro (SEQ), gotejamento (GOT) e pivô (PIV).



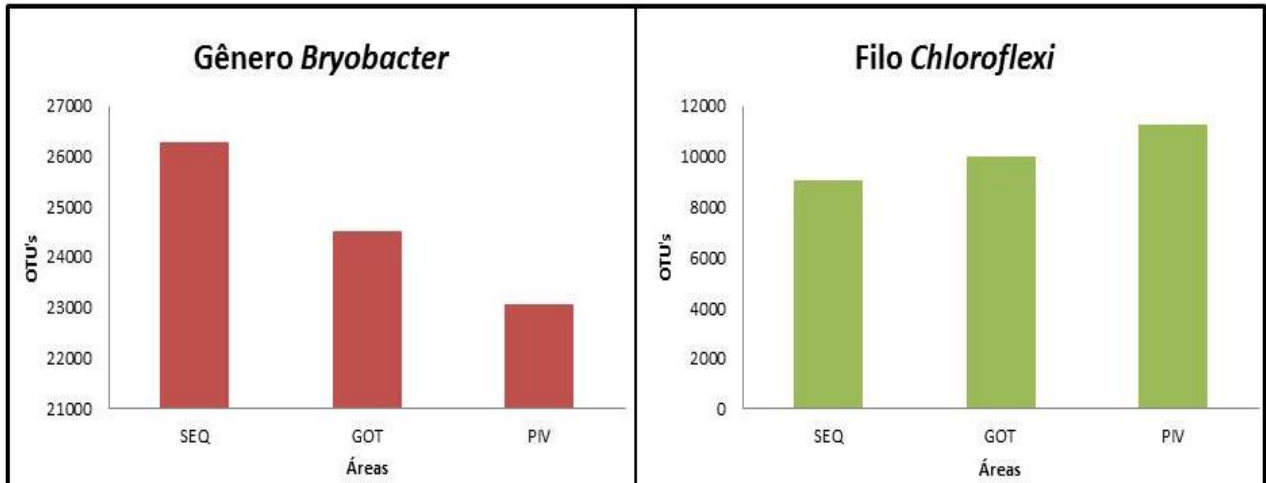
Os resultados mostraram que a área GOT é a mais distante de todo o grupo, enquanto que as áreas de pivô e sequeiro apresentaram similaridade entre si. (Figura 17).

**Figura 29.** Heatmap de grupos taxonômicos presentes nas diferentes áreas onde foram obtidas amostras de solo rizosférico de pinhão-mansó em diferentes tratamentos. A composição microbiana foi avaliada para identificar a diferença na riqueza nas diferentes áreas. Grupos com abundância menor que 1% não foram considerados.



de pivô e sequeiro são o gênero *Bryobacter* e o Filo Chloroflexi conforme demonstrado na (Figura 18). Os resultados mostraram que a área de gotejamento é a mais distante de todo o grupo, enquanto que as áreas de pivô e sequeiro apresentaram similaridade entre si.

**Figura 31.** Grupos bacterianos associados a rizosfera do pinhão-mansô que apresentaram diferença significativa de OTU's, observados entre os tratamentos avaliados: sequeiro (SEQ), gotejamento (GOT) e pivô (PIV).



O estudo da diversidade de comunidades bacterianas na rizosfera das plantas são muito importantes, pois esses microrganismos podem exercer efeito benéfico ou patogênico direto sobre as plantas. Apesar da abundância de espécies bacterianas na rizosfera, a grande maioria destas espécies não podem ser cultivadas. A análise metagenômica fornece informações detalhadas sobre a diversidade, composição, riqueza, estrutura e função microbiana (QAISRANI et al., 2019).

No amplo nível taxonômico, foi possível identificar nas amostras, sequências dos filós de Acidobacteria e Chloroflexi, 4 ordens (Acidimicrobiales, Chthoniobacterales, Gaiellales e Rhodospirillales), 7 famílias (Solibacteraceae, Chitinophagaceae, Acidobacteriaceae, Tepidisphaeraceae, Nitrosomonadaceae, Gemmatimonadaceae e Xanthobacteraceae) e 8 gêneros (*Sphingomonas*, *Acidothermus*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Bryobacter*, *Reyranelia*, *Steroidobacter* e *Variibacter*). Essa estabilidade de filo e estrutura da comunidade é observada, considerando questões físicas e químicas do solo (temperatura, pH, propriedades do solo, regime de nutrientes e/ou disponibilidade de água)

Geralmente a microbiota presente no solo é rica em espécies de crescimento lento, com tamanho populacional mais estável. Os grupos taxonômicos das comunidades microbianas de solos, pertencem a nove grandes filós bacterianos: Proteobacteria, Actinobactérias, Acidobactéria, Chloroflexi, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia e Gemmatinomadetes. (DESANTIS et al., 2006). Ambos os filós encontrados no presente estudo

são constantemente relatados em estudos de perfis da diversidade genética de rizobactérias de diversas culturas agrícolas como cana-de-açúcar (COSTA et al., 2014), milho (CORREA-GALEOTE, 2016; QAISRANI et al., 2019), soja (CHANG et al., 2018), algodão (ULLAH et al., 2018)

Membros do filo Chloroflexi (gênero representativo: *Chloroflexus*) são as chamadas bactérias verdes não sulfurosas. Essas bactérias obtêm energia mediante fotossíntese sem a utilização de enxofre em seu metabolismo e vivem em ambientes aeróbios, sendo essas as características que as diferenciam das Chlorobia. Apesar de serem autotróficas e utilizarem CO<sub>2</sub> na fotossíntese, espécies de *Chloroflexus* podem crescer heterotroficamente no escuro utilizando açúcares, aminoácidos e outros ácidos orgânicos para a obtenção de carbono (TORTORA, FUNKE e CASE, 2017; WARD, et al., 2018). ULLAH et al., 2018, observaram maior abundância do filo Chloroflexi quando associados ao estresse hídrico da cultura do algodão. Esse filo vem sendo documentado como bactérias termofílicas aeróbicas/anaeróbicas que crescem bem em condições de seca (YAMADA et al., 2005; WARD et al 2018).

No presente trabalho os resultados são divergentes a estes estudos, uma vez que houve um aumento desse filo no tratamento irrigado por pivô, uma possível explicação para esses resultados pode estar relacionada à água utilizada nos tratamentos irrigados, uma vez que houve um aumento crescente entre os tratamentos SEQ, GOT e PIV. A água utilizada nos tratamentos era proveniente do rio Piracicaba. Alguns autores relatam a abundância em uma variedade de ambientes, incluindo ambientes aquáticos (OKAZAKI; HODOKI; NAKANO, 2013; MEHRSHAD, et al., 2018). Até o presente momento não foram relatados atividades de promoção de crescimento desse grupo bacteriano

As Acidobacterias representam um dos filos mais abundantes do planeta e podem representar até 52% da comunidade bacteriana total (DUNBAR et al., 2002; SAIT et al., 2002). No entanto, apesar de sua alta abundância em diversos habitats, informações sobre o papel desses microrganismos no funcionamento dos ecossistemas terrestres ainda estão pouco elucidados. Uma lacuna que pode ser atribuída em grande parte às dificuldades em cultivar a maioria das *Acidobacteria* e sua ausência nas coleções de cultura bacteriana (NAVARRETE et al., 2013). Essa lacuna evidente de conhecimento decorre em grande parte das dificuldades associadas ao cultivo dessas bactérias por meios clássicos (KIELAK et al., 2016).

Mudanças nos métodos tradicionais de cultivo de bactérias dos solos melhoraram significativamente o isolamento de cepas de *Acidobacteria* nos últimos anos. Essas novas estratégias envolvem o uso de concentrações relativamente baixas de nutrientes, fontes não tradicionais de carbono ou polissacarídeos complexos, períodos mais longos de incubação,

utilização de goma gelana como agente solidificante, bem como condições atmosféricas diferenciadas de incubação, adição de emendas de inibidores para organismos indesejáveis e alteração de extratos ambientais em meios de crescimento (KIELAK et al., 2016).

Solibacteraceae foram observadas associadas em diferentes cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) com níveis variáveis de resistência ao fungo fúngico da raiz *Fusarium oxysporum* (MENDES et al., 2017). Em outros estudos Jiang et al., (2017) analisaram as comunidades microbianas das rizosferas de macieiras perenes e mudas de macieira e observaram, que características do solo e a disponibilidade de nutrientes exerceram um efeito positivo sobre as *Acidobacteriaceae*. Assim, as propriedades do solo, especialmente o pH e a matéria orgânica, influenciam a abundância de microrganismos benéficos do solo (JIANG et al., 2017).

De acordo com Bailey et al., (2013) a família *Chitinophagaceae* esta associada a alta atividade B-glicodídica em solos e gêneros desta família vem sendo avaliados quanto ao potencial na biodegradação dos plásticos (SOUZA, 2015).

Os membros dos Rhodospirillales são divididos entre duas famílias, a Rhodospirillaceae e a Acetobacteraceae (GARRITY et al. 2005). A maioria dos membros das Rhodospirillaceae possui formato espiral e cresce em condições anóxicas ou microaeróbicas. Acetobacteraceae, em contraste, são mais frequentemente em forma de bastão ou coccus e aeróbica. Os membros não fotossintéticos de Rhodospirillaceae incluem o gênero fixador de nitrogênio *Azospirillum*, frequentemente encontrado vivendo no solo ou em associação com plantas (embora, ao contrário do gênero *Rhizobium*, mais conhecido como fixador de nitrogênio, o *Azospirillum* não seja encontrado especificamente em associação com nódulos radiculares).

A abundância do gênero *Bryobacter* foi influenciada de acordo com os tratamentos avaliados, sendo mais expressiva no tratamento sequeiro. Este grupo de bacteriano é conhecido por ser mais abundante em ambientes com baixa disponibilidade de carbono (FIERER et al. 2007) e muitos membros de Acidobacteria possuem maior abundância em solos alcalinos (DUNBAR ET AL. 2002; ROUSK et al. 2010). A área com maior abundância foi a área de sequeiro, pode ter sido influenciada pelo pH do solo, onde possivelmente, a área do tratamento não irrigado apresenta um pH mais alcalino do que o solo dos demais tratamentos. Essa hipótese é levantada, pois a água é um dos fatores que afetam a acidificação do solo. Os elementos alcalinos tais como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , são lixiviados das camadas superiores pelas águas contendo  $\text{CO}_2$ , sendo substituídos nos colóides pelos íons  $\text{H}^+$  (RONQUIM, 2010).

Em estudos conduzidos por Xue et al., (2017) sobre a estrutura da comunidade bacteriana do solo durante a restauração da vegetação em área de desertificação, observaram

que o pH foi o principal determinante das características da comunidade bacteriana incluindo o gênero *Bryobacter*.

Alguns dos gêneros observados no presente estudo são conhecidos como habitantes da rizosfera em diferentes culturas e possuem grande importância no ciclo biológico do solo.

Os gêneros *Bacillus* e *Bradhyrizobium* já são amplamente utilizados na agricultura em substituição de fertilizantes e/ou controle biológico. Esses microrganismos correspondem às bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) e podem colonizar partes das plantas, principalmente o sistema radicular (LEGGET et al 2017; BRANDI et al., 2018; ASHEM; TABASSUM; FATHI ABD-ALLAH, 2019; SUGIYAMA, 2019). Por isso, também podem ser chamados de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), e estão diretamente relacionados com a nutrição de plantas.

A promoção de crescimento ocasionada por linhagens de *Bacillus* pode ser relacionada com o aumento da fixação de nitrogênio, solubilização de nutrientes, síntese de fitormônios e melhoria das condições do solo. Além dos benefícios indiretos pela supressão deste ambiente contra microrganismos maléficos (MANJULA e PODILE, 2005). Essa associação benéfica proporciona o aumento fisiológico de metabólitos que desencadeiam a sensibilidade do sistema radicular às condições externas facilitando a percepção e absorção de nutrientes (RADHAKRISHNAN, HASHEM, ABD-ALLAH, 2017).

Diante dos dados apresentados não foi possível observar aumento significativo de diversidade em nenhum dos tratamentos avaliados. No entanto, a riqueza de espécies foi aumentada nas áreas de gotejamento e pivô quando comparadas com a área não irrigada. Diferentes tipos de manejo podem influenciar nas características físicas e químicas do solo que acabará determinando, favorecendo ou inibindo, o estabelecimento de diferentes grupos microbianos (CARDOSO et al., 1992).



### 3.4 Conclusão

Tendo em vista o objetivo proposto e os resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que:

Por meio da análise de metagenômica da diversidade bacteriana associada ao pinhão-manso sob diferentes tratamentos, não foi possível observar diferenças significativas da diversidade bacteriana. Os grupos bacterianos que se diferenciaram significativamente entre as áreas de pivô e sequeiro são o gênero *Bryobacter* e o Filo *Chloroflexi*.

## **CAPÍTULO 4**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DA  
CULTURA DO MILHO (*Zea mays* L.) POR RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS À  
CULTURA DO PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

## Resumo

Bactérias endofíticas possuem uma íntima interação com as plantas e são capazes de promover o seu crescimento. A utilização dessas bactérias em algumas etapas da produção agrícola pode levar a aumento significativo da produtividade ou a redução de insumos; tais como adubos nitrogenados. Para a inoculação em sementes de milho, foram selecionadas 8 bactérias isoladas endofiticamente e consideradas potencialmente positivas na caracterização bioquímica *in vitro*, realizada previamente, em relação ao potencial de promoção de crescimento vegetal desses isolados. Os tratamentos utilizados no presente estudo constaram de um controle (C1) contendo somente o meio de cultura *trypticase soy broth* (TSB) e da aplicação da suspensão bacteriana nas sementes das linhagens: EPM-2 *Serratia* sp. (T1), EPM-4 *Klebsiella* sp. (T2), EPM-34 *Curtobacterium* sp. (T3), EPM-41A *Bacillus* sp. (T4), EPM-54 *Bacillus* sp. (T5), EPM-63 *Klebsiella* sp. (T6), EPM-63B *Citrobacter* sp. (T7) e EPM-92 *Bacillus* sp. (T8). As irrigações foram realizadas de acordo com a necessidade das plantas, sendo adicionadas às mesmas a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950). Após 30 e 60 dias de condução do experimento em casa de vegetação. Aos 30 e 60 dias após a semeadura, foram avaliadas as variáveis: altura da parte aérea (APA), Diâmetro do colmo (Diâm.), peso seco da parte aérea (PSPA) e peso seco do sistema radicular (PSSR) das plantas de milho. Nas avaliações realizadas aos 30 e 60 dias observou-se que para a variável APA, nenhum dos tratamentos diferiram significativamente entre si, entretanto, no variável diâmetro do colmo (Diâm.), o controle apresentou diferença significativa dos demais tratamentos. No entanto na variável Diâm aos 30 ed 60 dias o tratamento controle demonstrou-se superior aos demais tratamentos, bem como na avaliação aos 60 dias as variáveis de peso seco da parte aérea (PSPA) e peso seco do sistema radicular (PSSR), do tratamento controle mostrou-se superior aos demais tratamentos. Entre os tratamentos inoculados com microrganismos, o tratamento T1 (EPM2- *Serratia marcescens*), demonstrou-se superior estatisticamente aos demais tratamentos envolvendo a inoculação dos isolados bacterianos. Quando comparadas com o controle C, onde houve a disponibilidade de todos os nutrientes para as plantas, não foi possível comprovar a capacidade de promoção de crescimento em condições de casa de vegetação por meio da veiculação somente das bactérias endofíticas pelas sementes avaliadas no presente capítulo.

**Palavras-chave:** Bioestimulante, bactérias endofíticas, promoção de crescimento, *Zea mays* L.

## Abstract

Endophytic bacteria have an intimate interaction with plants and are capable of promoting their growth. The use of these bacteria in some stages of agricultural production can lead to a significant increase of productivity or reduction of inputs; such as nitrogen fertilizers. For the inoculation in corn seeds, 8 endophytic bacterial isolates were selected considering the biochemical characterization *in vitro* previously performed in relation to the potential of plant growth promotion. The treatments used in the present study consisted of a control (C) containing only *trypticase soy broth* (SB) culture medium and the application of the bacterial suspension in the seeds of the lines: EPM-2 *Serratia* sp. (T1); EPM-4 *Klebsiella* sp. (T2); EPM-34 *Curtobacterium* sp. (T3); EPM-41A *Bacillus* sp. (T4); EPM-54 *Bacillus* sp. (T5); EPM-63 *Klebsiella* sp. (T6); EPM-63B *Citrobacter* sp. (T7) and EPM-92 *Bacillus* sp. (T8). Irrigations were carried out according to the needs of the plants, and the nutrient solution of Hoagland & Arnon (1950) was added to them. After 30 and 60 days of conduction of the experiment in a greenhouse. At 30 and 60 days after sowing, the following variables were evaluated: shoot height (APA), shoot diameter (DM), shoot dry weight (PSPA) and dry weight of the root system. In the evaluations performed at 30 and 60 days, it was observed that for the variable APA, none of the treatments differed significantly among themselves, however, in the stem diameter variable, the control presented a significant difference of the other treatments. However, in the Diam variable at 30 and 60 days, the control treatment was superior to the other treatments, as well as in the 60-day evaluation of the variables of dry weight of the aerial part (PSPA) and dry weight of the root system (PSSR) of the control treatment was superior to the other treatments. Among the treatments inoculated with microorganisms, T1 treatment (EPM2-*Serratia* sp.) was statistically superior to the other treatments involving the inoculation of bacterial isolates. When compared to control C, where there was availability of all plant nutrients, it was not possible to prove the ability to promote growth under greenhouse conditions by only inoculating the bacteria by the endophytic bacteria evaluated in the present study.

**Keywords:** Biostimulant, endophytic bacteria, growth promotion, *Zea mays* L.

## 4 Introdução

O pinhão-manso é uma oleaginosa promissora como matéria-prima para a obtenção de óleo destinado à produção de biodiesel devido ao potencial biotecnológico de suas sementes (DURÃES e LAVIOLA, 2010; LAVIOLA et al., 2015; KUMAR; SRIVASTAVA; JAI, 2016). É considerada uma planta rústica de fácil cultivo, com baixos custos de produção e possível de ser cultivada economicamente em quase todas as regiões brasileiras. Entretanto, apesar de se tratar de uma planta rústica, a expansão das áreas de cultivo de *Jatropha curcas* em diversas áreas do País contribuiu para o surgimento de diversas pragas e doenças, ocasionando perdas na produção e o desinteresse do cultivo desta planta (AGUILA, 2009).

Os microrganismos representam uma fonte quase inesgotável de recursos naturais principalmente os que vivem em habitats específicos, como aqueles associados às plantas. Esses microrganismos podem apresentar um grande valor biotecnológico além de ser uma alternativa sustentável na busca de promover o aumento da produção de culturas agrícolas e para redução dos prejuízos causados ao meio ambiente (LUZ et al., 2006; BATISTA, 2012; QUECINE, BATISTA, LACAVA, 2014). Na interação planta-microrganismo, são encontradas bactérias endofíticas capazes de promover o crescimento vegetal e podem ser encontrados em espaços intercelulares de raízes, folhas, flores, frutos e caules e podem promover o crescimento da planta de maneira direta ou indireta. (AZEVEDO, 1999; LACAVA e AZEVEDO, 2013; QUECINE, BATISTA, LACAVA; 2014). Atuam diretamente por meio fornecimento de substâncias como reguladores do crescimento de plantas como ácido indol acético (AIA), pela fixação biológica de nitrogênio, já que são capazes de assimilar o  $N_2$  atmosférico e convertê-lo à forma assimilável ( $NH_3$ ) num processo denominado fixação biológica de nitrogênio (FBN), e ainda podem solubilizar fosfato inorgânico (SF) (GONZALEZ-LOPEZ et al., 2005; QUECINE, BATISTA, LACAVA; 2014).

A promoção indireta do crescimento por esse grupo de bactérias ocorre por meio do controle biológico de patógenos, sendo por competição de espaço e nutrientes, parasitismo e de indução de resistência sistêmica (HANDELSMAN e STABB, 1996; GRIFFIN, 2014; LACAVA e AZEVEDO, 2014). Como as técnicas biotecnológicas começam a ficar cada vez mais disponíveis, cresce a necessidade de programas que planejem a exploração econômica da biodiversidade microbiana inexplorada que está associada a essas culturas, como é o caso do pinhão-manso.

A crescente preocupação com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques

ecológicos e com uso responsável dos recursos naturais sem que haja redução da produção. A possibilidade da aplicação de bactérias promotoras de crescimento vegetal nos solos traz benefícios diretos para a produção agrícola e representa uma alternativa para o desenvolvimento de futuras formulações de inoculantes comerciais, o que permite a redução do uso de fertilizantes agrícolas.

## **4.1 Objetivos**

O presente capítulo teve como principal objetivo a avaliação do potencial de promoção de crescimento vegetal, *in vivo*, de bactérias endofíticas isoladas do pinhão-mansão na cultura do milho (*Zea mays* L.).

## **4.2 Materiais e métodos**

### **4.2.1 Seleção de isolados bacterianos para o ensaio de promoção de crescimento vegetal em milho**

Tendo em vista que o teste de um grande número de linhagens em condições naturais é extremamente laborioso, este estudo foi baseado em técnicas “*in vitro*” para a seleção das linhagens promissoras. Tais técnicas fornecem uma base para a seleção inicial de bactérias promotoras de crescimento de plantas e que podem ser usadas então para futuros testes sob condições naturais.

Os resultados obtidos por meio da caracterização bioquímica dos isolados quanto a produção de ácido indol acético (AIA), solubilização de fosfato (SF) e fixação biológica de nitrogênio (FBN) permitiram a seleção de 50 linhagens com potencial para promoção de crescimento vegetal (MACHADO, 2015). Dentre estes, 8 isolados foram selecionados para serem inoculadas em sementes de milho a fim de serem avaliados quanto ao potencial de promoção de crescimento *in vivo*.

Os isolados bacterianos endofíticos utilizados neste experimento foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: serem positivas para os 3 mecanismos estudados, ou apresentarem ISF pelo menos médio (se positivas para solubilização de fosfato). A Tabela 6 mostra as características apresentadas pelas bactérias que foram utilizadas em experimentos de promoção de crescimento *in vivo*.

**Tabela 4.** Mecanismos de promoção de crescimento analisados para todos os isolados bacterianos endofíticos do pinhão-mansó (MACHADO, 2015).

<b>Cód. Linhagem</b>	<b>Linhagem melhor similaridade no Blastn</b>	<b>FBN<sup>a</sup></b>	<b>ISF<sup>b</sup></b>	<b>AIA<sup>c</sup> µg/MI</b>
EPM-2	<i>Serratia marcescens</i>	-	3,39	38,93
EPM-4	<i>Klebsiella</i> sp.	-	3,05	79,87
EPM-34	<i>Curtobacterium</i> sp.	+	NI*	12,83
EPM-41A	<i>Bacillus megaterium</i>	+	1,58	15,97
EPM-54	<i>Bacillus megaterium</i>	+	1,64	47,07
EPM-63	<i>Klebsiella</i> sp.	-	4,44	65,37
EPM-63B	<i>Citrobacter</i> sp.	-	4,53	84,11
EPM-92	<i>Bacillus</i> sp.	+	NI*	48,45

<sup>a</sup>Fixação Biológica de Nitrogênio;

<sup>b</sup>Índice de Solubilização de Fosfato

<sup>c</sup>Concentração da produção de Ácido Indol Acético bacteriano em µg/mL;

NI\* Índice de Solubilização de Fosfato Não Identificado

#### 4.2.2 Eficiência das bactérias endofíticas em promover o crescimento em milho

Para avaliar a eficiência das bactérias em promover o crescimento de milho (sementes da variedade Al Bandeirante 2015-2015), foi realizado um experimento em casa de vegetação com duração de 60 dias. A casa de vegetação fica localizada no Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, SP. Os tratamentos utilizados no presente estudo constaram de um controle (C) contendo somente o meio de cultura TSB, e da aplicação da suspensão bacteriana nas sementes das linhagens: EPM-2 *Serratia* sp. (T1), EPM-4 *Klebsiella* sp. (T2), EPM-34 *Curtobacterium* sp. (T3), EPM-41A *Bacillus* sp. (T4), EPM-54 *Bacillus* sp. (T5), EPM-63 *Klebsiella* sp. (T6), EPM-63B *Citrobacter* sp. (T7) e EPM-92 *Bacillus* sp. (T8).

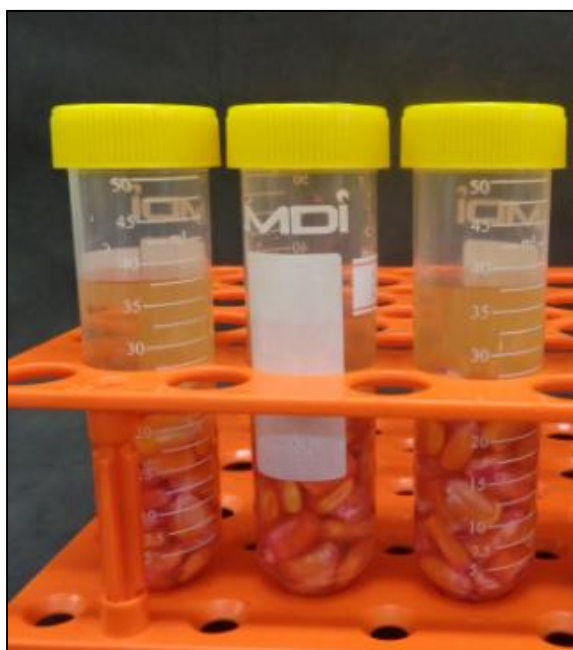
As linhagens foram cultivadas separadamente em tubos de ensaio contendo 5 mL de TSB 100% sob agitação a 28°C por 24 horas. Em seguida, foi transferido aproximadamente 1 mL do pré-inóculo para *erlenmeyers* contendo 100 mL de meio líquido TSB 100%, sendo agitados constantemente por aproximadamente 4 horas a 28°C até que atingisse a fase log, o que correspondia a  $10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 19).

**Figura 33.** Figura representativa das suspensões bacterianas endofíticas. A) Controle: TSB sem inóculo bacteriano, B) Suspensão bacteriana em fase log de crescimento.



Em seguida, as sementes foram lavadas com água destilada e banhadas por uma solução de sacarose 10%, sendo agitadas e escorridas. Depois de secas, foram imersas e mantidas nas suspensões bacterianas, em tubos de 50 mL (Figura 20), até o momento em que foram semeadas (aproximadamente 30 minutos).

**Figura 35.** Figura representativa das sementes de milho (Variedade Al Bandeirante 2015-2015) mantidas nas suspensões bacterianas correspondentes aos até o momento da semeadura em casa de vegetação para teste de promoção de crescimento vegetal.





O plantio e cultivo das sementes foi feito em vasos de 15 litros com 3 kg de vermiculita fina expandida (Terra Fort) e mantidos em casa de vegetação. O delineamento utilizado foi em blocos casualizados com 10 repetições de cada tratamento. Foram adicionadas 4 sementes por vaso.

Devido a sensibilidade das plantas à solução de nutrientes concentrada de Hoagland e Arnon (1950) nos primeiros quinze dias após o plantio, foi o necessário uso de solução nutritiva diluída em 50% para evitar danos fisiológicos nas culturas em todos os tratamentos avaliados. Após este período, os tratamentos inoculados com bactérias passaram a receber a solução nutritiva concentrada com ausência de N. O controle recebeu a solução nutritiva completa. As medidas de altura e diâmetro das plantas foram realizadas 30 e 60 dias após a emergência (tempo necessário para que se observassem diferenças de crescimento). Após 60 dias da emergência, as plantas foram colhidas e tanto o peso seco da parte aérea (PSPA) quanto o peso seco do sistema radicular (PSSR) de cada planta foram obtidos.

**Figura 37.** Figura representativa do ensaio de promoção de crescimento em plantas de milho na casa de vegetação instalada na Universidade Federal de São Carlos-UFSCar. A) Plantio das sementes de milho em blocos inteiramente casualizados, B) Aplicação da solução nutritiva de Hoagland e Arnon, C) Experimento 20 dias após o plantio.



### 4.2.3 Colheita e variáveis determinadas

Imediatamente após a colheita, separou-se o sistema radicular da parte aérea da planta, sendo ambos lavados em água corrente para remoção completa dos resíduos de vermiculita expandida. Em seguida, foi aferida a altura da parte aérea (APA) com o auxílio de uma trena milimetrada. O sistema radicular e a parte aérea de cada planta foram colocados separadamente em sacos de papel e encaminhadas para secagem em estufa com ventilação forçada a 60°C, até o peso constante. Em seguida, com o auxílio de uma balança analítica, realizou-se a pesagem da parte aérea e do sistema radicular para obtenção do peso seco da parte aérea (PSPA) e do peso seco do sistema radicular (PSSR). Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey a 5% de significância.

## 4.3 Resultados e Discussão

### 4.3.1 Eficiência de bactérias endofíticas em promover o crescimento em milho

Nas avaliações realizadas 30 dias após a germinação foram analisadas as variáveis: APA e Diâm. Observou-se que para a variável APA, nenhum dos tratamentos diferiram significativamente entre si, entretanto, ao observarmos a variável diâmetro do colmo (Diâm), o tratamento C apresentou diferença significativa dos demais tratamentos.

Nas avaliações realizadas aos 60 dias após a germinação (Figura 23), observou-se novamente que para a variável APA os isolados bacterianos endofíticos não diferiram significativamente do tratamento C que recebeu a solução nutritiva completa conforme exigido pela cultura do milho, no entanto na variável Diâm e PSPA, o tratamento C demonstrou-se superior aos demais tratamentos, no entanto entre o tratamento T1 (EPM2- *Serratia* sp.), demonstrou-se superior estatisticamente aos demais tratamentos envolvendo a inoculação dos isolados bacterianos. A última variável avaliada foi o peso seco do sistema radicular (PSSR), o tratamento C também se demonstrou superior, porém os tratamentos T1 (EPM4- *Klebsiella* sp.), T3 (EPM9- *Microbacterium* sp.), T4 (EPM4- *Klebsiella* sp.) e T7 (EPM9- *Microbacterium* sp.) apresentaram uma redução significativa nesta variável quando comparados ao controle demonstraram-se superior estatisticamente aos demais tratamentos envolvendo a inoculação de isolados bacterianos.

Os resultados das variáveis: Altura da parte aérea e Diâmetro da planta analisadas em

milho foram agrupados na Tabela 5. As variáveis: Peso seco da parte aérea e Peso seco do sistema radicular planta analisadas em milho foram na Tabela 6.

**Tabela 5.** Variáveis da Altura da parte aérea e Diâmetro da planta analisadas em milho 30 e 60 dias após inoculação bacteriana dos tratamentos. Dados seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

TRATAMENTOS	VARIÁVEIS			
	APA 30 <sup>1</sup> (cm)	APA 60 <sup>2</sup> (cm)	Diâm 30 <sup>3</sup> (cm)	Diâm 60 <sup>4</sup> (cm)
C	35,7 a	62,6 a	0,61 b	1,78 b
T1	41,8 a	57,6 a	0,43 a	1,36 ab
T2	37,8 a	58,5 a	0,45 a	1,06 a
T3	37,6 a	56,1 a	0,45 a	1,29 a
T4	36,4 a	58,0 a	0,43 a	1,21 a
T5	37,4 a	59,7 a	0,47 a	1,14 a
T6	35,7 a	56,9 a	0,45 a	1,19 a
T7	40,8 a	57,6 a	0,48 a	1,19 a
T8	43,40 a	59,1 a	0,46 a	1,16 a

<sup>1</sup>Altura da parte aérea 30 dias após germinação;

<sup>2</sup>Altura da parte aérea 60 dias após inoculação;

<sup>3</sup>Diâmetro da planta 30 dias após germinação;

<sup>4</sup>Diâmetro da planta 60 dias após germinação;

**Tabela 6.** Variáveis do Peso seco da parte aérea e Peso seco do sistema radicular analisadas em milho 60 dias após inoculação dos tratamentos. Dados seguidos da mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

TRATAMENTOS	VARIÁVEIS	
	PSPA 60 <sup>1</sup> (g)	PSSR 60 <sup>2</sup> (g)
C	2,30 d	2,15 c
T1	1,83 c	1,77 bc
T2	1,51 abc	1,50 ab
T3	1,64 bc	1,78 bc
T4	1,67 bc	1,73 bc
T5	1,59 bc	1,59 ab
T6	1,34 ab	1,60 ab
T7	1,68 bc	1,64 bc
T8	1,11 a	1,12a

<sup>1</sup>Peso seco da parte aérea 60 dias após germinação;

<sup>2</sup>Peso seco do sistema radicular 60 dias após germinação.

**Figura 22.** Figura representativa do ensaio de promoção de crescimento em plantas de milho colhidas aos 60 dias após germinação. A) A esquerda, planta inoculada com T2 (EPM-4- *Klebsiella* sp.) e a direita, planta controle C (não inoculada).



Quando comparadas com o tratamento C, onde houve a disponibilidade de todos os nutrientes para as plantas, não foi possível comparar a capacidade de promoção de crescimento em condições de casa de vegetação por meio da veiculação somente das bactérias endofíticas pelas sementes avaliadas no presente estudo.

A aplicação de inoculantes com tais bactérias poderá amenizar os elevados custos com adubação nitrogenada em gramíneas, sobre tudo o milho, suprindo parcialmente a necessidade de nitrogênio na cultura. Além do mais, há expectativa de redução das perdas de N e do potencial poluente decorrentes do uso de fertilizantes nitrogenados (OLIVEIRA et al., 2018).

Para avaliar o potencial de promoção de crescimento vegetal em milho, foram selecionadas 8 linhagens com potencial para promoção de crescimento de plantas. Estas tiveram seu gene 16S rDNA parcialmente sequenciados e identificados, os isolados EPM-41A (*Bacillus* sp.), EPM-54 (*Bacillus* sp.), EPM-63 (*Klebsiella* sp.), EPM-63B (*Citrobacter* sp.) e EPM-92 (*Bacillus* sp.), que apresentaram resultados positivos em todos os ensaios de promoção de crescimento *in vitro* testados. Os isolados EPM-2 (*Serratia* sp.), EPM-4 (*Klebsiella* sp.) e EPM-34 (*Curtobacterium* sp.) só não apresentaram resultados positivo para os testes de fixação biológica de nitrogênio, mas apresentaram altos índices (>3) de solubilização de fosfato.

A utilização de bactérias na formulação de inoculantes, ou biofertilizantes, vem sendo utilizada e estudada por diversos autores, sendo relatado que estas tecnologias podem reduzir os custos de produção e impacto ambiental e aumentar a produtividade da cultura do milho (AUDIPUDI et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; BATISTA et al., 2018).

Foi possível constatar que o isolado EPM-2 (*Serratia* sp.), superou os demais isolados bacterianos avaliados quanto a capacidade de promover o crescimento vegetal. Ao considerarmos as variáveis Diâm e PSPA 60 dias após a semeadura, observou-se sua média próxima ao tratamento controle para a variável PSSR, os Tratamentos T1 (EPM-2 *Serratia* sp.), T3 (EPM-34 *Curtobacterium* sp.), T4 (EPM-41A *Bacillus* sp.) e T7 (EPM-63B *Citrobacter* sp.) foram superiores aos demais tratamentos e com média próxima ao do tratamento controle.

No presente capítulo, os isolados avaliados não demonstraram a capacidade de promover o crescimento vegetal de plantas de milho. Foram diferentes respostas em relação aos parâmetros analisados observados no experimento de promoção de crescimento “*in vivo*”. O experimento apresentou resultados neutros ou inferiores quando comparados com a testemunha, apesar de todos os isolados apresentarem bons resultados *in vitro* para os testes que justifiquem a promoção de crescimento vegetal e serem gêneros amplamente citados como promotores de crescimento vegetal. A hipótese levantada é de que o substrato (vermiculita) utilizado no experimento, não seria o ideal para a inoculação de microrganismos. Possivelmente as características desse substrato não favoreceu a permanência e/ou manutenção da microbiota na rizosfera do milho.

Em estudos realizados por Figueiredo et al., 2013 avaliando o efeito de vermiculita, areia e substrato juntamente com a inoculação de de bactérias promotoras do crescimento de vegetal na germinação de sementes de cana-de-açúcar, observou-se que a inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal promoveram melhor desenvolvimento de mudas, principalmente raízes, quando utilizado o substrato. A vermiculita teve os piores resultados. Nenhuma resposta ao PGPB foi observada na areia.

Freitas et al. (2003) sugeriram que aspectos nutricionais do substrato em que se desenvolviam plantas de alface poderia influenciar a capacidade de promoção do crescimento por bactérias, devido a variação do efeito dos isolados bacterianos em diferentes tipos de substratos. A conclusão semelhante chegou Freitas & Aguilar-Vildoso (2004), também pela enumeração desse grupo bacteriano na rizosfera de plantas cítricas: os autores concluíram que *Pseudomonas* fluorescentes têm seu desenvolvimento influenciado pelo substrato e pelo ambiente em que se desenvolvem, particularmente pela rizosfera.

Linhagens de *Serratia* têm demonstrado a capacidade de promover o crescimento de plantas. *Serratia plymuthica* AS12 e *S. plymuthica* AS13 isoladas das raízes de plantas de colza promovem o crescimento das plantas hospedeiras (NEUPANE et al., (2012a), NEUPANE et al., (2012b)). A capacidade do gênero *Serratia* para promover o crescimento foi descrito por Mateoli et al., (2018), onde observaram o aumento da biomassa de plântulas de milho quando

inoculados com a linhagem *S. marcescens* UENF-22GI em condições de casa de vegetação.

O gênero *Bacillus* inclui mais de 60 espécies e está conformado por microrganismos bacilares Gram positivos, formadores de endósporos resistentes a fatores físicos e fatores químicos nocivos, favorecendo e prevalecendo a utilização de linhagens desse gênero como biofertilizantes agrícolas (BERGEY; JOHN G. HOLT, 2000; TEJERA-HERNÁNDEZ; ROJAS-BADÍA; HEYDRICH-PÉREZ, 2011).

Diaz 2018, observou 2 linhagens de *B. subtilis* (248 e 290) apresentam uma possível alternativa como bactérias endofíticas promotoras de crescimento para a cultura do algodão, onde influenciavam positivamente no incremento dos parâmetros de massa seca da parte aérea, raiz e total, nitrogênio na raiz e parte aérea, e fósforo no solo. A promoção de crescimento, proporcionada por *B. subtilis*, pode levar a semente à rápida germinação conforme observado em estudos realizados por MANJULA & PODILE (2005), onde sementes de feijão guandu tratadas com formulação a base de *B. subtilis* AF1 em turfa suplementada com quitina, onde foi possível verificarem um aumento da emergência e peso seco das mudas de 29 a 33%. Outras espécies de *Bacillus* vem sendo estudadas para possíveis formulações como bioinoculantes são *B. velezensis* e *B. amyloliquefaciens* gerando bons resultados na agricultura (SUN et al., 2017; FAN et al., 2018; BATISTA et al., 2018).

Diante do exposto sobre o potencial de promoção de crescimento desses gêneros avaliados, pode-se considerar a necessidade de uma nova avaliação quanto a capacidade de promoção de crescimento *in vivo* dessas linhagens em plantas de milho, utilizando diferentes substratos.

#### **4.4 Conclusão**

Tendo em vista o objetivo proposto e os resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que:

A inoculação de bactérias endofíticas em sementes de milho em casa de vegetação não demonstrou potencial para promoção de crescimento quando avaliados utilizando as metodologias no presente capítulo.

## **CAPÍTULO 5**

### **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E RIZOSFÉRICAS CONTRA FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DO PINHÃO-MANSO**

## Resumo

Diante da iniciativa do Governo Federal em introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira, houve um grande interesse em obter o óleo das sementes de pinhão-mansão para produção de matéria-prima para este biocombustível. O pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) tem se destacado por ser uma planta que vive mais de 50 anos, de fácil manejo, além de produzir sementes com alto teor de óleo e ser encontrada nas mais diferentes condições de solo e clima. A expansão das áreas de cultivadas com essa espécie vegetal acarretou no surgimento de diversas doenças, causadas por fitopatógenos, mas do qual pouco se conhece sobre os reais agentes etiológicos. Atualmente, em diversas áreas do Brasil, tem-se relatado a ocorrência de uma nova doença que não apenas reduz a produtividade, como tem causado a morte de plantas de pinhão-mansão. Recentemente no Brasil, foi relatada a ocorrência de uma nova doença ocasionada em pinhão-mansão por fungos do gênero *Lasiodiplodia* pertencente a família Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Ascomycetes), que não só reduz a produtividade, mas também ocasiona a morte desta planta e está associada a uma podridão das raízes e do colo no hospedeiro. Assim, o objetivo deste capítulo foi avaliar o potencial antagônico de bactérias associadas ao pinhão-mansão com potencial para controlar o desenvolvimento de três espécies de *Lasiodiplodia subglobosa*, *L. euphorbicola* e *L. pseudotheobromae*, fitopatogênicos ao pinhão-mansão. Foram avaliados 135 isolados bacterianos associados ao pinhão-mansão quanto a sua capacidade de inibir o crescimento de fitopatógenos onde trinta e seis isolados apresentaram bons índices de atividade antifúngica destacando-se oito isolados que demonstraram potencial em inibir *in vitro* acima de 75% do crescimento do fitopatógeno, destacando-se os isolados rizosféricos dos gêneros *Pseudomonas* sp. e *Bacillus subtilis*.

**Palavras-Chave:** Atividade antifúngica, Biocontrole, bactérias associadas ao pinhão-mansão



## Abstract

In view of the Federal Government's initiative to introduce biodiesel into the Brazilian energy matrix, there was a great interest in obtaining the oil of the jatropha seeds for the production of raw material for this biofuel. *Jatropha curcas* has stood out because it is a plant that lives for more than 50 years, easy to handle, besides producing seeds with high oil content and to be found in the most different soil and climate conditions. The expansion of cultivated areas with this species has led to the emergence of several diseases, of which little is known about the real etiological agents. Nowadays, in several areas of Brazil, a new disease has been reported that not only reduces productivity, but has caused the death of plants. Recently in Brazil, a new disease caused in *J. curcas* by the fungus *Lasiodiplodia* belonging to the family Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Ascomycetes) has been reported that not only reduces productivity, but also causes the death of this plant and is associated with a rotting of the roots and lap of plants. Thus, the objective of this work was to evaluate the antagonistic potential of bacteria associated with *Jatropha* capable of controlling the development of three phytopathogenic fungi associated with this family: 135 endophytic and rhizosphere isolates associated with *Jatropha* were evaluated for their ability to inhibit the growth of phytopathogens where thirty-six isolates showed good indices of antifungal activity, highlighting eight isolates that showed *in vitro* inhibitory potential above 75% of phytopathogen growth, especially the rhizosphere isolates of the genus *Pseudomonas* sp. and *Bacillus*.

**Keywords:** Antifungal activity, Biocontrol, bacteria associated with jatropha

## 5 Introdução

O pinhão-manso é uma oleaginosa promissora como matéria-prima para a obtenção de óleo destinado à produção de biodiesel devido ao potencial biotecnológico de suas sementes (DURÃES e LAVIOLA, 2010; LAVIOLA et al., 2015; KUMAR; SRIVASTAVA; JAI, 2016). É considerada uma planta rústica de fácil cultivo, com baixos custos de produção e possível de ser cultivada economicamente em quase todas as regiões brasileiras. Entretanto, apesar de se tratar de uma planta rústica, a expansão das áreas de cultivo de *Jatropha curcas* em diversas áreas do País contribuiu para o surgimento de diversas pragas e doenças, ocasionando perdas na produção e o desinteresse do cultivo desta planta (AGUILA, 2009).

Um dos principais problemas enfrentados na agricultura são os prejuízos ocasionados por doença, em especial, as doenças ocasionadas por fungos fitopatogênicos são um fator limitante na produção agrícola, sendo responsáveis por perdas consideráveis em culturas economicamente importantes, cerca de 85% das doenças das plantas são causadas por fungos. Essas doenças propiciam queda de produção e, conseqüentemente, prejuízos financeiros para os produtores (BUENO e FISHER, 2006).

A utilização de fungicidas é o principal meio de controle das doenças, ocasionando melhorias significativas na produtividade e qualidade das culturas agrícolas nas últimas décadas, porém o uso excessivo e indevido de agroquímicos tem gerado problemas ao meio ambiente e a saúde pública (PAL e MCSPADDEN, 2006). Diferentes abordagens podem ser utilizadas para prevenir, mitigar ou controlar as doenças das plantas.

Recentemente no Brasil, foi relatada a ocorrência de uma nova doença ocasionada no pinhão-manso pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* pertencente a família Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Ascomycetes) e que não só reduz a produtividade, mas também ocasiona a morte desta planta (DIAS et al., 2007; FRANCO e GABRIEL, 2008; CARDOSO et al., 2009; ROCHA, 2011). A expansão dessa doença vem ocasionando o abandono dos cultivos de pinhão-manso em diferentes regiões do país o que é agravado pela ausência de fungicidas registrados para o controle desse fitopatógeno para essa cultura agrícola (PEREIRA, DUTRA, DIAS, 2009). Diversas pesquisas estão sendo realizadas para estabelecer essa cultura no País, tais como adaptações climáticas, produtividade e variabilidade genética. No entanto, por ser uma cultura de ciclo perene, é necessário um longo período para alcançar os resultados esperados (LAVIOLA et al., 2015).

Destaca-se no controle de *L. theobromae*, o uso inadequado de fungicidas e virulência crescente desse fitopatógeno. O controle químico por si só não oferece proteção nem controle

curativo quando os danos são provenientes do ataque desse fitopatógeno; sendo, então, indicada a adoção de uma série de medidas adicionais como o manejo da cultura de pinhão-manso e o controle biológico (TAVARES, 1995; SILVA et al., 2015).

Nesse sentido, as buscas por novas práticas de proteção vegetal surgem como alternativa aos agroquímicos, entre elas estão a prática de controle biológico (SAITO et al., 2009; AZEVEDO, 2000; LACAVA e AZEVEDO, 2014; LACAVA, MELO, PEREIRA, 2018). Uma alternativa que pode contribuir com o estabelecimento desta planta no Brasil como uma cultura economicamente viável, seria o estudo de sua microbiota ainda pouco explorada.

## 5.1 Objetivos

Avaliar 135 isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos associados ao pinhão-manso quanto ao seu potencial de antagonismo contra três importantes fungos fitopatogênicos da cultura do pinhão-manso: *Lasiodiplodia subglobosa*, *L. euphorbicola* e *L. pseudotheobromae*.

## 5.2 Materiais e métodos

### 5.2.1 Atividade antagônica de isolados bacterianos endofíticos contra fungos fitopatogênicos isolados da cultura do pinhão-manso

Para analisar a atividade antagônica de 72 isolados bacterianos endofíticos (MACHADO, 2015) depositados na coleção de culturas microbianas do Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas – LaMiB e 63 rizosféricos associados ao pinhão-manso contra fungos fitopatógenos foram realizados testes de antagonismo *in vitro*.

Os fungos fitopatogênicos utilizados nos ensaios foram: *Lasiodiplodia subglobosa*, *L. euphorbicola* e *L. pseudotheobromae*.

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto à capacidade antagonista a três diferentes espécies do fungo fitopatogênico *Lasiodiplodia* pelo método da cultura pareada (MARIANO, 1993; ASSUMPÇÃO et al., 2009; SILVA, 2015). Para isso, primeiramente foi realizada uma seleção massal, onde os isolados bacterianos foram repicados conforme descrito no item 2.2.3.1.4. (Pag 45).

Os isolados bacterianos que produziram bons resultados, ou seja, conseguiram inibir o crescimento dos fitopatógenos com formação de um halo entre os isolados e o micélio do fungo, foram novamente testados com os mesmos fitopatógenos, em um ensaio individual semiquantitativo.

As culturas bacterianas foram novamente repicadas em meio TSA após 48 horas de incubação a 28 °C foram transferidas para 5 mL de água deionizada autoclavada, e a absorbância (550 nm) das culturas foi medida para que o ensaio fosse realizado com aproximadamente  $10^8$  células bacterianas/mL. Em uma das extremidades da placa contendo meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) foram inoculados 10 µl da solução bacteriana e, no mesmo dia, no centro da placa de Petri foi inoculado um disco de 0,5 cm de diâmetro do fitopatógeno previamente crescidos em placas de petri contendo meio PDA. As placas foram incubadas de 3 a 5 dias a temperatura de 28° C, em triplicata.

O cálculo da porcentagem de inibição dos isolados bacterianos testados foi realizado a partir da seguinte fórmula (SILVA 2015):

$$IA = 100 - \left\{ \frac{X1}{\left[ \frac{x2 + x2' + x2''}{3} \right]} \right\} \times 100$$

### 5.3 Resultados e Discussão

#### 5.3.1 Antagonismo com isolados bacterianos endofíticos e rizosféricas

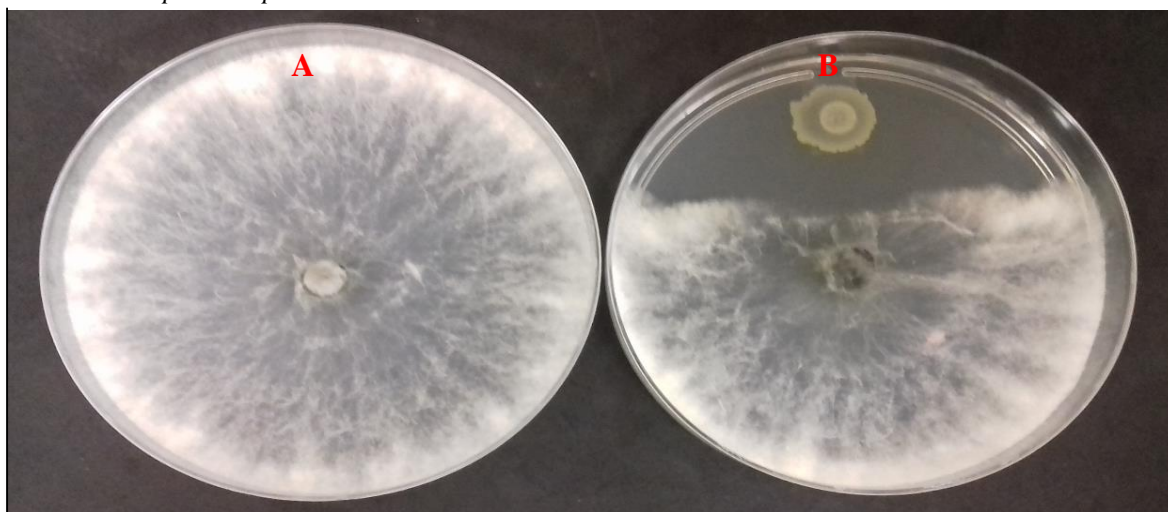
Dos 135 isolados bacterianos associadas ao pinhão-mansão testadas contra os fungos fitopatogênicos *Lasiodiplodia subglobosa*, *L. euphorbicola* e *L. pseudotheobromae*, 16 isolados bacterianos endofíticos e 20 isolados rizobacterianos, foram capazes de reduzir substancialmente o crescimento dos fitopatogenos avaliados, apresentando índices de redução com valores entre 34,16 e 81 %, sendo os resultados mais expressivos obtidos com os gêneros *Bacillus* sp., *Serratia* sp. e *Pseudomonas* sp.

Estes isolados bacterianos foram submetidos à testes semi-quantitativos (Figura 23, 24 e 25) e analisados estatisticamente por Scott-knott (Tabela 7, 8 e 9).

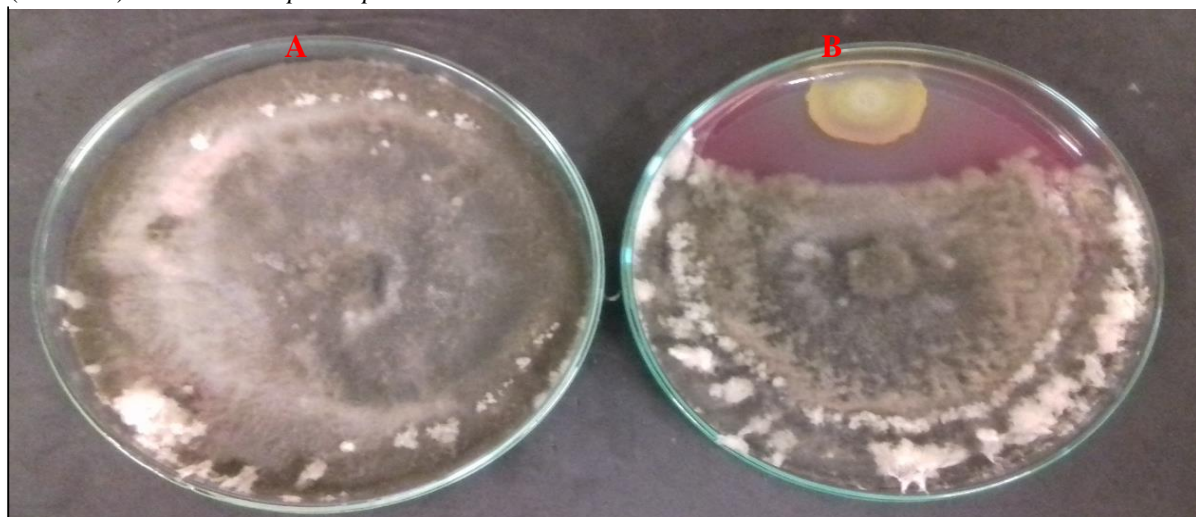
**Figura 23.** Figura representativa da avaliação *in vitro* da atividade antagônica de isolados bacterianos associados ao pinhão-mansó. A- Controle (*Lasiodiplodia subglobosa*). B- Isolado bacteriano endofítico *Bacillus* sp. (EPM55A) versus *Lasiodiplodia subglobosa*.



**Figura 24.** Figura representativa da avaliação *in vitro* da atividade antagônica de isolados bacterianos associados ao pinhão-mansó. A- Controle (*Lasiodiplodia euphorbicola*). B- Isolado rizobacteriano *Pseudomonas* sp. (RZ4PM8) versus *Lasiodiplodia euphorbicola*.



**Figura 47.** Figura representativa da avaliação *in vitro* da atividade antagônica de isolados bacterianos associados ao pinhão-mansó. A- Controle (*Lasiodiplodia pseudotheobromae*). B- Isolado rizobacteriano *Pseudomonas* sp. (RZ4PM6) versus *Lasiodiplodia pseudotheobromae*.



**Tabela 7.** Agrupamento estatístico do índice de redução do fitopatógeno *Lasiodiplodia subglobosa* pelas bactérias endofíticas e rizosféricas associadas ao pinhão-mansão.

Isolado bacteriano	Identificação	Local de isolamento	Índice antagônico (%)	Agrupamento Tukey
EPM88	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	34,33	A
RZ4PM47	NI*	Rizosfera	34,33	A
EPM89	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	37,67	B
EPM53	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	38,00	B
EPM2	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	38,67	B
RZ4PM34	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	38,67	B
RZ4PM41	NI*	Rizosfera	39,33	B
RZ4PM52	NI*	Rizosfera	40,33	B
RZ4PM35	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	41,00	B
RZ4PM1	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	43,00	C
EPM91	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	44,33	C
EPM75	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	44,33	C
EPM66	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	44,33	C
EPM66B	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	47,00	D
EPMA1	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	47,66	D
RZ4PM62	<i>Serratia</i> sp.	Rizosfera	49,33	D
RZ4PM37	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	49,33	D
RZ4PM60	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	50,00	D
RZ4PM36	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	50,33	D
RZ4PM61	<i>Serratia</i> sp.	Rizosfera	51,00	D
RZ4PM63	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	60,33	E
EPM61	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	63,33	E
EPM63D	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	64,33	E
EPM70	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	67,00	F
EPM58	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	67,66	F
EPM37	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	69,66	F
EPM5	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	70,33	F
EPM55A	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	74,33	G
RZ4PM10	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	75,00	G
RZ4PM13	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	75,00	G
RZ4PM9	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	76,00	G
RZ4PM11	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	76,00	G
RZ4PM12	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	76,00	G
RZ4PM7	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	76,66	G
RZ4PM8	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	77,66	G
RZ4PM6	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	81,00	H
C.V. (%)			4,11	

Médias seguidas da mesma letra pertencem a um mesmo grupo de acordo com o critério de agrupamento de Scott e Knott (1974), a 5% de probabilidade.

**Tabela 8.** Agrupamento estatístico do índice de redução do fitopatógeno *Lasiodiplodia euphorbicola* pelas bactérias associadas ao pinhão-manso.

Isolado bacteriano	Identificação	Local de isolamento	Índice antagônico (%)	Agrupamento Tukey
EPM88	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	35,00	A
EPM89	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	35,33	A
EPM2	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	35,33	A
EPM53	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	37,00	A
EPM91	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	38,67	A
EPM66B	<i>Serratia</i> sp.	Rizosfera	41,00	B
RZ4PM35	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	41,00	B
RZ4PM34	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	41,00	B
EPM75	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	41,33	B
EPM66	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	41,22	B
RZ4PM62	<i>Serratia</i> sp.	Rizosfera	42,00	B
EPMA1	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	42,00	B
RZ4PM61	<i>Serratia</i> sp.	Rizosfera	43,66	B
RZ4PM36	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	46,33	C
RZ4PM37	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	46,66	C
RZ4PM60	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	47,66	C
EPM5	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	48,33	C
EPM63D	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	48,66	C
EPM37	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	48,66	C
EPM58	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	49,33	C
RZ4PM47	NI*	Rizosfera	51,00	D
RZ4PM43	NI*	Rizosfera	51,66	D
EPM55A	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	51,66	D
EPM70	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	57,00	E
EPM61	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	57,66	E
RZ4PM12	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	75,00	F
RZ4PM13	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	76,00	F
RZ4PM10	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	76,66	F
RZ4PM9	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	77,00	F
RZ4PM8	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	77,00	F
RZ4PM7	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	77,00	F
RZ4PM11	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	77,00	F
RZ4PM6	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	77,00	F
RZ4PM63	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	79,33	G
C.V. (%)			3,65	

Médias seguidas da mesma letra pertencem a um mesmo grupo de acordo com o critério de agrupamento de Scott e Knott (1974), a 5% de probabilidade.

**Tabela 9.** Agrupamento estatístico do índice de redução do fitopatógeno *Lasiodiplodia pseudotheobromae* pelas bactérias associadas ao pinhão-manso.

<b>Isolado bacteriano</b>	<b>Identificação</b>	<b>Local de isolamento</b>	<b>Índice antagônico (%)</b>	<b>Agrupamento Tukey</b>
EPM88	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	38,66	A
EPM2	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	39,66	A
RZ4PM35	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	40,00	A
RZ4PM36	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	40,00	A
EPM53	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	40,33	A
RZ4PM37	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	42,00	A
RZ4PM1	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	42,00	A
RZ4PM34	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	42,00	A
EPM89	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	43,66	A
EPMA1	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	43,66	A
EPM91	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	45,33	B
RZ4PM47	NI*	Rizosfera	45,33	B
RZ4PM48	NI*	Rizosfera	45,33	B
EPM75	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	46,00	B
EPM66	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	46,00	B
EPM66B	<i>Serratia</i> sp.	Endofítico	48,66	C
RZ4PM60	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	49,33	C
RZ4PM62	<i>Serratia</i> sp.	Rizosfera	49,33	C
RZ4PM41	NI*	Rizosfera	50,00	C
RZ4PM61	<i>Serratia</i> sp.	Rizosfera	51,00	C
EPM5	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	63,66	D
EPM37	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	64,66	D
EPM63D	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	66,33	D
EPM70	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	67,00	D
EPM61	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	67,66	D
EPM58	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	70,33	D
RZ4PM11	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	74,33	E
RZ4PM12	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	74,33	E
RZ4PM7	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	76,00	E
RZ4PM63	<i>Bacillus</i> sp.	Rizosfera	76,00	E
RZ4PM9	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	76,00	E
RZ4PM10	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	76,00	E
EPM55A	<i>Bacillus</i> sp.	Endofítico	76,66	E
RZ4PM13	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	77,00	E
RZ4PM8	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	77,66	E
RZ4PM6	<i>Pseudomonas</i> sp.	Rizosfera	79,33	E
C. V. (%)			4,78	

Médias seguidas da mesma letra pertencem a um mesmo grupo de acordo com o critério de agrupamento de Scott e Knott (1974), a 5% de probabilidade.



A ocorrência das doenças denominadas como seca descendente e podridão da base do caule ocasionadas por espécies do fungo *Lasiodiplodia*, pode levar à redução da produtividade, podendo também provocar 80% de mortalidade das plantas de pinhão-mansão. Os sintomas típicos desta doença, em sua fase inicial, são a seca descendente dos ramos, a infecção na base do caule e a podridão do sistema radicular (MACHADO et al., 2014).

Em 2009 grupos de pesquisa no Brasil (PEREIRA; DUTRA; DIAS, 2009) e na Índia (LATHA et al., 2009), descreveram a sintomatologia da infecção e identificaram o fungo *Lasiodiplodia theobromae* como agente etiológico. Em estudos realizados por Machado et al., 2014, foram identificadas nove espécies desse gênero: *Lasiodiplodia egyptiaca*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *Macrophomina phaseolina*, *Neoscytalidium hyalinum* e quatro *Lasiodiplodia* spp. que foram propostas como novas espécies (*L. euphorbicola*, *L. jatrophicola*, *L. macrospora* e *L. subglobosa*), onde todas as espécies deste estudo, exceto *M. phaseolina*, foram consideradas patogênicas. Os resultados desse estudo demonstraram que a podridão radicular das plantas de pinhão-mansão é causada por patógenos complexos.

Este fungo foi descrito como causador de doença em pinhão-mansão na Malásia (SULAIM e THANARAJOO, 2012); na Índia (LATHA et al., 2009; KUMAR et al., 2014), no Brasil (MACHADO et al., 2014), no Egito e no México (LÓPEZ-GUILLÉN et al., 2019). Esse gênero também é descrito como um importante patógeno em diversas culturas frutíferas tais como: coco (ROSADO e MACHADO, 2016); ameixa, tamarindo, citrus e laranja (COUTINHO et al., 2016); cajú (NETTO, 2017), acerola, manga e uva (SILVA et al., 2018) e jaca (TIZNADO et al., 2018).

A etiologia do fungo *Lasiodiplodia theobromae*, foi recentemente elucidada no Brasil, portanto, ainda não existem métodos de controle recomendados, o que dificulta o manejo das culturas atacadas por esse fitopatógeno (BORGES et al., 2018). A utilização de fungicidas é o principal meio de controle das doenças, ocasionando melhorias significativas na produtividade e qualidade das culturas agrícolas nas últimas décadas, porém o uso excessivo e indevido de agroquímicos tem gerado problemas ambientais (CARNEIRO et al., 2015).

A resistência de microrganismos a produtos químicos também é um grande problema na agricultura. Pesquisas desenvolvidas por Al-Jabri et al., 2017, demonstraram desenvolvimento de resistência de 28 linhagens de *Lasiodiplodia theobromae* isoladas como fitopatógeno da cultura da manga a alguns fungicidas comerciais, sendo um dos principais motivos da redução na eficácia do manejo da morte descendente e a podridão peduncular em mangueiras.

O controle biológico de doenças de plantas pode ocorrer utilizando bactérias antagonistas ao agente causal e, diferentes espécies bacterianas tais como *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* entre outros gêneros (KÖHL; KOLNAAR; RAVENSBERG, 2019; GUPTA e BUCH, 2019)

No presente capítulo, dentre as 36 linhagens bacterianas (16 endofíticas e 20 rizosféricas), que demonstraram ser potenciais candidatas para serem aplicadas no controle biológico desses fungos fitopatogênicos; 50% pertencem ao gênero *Bacillus*, 22% a *Serratia*, 20% a *Pseudomonas* e 8% não foram identificadas.

Nas avaliações de atividade antagonica do presente capítulo, observou-se que houve uma redução expressiva do crescimento fúngico dos fitopatógenos, principalmente por linhagens endofíticas de *Bacillus* sp. e linhagens rizosféricas de *Pseudomonas* sp., atingindo níveis acima de 75% de inibição aos fitopatógenos.

Che et al. (2015), demonstraram a capacidade antagonica de uma linhagem de *Brevibacillus brevis* (*Bacillus brevis*) isolada do solo do Condado de Yongtai da província chinesa de Fujian contra o fungo *Lasobiplodia theobromae*, agente causador da doença podridão das maçãs. Já Sajitha et al., (2014), demonstram a eficácia da propriedade antagonica de linhagens de *B. Subtilis* contra o *L. theobromae*.

Em estudos realizados por Borges et al. (2018), foi observado duas linhagens de *Trichoderma* CEN162 e CEN1153 e uma linhagem de *Bacillus* sp. UnB1366 sendo capazes de inibir completamente o crescimento micelial de alguns isolados de *Lasioidiplodia theobromae* em testes *in vitro*, nesse estudo também foram avaliados o controle do desenvolvimento fúngico em mudas de teca (*Tectona grandis* Linn, F.), onde observou-se que as linhagens CEN162 (*T. asperellum*) e UnB166 (*Bacillus* sp.) apresentaram 100% de controle.

Já Kamil et al. (2018), avaliando 53 isolados actinobacterianos obtidos a partir de solo rizosférico de mangueiras, dos quais 19 apresentaram atividade antagonica *in vitro* contra *L. theobromae* associada à produção de metabólitos antifúngicos, enzimas extracelulares de degradação de parede celular, ou ambos. Em ensaios *in vivo* duas linhagens de *Streptomyces* e um de *Micromonospora* spp., apresentaram uma elevada atividade antagonica contra *L. theobromae*, onde a pré-inoculação em casa de vegetação com as linhagens selecionadas resultou em níveis elevados de proteção contra a doença em mudas de mangueira posteriormente inoculadas com o patógeno.

## 5.4 Conclusão

Tendo em vista o objetivo proposto e os resultados obtidos no presente trabalho conclui-se que:

Um total de 36 isolados bacterianos rizosféricos e endofíticos associados ao pinhão-mansão apresentaram índices antagônicos variando de 34,33 a 81% contra 3 espécies do gênero *Lasiodiplodia*, relatados como importante fitopatógeno à cultura do pinhão-mansão, sendo os resultados mais expressivos obtidos com os gêneros *Bacillus* sp., *Serratia* sp. e *Pseudomonas* sp.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCARINI, J. H. Biodiesel no Brasil: estágio atual e perspectivas. **Revista Bahia Análise e Dados, Salvador**, v. 16, n. 1, p. 51-63, 2006.

AGUILA, L. S. H. Potencial da cultura do pinhão manso na produção de biocombustíveis. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS OLEAGINOSAS REALIDADES E POTENCIALIDADES BRASILEIRAS. 2009. **Potencial da cultura do pinhão manso na produção de biocombustíveis**. Piracicaba: Esalq/usp, 2009. p. 1 - 10.

AHMAD, F.; AHMAD, I.; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbiological Research**. v. 163, n. 2, p. 173-181, 2008.

AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University- Science*, v.26, p. 1-20, 2014.

AHMAD, Z.; JIA, W; LULU, C.; WUBEI, D. Isolated *Bacillus subtilis* strain 330-2 and its antagonistic genes identified by the removing PCR. **Scientific Reports**. 2017; 7:1777. doi:10.1038/s41598-017-01940-9.

ALI, B.; SABRIN, A. N.; LJUNG, K.; HASNAIN, S. Auxin production by plant associated bacteria: impact on endogenous IAA content and growth of *Triticum aestivum* L. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p.542-547, 2009.

ALTENBURG, T.; HILDEGARD, D.; MATTHIAS, H.; NIKOS, N.; CHRISTINA, R.; KATHRIN, S. **Biodiesel in India. Value Chain Organization and Policy Options for Rural Development**. German Development Institute Studies. Bonn, Germany, 2009. 159p.

ALVES, J. M. A; SOUSA, A. A.; SILVA, S. R. G.; LOPES, G. N.; SMIDERLE, O. J.; UCHÔA, S. C. P. Pinhão-manso: Uma alternativa para a produção de Biodiesel na agricultura familiar da Amazônia brasileira. **Agro@mbiente On-line**, v.2, 2008.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; PORTO, A. L. F.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor spp.* for production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, 2002.

ANDRADE, L. F. **Bactérias endofíticas de bananeira “Prata-Anã”: Fixação de Nitrogênio, Solubilização de Fosfato de Cálcio e Produção de Ácido Indol-3- Acético**. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, 2012.

ANDREOTE, F. D.; SILVA, M. C. P. **Diversidade microbiana: causas e consequências – como acessá-la**. In: AZEVEDO, J. L. et al. (Eds.): *Bioteconologia Microbiana Ambiental*. 1. ed. Maringá: Eduem, p. 59, 2018.

ANBU, P.; GOPINATH, S. C. B.; CHAULAGAIN, B. P.; LAKSHMIPRIYA, T. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine. **BioMed Research International**, vol. 2017, ID 2195808, 3 p., 2017.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C. J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effects on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant Soil**, v.204, p. 57-67, 1998.

AMORIM, E. P. R.; MELO, I. S. Ação antagônica de rizobactérias contra *Phytophthora parasitica* e *P. citrophthora* e seu efeito no desenvolvimento de plântulas de citros. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.24, n.2, p.565-568, 2002.

ARAÚJO, W. L.; QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T.; AGUILAR-VILDOSO, C. I.; MARCON, J.; LIMA, A. O. S.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. **Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização**. 1. ed. Santarém: UFOPA, v. 1, p. 257, 2014.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A.P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o Semi-Árido Nordeste. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**. Campina Grande, v. 8, p.789-799, 2004.

ASSUMPCÃO, L. C.; LACAVA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.

AUDIPUDI, A. V.; CHAKICHERLA; B. V.; BHORE, S. J. Bacterial Endophytes as Biofertilizers and Biocontrol Agents for Sustainable Agriculture. **Biotechnology for Sustainability**, p. 223-247, 2017.

AVELAR, R.C.; JUNCO, B.B.; CASTRO NETO, P.; FRAGA, A.C. Incidência de oídio (*Oidium heveae*) em acessos do banco de germoplasma de pinhão-manso da UFPA. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Anais**. Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia, 2007.

AZEVEDO, J. L. Botânica: uma ciência básica ou aplicada? **Revista brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 2, p. 225-229, 1999.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI JUNIOR, W.; PEREIRA, J. O.; ARAÚJO, W. L. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, 2000.

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

BACKMAN, P. A.; WILSON, M.; MURPHY, J. F. Bacteria for Biological Control of Plant Diseases. In: RECHIGL, N. A., RECHIGL, J. E. **Environmentally Safe Approaches to Crop Disease Control**. New York: Lewis Publishers, 1997, p. 95-109.

BALDANI J., REIS V., VIDEIRA S., BODDEY L., BALDANI V. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant Soil** 384, 413–431, 2014.

BAR, T.; OKON, Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3- acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa v.39, p. 81-86, 1993.

BATISTA, B.D. **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)** 2012. 129 p. Dissertação

(Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

BATISTA B.D., LACAVALA P.T., FERRARI A., TEIXEIRA-SILVA N.S., BONATELLI M.L., TSUI S., MONDIN M., KITAJIMA E.W., PEREIRA J.O., AZEVEDO J.L., QUECINE M.C. Screening of tropically derived, multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research**, v.206, p. 33-42, 2018.

BATISTA, B. D.; QUECINE-VERDI, M. C.; LACAVALA, P. T. Mecanismos de promoção de crescimento vegetal por endófitos e rizobactérias. In: AZEVEDO, J. L. et al. (Eds.). **Bioteconologia Microbiana Ambiental**. 1. ed. Maringá: Eduem, p. 331 il, 2018.

BECKERS, B.; BEECK, M. O.; WEYENS, N.; BOERJAN, W.; VANGRONSVELD, J. Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. **Microbiome**, v. 5 (25), 17p., 2017.

BENAISSA, A. Plant Growth Promoting Rhizobacteria A review. Algerian Journal of **Environmental Science and Technology**, v.5., p.873-880, 2019.

BENT, S. J.; FORNEY, L. J. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *International Society for Microbial Ecology*, v. 2, p. 689- 695, 2008.

BERMANN, C. Crise ambiental e as energias renováveis. **Ciência e Cultura (SBPC)**, v. 60, p. 20-29, 2008.

BERRAQUERO, F.R.; BAYA, A.M.; CORMENZANA, A.R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, Granada, v.17, p. 399-406, 1976.

BIODIESELBR. **O maior portal sobre biodiesel do mundo**. 2013. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com>>.

BOHANNAN, B.; HUGHES, J. New approaches to analyzing microbial biodiversity data. **Current Opinion in Microbiology**, p.282-287, 2003.

BONATELLI, M.L. **Bactérias endofíticas e epifíticas cultivadas e não cultivadas do guaranazeiro e o controle da antracnose**. 2012. 84 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2012.

BOHNER, T. O. L.; ARAÚJO, L. E. B.; NISHIJIMA, T. O. impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. **Revista Eletrônica do Curso de Direito**, v. 8, edição especial, p. 329-341, 2013

BORGES, R. C. F.; MARQUES, E.; MACEDO, M. A.; MARTINS, I.; FILHO, J. G. S.; MELLO, S. C. M. BIOCONTROL OF TEAK CANCKER CAUSED BY *Lasiodiplodia theobromae*. **Revista Árvore**, v. 42, e420304, 2018.

BRADER, G.; COMPANT, S.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; SESSITSCH, A. Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v.27, p. 30–37, 2014.

BRANDI, F.; HECK, D. W.; FERREIRA, T. C.; BETTIOL, W. Commercial formulations of *Bacillus* spp. for sugarcane pineapple disease control and growth promotion. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.53, p.1311-1319, 2018.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 Janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, Seção 1, p.8, 2005.

BRIC, J.M.; BOSTOCK, R.M.; SILVERSTONE, S.E. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p. 535-538, 1991.

BRITTAINE, R.; LUTALADIO, N. **Jatropha**: a smallholder bioenergy crop. Rome: FAO, 2010. 96 p. (Integrated Crop Management, 8).

BUENO, J.C.; FISCHER, I.H. Manejo de fungos fitopatogênicos habitantes do solo. **Pesquisa & Tecnologia**, v.3, p. 1-9, 2006.

BROUZOS, N., **Separating Jatropha facts from Jatropha fiction**. In: Eighth Annual World Biofuels Markets. Rotterdam, The Netherlands, p. 12-14, 2013.

BUERMANS, H.P.; DUNNEN, J. T. Next generation sequencing technology: advances and applications. *Biochimica et biophysica acta (BBA) – Molecular basis of disease*, v. 1842, n. 10, p. 1932-1941, 2014.

CALDERON, F. J., NIELSEN, D., ACOSTA-MARTINEZ, V., VIGIL, M. F. & LYON, D. Cover Crop and Irrigation Effects on Soil Microbial Communities and Enzymes in Semiarid Agroecosystems of the Central Great Plains of North America. **Pedosphere**, v.26, p.192–205 2016.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences- USA* 108(Suppl 1), p. 4516-4522

CARDOSO, J. E.; WILKINSON, M. J. Desenvolvimento e caracterização de marcadores microsatélites para o fungo *Lasiodiplodia theobromae*. **Summa Phytopathology**, v.34, p.55-57, 2008.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W. A.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; PINHEIRO, A. R. O.; FARIA, N. M. X.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Segurança Alimentar e Nutricional e saúde. In: Carneiro, F. F.; Augusto, L. G. S.; Rigotto, R. M. Friedrich, K.; Burigo, A. C., (orgs). **Dossie ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro/São Paulo: EPSJV/ Expressão Popular, p.46-89, 2015.

CARNIELLI, F. O combustível do futuro. **Boletim Informativo** -UFMG, Belo Horizonte, v. 29, n. 1413, 2003. Disponível em: <http://www.ufmg.br/boletim/bol1413/>.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian arch of biology and Technology**. Viçosa, v.49, p. 353-359, 2006.

CASTRO, C. M.; DEVIDE, A. C. P.; ANACLETO, A. H. Avaliação de acessos de Pinhão Manso em sistema de Agricultura Familiar. **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, São Paulo, v.1, p. 41-49, 2008.

CASTRO, R. A.; QUECINE, C. Q.; LACAVALA, P. T.; BATISTA, B. D.; LUVIZOTTO, D. M.; MARCON, J.; FERREIRA, A.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Isolation and enzyme

bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. **Springerplus**, v.3, p. 1-9, 2014.

CASTRO, R. A.; DOURADO, M. N.; ALMEIDA, J. R.; LACAVA, P. T.; NAVE, A.; MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. Q. Mangrove endophyte promotes reforestation tree (*Acacia polyphylla*) growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, 8p. 2017.

CATTELAN, A.J. **Screening and characterization of soil and rhizosphere bacteria for traits that promote early soybean growth**. 1998. 89p. Tese de Doutorado - University of Georgia, Georgia, 1998.

CATTELAN, A.J. **Métodos qualitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras de crescimento vegetal**. Londrina: Embrapa Soja, 1999. 36 p. 124

CAVAGLIERI, L.; ANDRÉS, L.; IBÁÑEZ, M.; ETCHEVERRY, M. Rhizobacteria and their potential to control *Fusarium verticillioides*: effect of maize bacterisation and inoculum density. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.87, p. 179-187, 2005.

CARRIM, A. J. I.; BARBOSA, E. C.; VIEIRA, J. D. G. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). **Brazilian arch. of biology and Technology**. Viçosa, v.49, p. 353-359, 2006.

CERIOLIOLI, M. M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento**. 2005. 132p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de São Carlos , São Carlos, São Paulo, 2005.

CHANG, C.; CHEN, W.; LUO, S.; MA, L.; LI, X.; TIAN, C. Rhizosphere microbiota assemblage associated with wild and cultivated soybeans grown in three types of soil suspensions. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 65, p.1-14, 2018.

CHAUHAN, H.; BAGYARAJ, D.J.; SHARMA, A. Plant growth promoting bacterial endophytes from sugarcane and their potential in promoting growth of the host under field conditions. *Experimental Agriculture*, Cambridge, v.49, p. 43-52, 2013.

CHÁVEZ-ROMERO, Y.; NAVARRO-NOYA, Y. E.; REYNOSOMARTÍNEZ, S. C.; SARRIA-GUZMÁN, Y.; GOVAERTS, B.; VERHULST, N.; DENDOOVEN, L.; LUNA-GUIDO, M. 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillagecrop residue management. *Soil and Tillage Research*, v. 159, p. 1–8, 2016.

CHE J., LIU B., RUAN C., TANG J., HUANG D. Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. **Crop Protection**, v.67, p. 178–183, 2015.

CHIEN, S. H., PROCHNOW, L. I., TU, S. E SNYDER, C. S. Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, p. 229-255, 2011.

CHOUBANE, S.; CHEBA, B. A.; BENOURRAD, A. Screening and Phenotypic Diversity of Amylase Producing Rhizospheric Bacteria from Some North African Plants. **Procedia Technology**, v. 22, p. 1197-1204, 2016.



CIPRIANO, M. A. P.; PATRÍCIO, F. R. A.; FREITAS, S. S. Potencial de rizobactérias na promoção de crescimento e controle da podridão radicular em alface hidropônica. **Summa Phytopathologica**, v.39, n.1, p.51-57, 2013.

COLWELL, R.; CODDINGTON, J. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, p. 101-118, 1994.

CONTRAN, N.; CHESSA, L.; LUBINO, M.; BELLAVITE, D.; ROGGERO, P. P.; ENNE, G. State-of-the art of the *Jatropha curcas* productive chain: from sowing to biodiesel and by-products. **Industrial Crops and Products**. v.42, p.202-215, 2013.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2015). <http://www.conab.gov.br>.

CORNÉ M. J.; PIETERSE, C. Z.; BERENDSEN, R. L.; WELLER, D. M.; WEES, S. C. M. V.; BAKKER, P. A. H. M. **Annual Review of Phytopathology**, v.52, p. 347-375, 2014.

CORREA-GALEOTE, D., BEDMAR, E. J., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A. J., FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M., E ARONE, G. J. Bacterial Communities in the Rhizosphere of Amilaceous Maize (*Zea mays* L.) as Assessed by Pyrosequencing. **Frontiers in plant science**, v.7, 8p., 2016.

CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas**. Lisboa: Clássica, 1956. 231p.

COSTA, A. T.; GARCIA, A.; SPECIAN, V.; PAMPHILE, J. A. Prospecção biotecnológica para a produção de enzimas microbianas. In: AZEVEDO, J. L. et al. (Eds.). **Bioteconologia Microbiana Ambiental**. 1. ed. Maringá: Eduem, p. 185-208, 2018.

COSTA, D. P.; DIAS, A. C. F.; DURRER, A.; ANDRADE, P. A. M.; GUMIERE, T.; ANDREOTE, F. D. Composição diferencial das comunidades bacterianas na rizosfera de variedades de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, v. 38, n. 6, p. 1694-1702, 2014.

COSTA, H. P. S. **Purificação e caracterização de um inibidor de tripsina com atividade antimicrobiana da torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. 118 f.: Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Fortaleza-CE, 2012.

COUTINHO, I. B. L. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E CONTROLE DE FUNGOS DA FAMÍLIA Botryosphaeriaceae EM FRUTEIRAS TROPICAIS**. 2016. 138p. Tese de Doutorado em Agronomia/Fitotecnia, da Universidade Federal do Ceará, 2016.

COUTINHO, I. B. L., FREIRE, F. C. O., LIMA, C. S., LIMA, J. S., GONÇALVES, F. J. T., MACHADO, A. R., CARDOSO, J. E. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. **Plant Pathology**, v.66, p. 90–104, 2016.

DEVAPPA, R. K.; ANGULO-HARINDER, M. A.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, KLAUS. Potential of using phorbol esters as an insecticide against *Spodoptera frugiperda*. **Industrial Crops and Products**, v.38, p. 50-53, 2012.

DESANTIS, T. Z, HUGENHOLTZ, P.; LARSEN, N.; ROJAS, M.; BRODIE, E. L.; KELLER, K.; HUBER, T.; DALEVI, D.; HU P.; ANDERSEN, G. L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied And Environmental Microbiology**, p. 5069–5072, 2006.

DIAS, L. A. S. **Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.): para produção de óleo combustível**, Viçosa, Editora UFV, 2007. 40p.

DIAS, L. A. S., LEME, L. P., LAVIOLA, B. G., PALLINI FILHO, A., PEREIRA, O. L., CARVALHO, M., MANFIO, C. E., SANTOS, A. S., SOUSA, L. C. A., OLIVEIRA, T. S. E DIAS, D. C. F. S. **Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas*)**. Viçosa: UFV. 2007.

DIAS, A. C. F.; ANDREOTE, F. D.; DINI-ANDREOTE, F.; LACAVA, P. T.; SÁ, A. L. B.; MELO I. S, AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Diversity and biotechnological potential of culturable bacteria from Brazilian mangrove sediment. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.25, p. 1305-1311, 2009.

DIAS A. CF, COSTA FEC, ANDREOTE FD, LACAVA PT, TEIXEIRA MA, ASSUMPÇÃO LC, ARAÚJO WL, AZEVEDO JL, MELO IS. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.25, p. 189-195, 2009.

DINIZ, G. F. D. **SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE AGENTES PARA O BIOCONTROLE DE *Fusarium verticillioides* NA CULTURA DO MILHO**. 69p.: Dissertação (Mestrado- Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias) – Universidade Federal de São João del-Rei, Campus Sete Lagoas, 2018.

DINIZ, G. de F. D.; RIBEIRO, V. P.; SOARES, E. A. C.; AGUIAR, F. M.; COTA, L. V.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, C. A. O. Produção de enzimas hidrolíticas por microrganismos endofíticos de milho antagonistas a *Fusarium verticillioides*. In: Congresso Latinoamericano De Microbiologia, 9. **Anais**, Santiago, Chile, 2018.

DÖBEREINER J; DAY J. M **Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites**. In: Newton WE, Nyman CJN (eds) Proc 1st Int Symp Nitrogen Fixation Washington: Pullman, Washington State University Press, p 518–538, 1976.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and Economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p. 771-774, 1995.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa, SPI, 1995. 60p.

DORJEY, S.; DOLKAR, D.; SHARMA, R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Pseudomonas*: A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Science**, v.6, p. 1335-1344, 2017.

DUBEY, G.; KOLLAH, B.; GOUR, V. K.; SHUKLA, A. K.; MOHANTY, S. R. Diversity of bacteria and archaea in the rhizosphere of bioenergy crop *Jatropha curcas*, **Biotech**, v.6, 2016. 10p.

DUARTE, G.M.; CERIBELLI, M. G. A.; CARDOSO, A. M.; DORNELLES, M. S.; SOUCHIE, E. L. População de micro-organismos solubilizadores de fosfato de cálcio na rizosfera de milho transgênico e crioulo, cultivados com solo de agroecossistemas em Urutaí, GO. In: Resumos do IV Seminário de Agroecologia do Distrito Federal e Entorno - Brasília/DF. **Cadernos de Agroecologia**, v. 9, 2014.

DUNGAIT, J. A.; CARDENAS, L. M.; BLACKWELL, M. S. A.; WU, L.; WITHERS, P. J. A.; CHADWICK, D. R.; BOL, R.; MURRAY, P. J.; MACDONALD, A. J.; WHITMORE, A. P.; GOULDING, K. W. T. Advances in the understanding of nutrient dynamics and management in UK agriculture. **Science of the Total Environment**, p.39-50, 2012.

DURÃES, F. O.; LAVIOLA B. **Pinhão manso: matéria-prima potencial para produção de biodiesel no Brasil**. Brasília, D.F.: Embrapa Agroenergia, 2010.

DURAES, F. O. M.; LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Potential and challenges in making physic nut (*Jatropha curcas* L.) a viable biofuel crop: the Brazilian perspective. **CAB Reviews**, v. 7, p. 1-8, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Rio de Janeiro, 1999. 412p.

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

FAN, B.; WANG, C.; SONG, X.; DING, X.; WU, L.; WU, H.; BORRIS, R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The Gram-Positive Model Strain for Plant Growth Promotion and Biocontrol. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2018.

FAO. **El Estado de la inseguridad alimentaria en el mundo 2009 ‘Crisis económicas: repercusiones y enseñanzas Extraídas’**. Nota para imprensa. Roma: Organización para a Agricultura e a Alimentação, 2009.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.35, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, B. P. **Efeito do adubo orgânico na diversidade bacteriana de solos**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

FIGUEIREDO, G. G. O.; LOPES, V. R.; FILHO, J. C. B.; DAROS, E. Effect of substrates and plant growth promoting bacteria in the germination of sugarcane seeds. **Revista de Ciências Agrárias**, p. 447-454, 2013.

FIGUEROA-LÓPEZ, A. M.; CORDERO-RAMÍREZ, J. D.; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, J. C.; LÓPEZ-MEYER, M.; LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G. J.; FÉLIX-GASTÉLUM, R.; MALDONADO-MENDOZA, I. E. Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. **SpringerPlus**, v.5, p. 330, 2016.

FISCHER, I. H.; ALMEIDA, A. M.; GARCIA, M. J. M.; BERTANI, R. M. A.; BUENO, C. J. First report of *Lasiodiplodia theobromae* on *Asclepias physocarpa* in Brazil. **Australasian Plant Diseases Notes**, v. 3, p.116-117, 2008.

FINKEL, O. M.; CASTRILLO, G.; PAREDES, S. H.; GONZALEZ, I. S.; JEFFERY L DANGL. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. **Current Opinion in Plant Biology**, v.38, p.55-163, 2017.

FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. **Journal of Biotechnology**, v. 285, p.44-55, 2018.

FLORENCIO, C.; COURI, S.; FARINAS, C. S. Correlation between agar plate screening and solid-state fermentation for the prediction of cellulase production by *trichoderma* strains. **Enzyme Research**, [S. l.], 2012 Biblioteca(s): Embrapa Instrumentação;

FRANCIS, G.; EDINGER, R.; BECKER, K. A concept for simultaneous wasteland reclamation, fuel production, and socio-economic development in degraded areas in India: Need, potencial and perspectives of *Jatropha* plantations. **Natural Resources Forum**, New York, v.29, p.12-24, 2005.

FRANCISCO, João Paulo. **Estimativa da transpiração de pinhão-manso com a utilização do método de dissipação térmica**. 2017. Tese de Doutorado - Universidade de São Paulo (USP). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz Piracicaba.

FRANCO, D. A. S.; GABRIEL, D. Aspectos fitossanitários na cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de biodiesel. **Biológico**, v. 70, n. 1, p. 63-64, 2008.

FUJINAWA, M. F.; PONTES, N. C.; SOUZA, E. S. C.; GOES, A.; VALE, H. M. M. First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem rot disease of begonia (*Begonia x elatior* hort.) in Brazil. **Australasian Plant Disease Notes**, v.7, p.163-166, 2012.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C. de, BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCHI, R. A.; ALVES, S.B., VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V.; TROGELLO, E.; FRITSCHÉ-NETO, R. Sete décadas de evolução do sistema produtivo da cultura do milho. **Revista Ceres**, p. 819-828, 2014.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Agricultural Microbiology**, v.82, p. 01-09, 2015.

GEETHA, K.; VENKATESHAM, E.; HINDUMATHI, A.; BHADRAIAH, B. Isolation, screening and characterization of plant growth promoting bacteria and their effect on *Vigna Radita* (L.) R.Wilczek. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.3, p. 799-809, 2014.

GERPEN J. V.; KNOTHE, G. Biodiesel production. In: KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J. (Ed.). *The biodiesel handbook*. Urbana: AOCS Press, cap. 4, p. 26-42, 2004.

GHODSALAVI, B.; AHMADZADEH, M.; SOLEIMANI, M.; MADLOO, P. B.; TAGHIZAD-FARID, R. Isolation and characterization of rhizobacteria and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis*. **Australian Journal of Crop Science**, v.7, p. 338-344, 2013.

GHOSH, A.; MAITY, B.; CHAKRABARTI, K.; CHATTOPADHYAY, D. Bacterial diversity of east calcutta wet land area: possible identification of potential bacterial population for different biotechnological uses. **Microbial Ecology**, Washington, v.54, p. 452-459, 2007.

GLICK B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v.169, p. 30-39, 2014.

GLICKMANN E, DESSAUX Y. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.793-796. 1995.

GOMIERO, T.; PIMENTEL, D.; PAOLETTI, M. G. Environmental impact of different agricultural management practices: conventional vs. organic agriculture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, Londres, p. 95-124, 2011.

GONZÁLEZ-LÓPEZ L., RODELAS B., POZO C., SALMERÓN-LÓPEZ V., MARTÍNEZ-TOLEDO M.V., SALMERÓN V. Liberation of amino acids by heterotrophic nitrogen fixing bacteria. **Amino Acids**, v. 28, p. 363-367, 2005.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v.2, p. 1-19, 2016.

GOUDA, S.; KERRYB, R. G.; DASC, G.; PARAMITHIOTISD, S.; SHINE, H. S.; PATRAC, J. K. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131-140, 2018.

GRAÇAS, J. P.; RIBEIRO, C.; COELHO, F. A. A.; CARVALHO, M. E. A.; CASTRO, P. R. C. **Microrganismos estimulantes na agricultura**. Piracicaba-SP: Divisão de Biblioteca-ESALQ/USP, 61 p, 2015.

GRIFFIN, M. F. Biocontrol and Bioremediation: Two Areas of Endophytic Research Which Hold Great Promise. In: Verma, V. C.; Gange A. C. (eds.), **Advances in Endophytic Research**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 231-256, 2014.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology & Biochemistry*, Elmsford, n. 37, p. 395 - 412, 2005.

GUPTA, A.; RAI, V.; BAGDWAL, N.; GOEL, R. In situ characterization of mercury resistant growth promoting fluorescent pseudomonads. **Microbiological Research**, v.160, p. 385-388, 2005.

GUPTA, G.; PARIHAR, S. S.; AHIRWAR, N. K.; SNEHI, S. K.; SINGH, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v.7, p. 96-102, 2015.

HALEK, F.; DELAVARI, A.; KAVOUSI-RAHIM, A. Production of biodiesel as a renewable energy source from castor oil. **Clean Technologies and Environmental Policy** - Springer, v.15, p. 1063–1068, 2013.

HALFELD-VIEIRA; B. A.; NECHET, K. L. Queda de frutos em coqueiro causada por *Lasiodiplodia theobromae* em Roraima. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, p.203, 2005.

HALMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F.; KLOEPPER, J.W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 43, p. 895-914, 1997.

HANDELSMAN J, STABB, E. V. Biocontrol of soilborne plant pathogens. **Plant Cell**, v.8, p.1855–1869, 1996.

HANDESLMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J. and GOODMAN, R. M. Molecular biological acces to the chemistry or unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry and Biology**, v.5, p.245-249, 1998.

HANDELSMAN, J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 68, p. 669-685, 2004.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p. 235-251, 2006.

HASSEN, W.; NEIFAR, M.; CHERIF, H.; NAJJARI, A.; CHOUCANE, H.; DRIOUICH, R.C.; SALAH, A.; NAILI, F.; MOSBAH, A.; SOUISSI, Y.; RADDADI, N.; OUZAR, H. I.; FAVA, F.; CHERIF, A. *Pseudomonas rhizophila* S211, a New Plant Growth-Promoting Rhizobacterium with Potential in Pesticide-Bioremediation. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 17p., 2018.

HE, R., WANG, G.; LIU X.; ZHANG, C.; LIN, F. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p.191-195, 2009.

HECK, K.; VAN BELLE, G.; SIMBERLO, D. Explicit calculation of the rarefaction diversity measurement and the determination of sufficient sample size. *Ecology*, p. 1459-1461, 1975.

HEIFFIG-DEL AGUILA, L.S. Potencial da cultura do pinhão-manso na produção de biocombustíveis. In: CÂMARA, G. M. S.(Org.) **SOJA & CIA**, Piracicaba – SP, ESALQ, 334 p, 2009.

HELLER, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L.: promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. 1 ed. Roma: IPGRI, 1996. 66p.

HENDRICKSON, H.S. Lipases part A: biotechnology. **Methods in Enzymology**, Amsterdam, v.284, p. 146-146, 1997.

HENNING, R. K. **The *Jatropha* System. An integrated approach of rural development**. 2009. Disponível em: <<http://www.jatropha.de/documents/The%20Jatropha%20Book-2009.pdf>>. Acesso em: 17 Junho 2019.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soils**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.

HUGHES, J.; HELLMANN, J. J.; RICKETTS, T. H.; BOHANNAN. B. Counting the Uncountable: Statistical Approaches to Estimating Microbial Diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4399-4406, 2001.

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

ISLAM, S.; AKANDA, A. M.; PROVA, A.; ISLAM, MD. T.; HOSSAIN, M. Isolation and Identification of Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Cucumber Rhizosphere and their Effect on Plant Growth Promotion and Disease Suppression. **Frontiers in Microbiology**, v.6, 1360, 2015.

JANSSEN, P. H. Janssen 2000. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, v. 72, n. 3, p. 1719–1728, 2006.

JESUS, M. F. C. P., BRANCO, R. N; SANT'ANNA JR., G.L; FREIRE, D. M. G.; SILVA JR., J.G. "*Penicillium restrictum* lipases: A comparative study and characterization of enzymes with different degrees of purity", **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 16, n. 2, p. 113-118, 1999

JHA, C. K.; ANNAPURNA, K.; SARAF, M. Isolation of Rhizobacteria from *Jatropha curcas* and characterization of produced ACC deaminase. **Journal of Basic Microbiology**, v.52, p. 285-295, 2012.

JISHA, V.N.; SMITHA, R.B.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNNI, K.N.; SAJITH, S.; PRIJI, P.; JOSH, M.S.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, n. 3, p. 39-51, 2013.

JUNIOR, F. B. R.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Fixação Biológica de Nitrogênio: Fundamentos

e Aplicações. In: AZEVEDO, J. L. et al. (Eds.). **Bioteconologia Microbiana Ambiental**. 1. ed. Maringá: Eduem, 2018. p.131-163.

KAFRAWI, NILDAYANTI, ZAHRAENI K, BAHARUDDIN. Comparison of IAA Production by Shallot Rhizosphere Isolated Bacteria in Solid and Liquid Media and Their Effect on Shallot Plant Growth. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v.9, p.266-269, 2017.

KAKIRDE, K. S.; PARSLEY, L.C.; LILES, M. R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. *Soil Biology and Biochemistry*. v.42, n. 11, p, 1911-1923, 2010.

KAMIL, F. H.; SAEED, E. E.; EL-TARABILY, K. A.; ABUQAMAR, S. F. Biological Control of Mango Dieback Disease Caused by *Lasiodiplodia theobromae* Using *Streptomyces* and Non-streptomyces *Actinobacteria* in the United Arab Emirates. **Frontiers in Microbiology**, v.9, Article:829, 2018.

KÄMPFER, P. Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria. In: Development in Plant and soil science: First International Meeting on Microbial phosphate Solubilization, Salamanca, Spain, **Anais**. Netherlands, p.101-106, 2003.

KANDEL, S. L.; JOUBERT, P. M.; DOTY, S. L. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. **Microorganisms**, v.5(4), p.77, 2017.

KANG, S. M., JOO, G. J., HAMAYUN, M., NA, C. I., SHIN, D. H., KIM, H. Y., HONG, J.K.; LEE, I. J. Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. **Biotechnology Letters**, v.31, p. 277-281, 2009.

KAVAMURA, V. N.; SANTOS, S. N.; SILVA, J. L.; PARMA, M. M.; AVILA, L. A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T. D.; TAKETANI, R. G.; ANDREOTE, F. D.; MELO, I. S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v.168, p. 183-191, 2013.

KAZLAUKAS, R.J. BORNSCHEUER, U.T. Biotransformation with lipases. In: (Ed.) KELLY, D.R. **Biotechnology**. New York: Wiley Weinheim VCH, p. 37-191, 1998.

KHAN AR, PARK GS, ASAF S, HONG SJ, JUNG BK, SHIN JH. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. **PLoS One**, v.12, e0171534, 2017.

KHAN, A. R.; PARK, G. S.; ASAF, S.; HONG, S. J.; JUNG, B. K.; SHIN, J. H. Complete genome analysis of *Serratia marcescens* RSC-14: A plant growth-promoting bacterium that alleviates cadmium stress in host plants. **Plos One**, v.12, e0171534, 2017.

KHARE, E.; MISHRA, J.; ARORA, N. K. Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. **Frontiers Microbiology**, v.9:2732, 2018.

KHIANNAM, S.; TECHAKRIENGKRAI, T.; RAKSASIRI, B. V.; KANJANAMANEESATHIAN, M.; TANASUPAWAT, S. Isolation and screening of endophytic bacteria for hydrolytic enzymes from plant in mangrove forest at Pranburi, Prachuap Khiri Khan, Thailand. In: Schneider C, Leifert C, Feldmann F, editors. **Endophytes for plant protection: the state of the art. Proc 5th Int Symp Plant Protect Plant Health Europe**. Berlin: Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft; p. 279-284. 2013.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005.

KLOEPPER, J. W. Current Status and Future Trends in Biocontrol Research and Development in the U.S. In: International Symposium of Clean Agriculture, 1997, Japão. **Anais Simpósio**. Japão, p. 49-52, 1997.

KOBAYASTI, L.; ADORIAM; A. I.; PAIVA NETO; V. B.; ALVES, C. Z.; ZUFFO, M. C. R. Incidência de fungos em sementes de pinhão-manso. **Pesquisa. Agropecuária. Tropical**, Goiânia, v.41, p. 385-390, 2011.

KÖHL, J.; KOLNAAR, R.; RAVENSBERG, W. J. Mode of Action of Microbial Biological Control Agents Against Plant Diseases: Relevance Beyond Efficacy. **Frontiers in Plant Science**, 10, 2019.

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes. 1928.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, 2011.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial Crops and Products**, v.28, p. 1-10, 2008.

KUMAR, P.; SRIVASTAVA, V. C.; JHA, M. K. *Jatropha curcas* phytotomy and applications: Development as a potential biofuel plant through biotechnological advancements. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.59, p 818-858, 2016.

KUMAR, A.; TEWARI, S. K. Origin, distribution, ethnobotany and pharmacology of *Jatropha curcas*. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 9, p. 48-59. 2015.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic Bacteria: A Biotechnological Potential in Agrobiological System. In: Maheshwari D. K.; Sarah M.; Aeron A. (eds.), **Bacteria in Agrobiological Crop Productivity**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 1-44, 2013.

LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Biological Control of Insect-Pest and Diseases by Endophytes. In: Verma, V. C.; Gange A. C. (eds.), **Advances in Endophytic Research**, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 231-256, 2014.

LACAVA, P. T.; MELO, I. S.; PEREIRA, J. O. Controle biológico e simbiótico de insetos-pragas e doenças por micro-organismos endofíticos. In: AZEVEDO, J. L. et al. (Eds.). **Bioteconologia Microbiana Ambiental**. 1. ed. Maringá: Eduem, 2018. p. 83–104.

LACAVA, P. T.; SOUSA, C. P. DE. Role of Endophytic Actinomycetes in Crop Protection: Plant Growth Promotion and Biological Control. In: **Plant Growth Promoting Actinobacteria**. Singapore: Springer, p. 147–160, 2016.

LAMBRECHT, M.; OKON, Y.; VANDE BROEK, A.; VANDERELEYDEN, J. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. **Trends in Microbiology**, v.8, p.298-300, 2000.

LATHA, P., PRAKASAM, V., KAMALAKANNAN, A., GOPALKRISHNAN, C., RAGHUCHANDER, T., PARMATHMA, M. AND SAMIYAPPAN, R. (2009). First report of *Lasiodyplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl causing root rot and collar rot disease of physic



nut (*Jatropha curcas* L.) in India. **Australian Plant Disease**, v.4, p.19-20

LASA, A.V.; MAŠÍNOVÁ, T.; BALDRIAN, P.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. Bacteria from the endosphere and rhizosphere of *Quercus* spp. use mainly cell wall-associated enzymes to decompose organic matter. **PLoS ONE** 14(3): e0214422, 2019.

LAVIOLA, B.G.; BHERING, L.L.; MENDONÇA, S.; ROSADO, T.B.; ALBRECHT, J.C. Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhão manso na fase jovem. **Bioscience Journal**, v.27, p.371-379, 2011.

LAVIOLA, B. G; ALVES, A.A; KOBAYASHI, A. K.; FORMIGHIERI. **Situação atual do pinhão-manso no Brasil e no mundo**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2015. 7p. (Embrapa Agroenergia. Comunicado técnico, 012).

LEITE, M. C. B. S.; PEREIRA, A. P. A.; SOUZA, A. J.; ANDREOTE, F. D.; FREIRE, F. J.; SOBRAL, J. K. Bioprospection and genetic diversity of endophytic bacteria associated with cassava plant. *Rev. Caatinga*, Mossoró, v. 31, n. 2, p. 315-325, 2018.

LI, H.-B., SINGH, R. K., SINGH, P., SONG, Q.-Q., XING, Y.-X., YANG, L.-T., & LI, Y.-R. Genetic Diversity of Nitrogen-Fixing and Plant Growth Promoting *Pseudomonas* Species Isolated from Sugarcane Rhizosphere. **Frontiers in Microbiology**, 8, 2017.

LI, P.; KWOK, A. H. Y.; JIANG, J.; RAN, T.; XU, D., WANG, W.; LEUNG, F. C. Comparative Genome Analyses of *Serratia marcescens* FS14 Reveals Its High Antagonistic Potential. **PLOS ONE**. 2015.

LIMA, L. A. **DRENAGEM DE TERRAS AGRICOLAS**. 2006. Disponível em: [http://www.leb.esalq.usp.br/leb/disciplinas/Fernando/leb1440/Aula%2010/Apostila\\_Drenagem\\_UFLA\\_Luis%20Lima.pdf](http://www.leb.esalq.usp.br/leb/disciplinas/Fernando/leb1440/Aula%2010/Apostila_Drenagem_UFLA_Luis%20Lima.pdf).

LIMA, M. L. B.; LIMA, V. S. F.; SILVA, T. M.; ALMEIDA, J. P. N. Pinhão manso como alternativa para produção de biodiesel. **Agropecuária Científica do Semi-Árido**, v.8, p. 01-07, 2012.

LIZÁRRAGA-SÁNCHEZ, G. J.; LEYVA-MADRIGAL, K. Y.; SÁNCHEZ-PEÑA, P.; QUIROZ-FIGUEROA, F. R.; MALDONADO-MENDOZA, I. E. *Bacillus cereus* sensu lato strain B25 controls maize stalk and ear rot in Sinaloa, Mexico. **Field Crops Research**. p.176:1-21, 2015.

LOPEZ-BUCIO, J.; CAMPOS-CUEVAS, J. C.; HERNANDEZ-CALDERON E.; VELASQUEZBECERRA, C.; FARIAS-RODRIGUEZ, R.; MACIAS-RODRIGUEZ, L. I.; VALENCIA-CANTERO, E. *Bacillus megaterium* rhizobacteria promote growth and alter root system architecture through an auxin- and ethylene-independent signaling mechanism in *Arabidopsis thaliana*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.20, p. 207-217, 2007.

LÓPEZ-GUILLÉN, G., SOLÍS BONILLA, J. L., MARTÍNEZ VALENCIA, B. B., HERRERA PARRA, E., & ZAMARRIPA COLMENERO, A. Agronomy of *Jatropha curcas* in Mexico. *Jatropha*. **Challenges for a New Energy Crop**, p.255–272, 2019.

LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.19, p. 128-134, 2006.

MACHADO, A. R.; PEREIRA, O. L. Major diseases of the biofuel plant, physic nut (*Jatropha curcas*). In: Fang Z (ed) Biodiesel: Feedstocks, production and applications. **Intech**, Croatia, pp 59–75, 2012.

MACHADO, P. C. 2015. **Identificação molecular e caracterização bioquímica de bactérias endofíticas associadas à cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)** com potencial biotecnológico. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

MACHADO, P. C.; ANDRADE, P. H. M.; QUECINE, M. C.; LACAVAL, P. T. Potencial de promoção de crescimento vegetal de bactérias endofíticas associadas a *Jatropha curcas* L. **Ciência & Tecnologia: Fatec-JB** (Online), v. 8, p. 1-14, 2016.

MACHADO, A. R.; PINHO, D. B.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brasil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Diversity**, v.67, p.231–247, 2014.

MACHADO, A.T.; SODEK, L.; DÖBEREINER, J. & REIS, V.M. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, p.961-970, 1998.

MADHAIYAN, M.; PENG, N.; TEI, N. T.; HSIN, C.; LIN, C.; LIN, F.; REDDY, C.; YAN, H.; JI, L. Improvement of plant growth and seed yield in *Jatropha curcas* by a novel nitrogen-fixing root associated *Enterobacter* species. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, p. 1-13, 2012.

MADHAIYAN, M.; JIN, T. Y.; ROY, J. J.; KIM, S. J.; WEON, H. Y.; KWON, S. W.; JI, L. *Pleomorphomonas diazotrophica* sp. nov., an endophytic N-fixing bacterium isolated from root tissue of *Jatropha curcas* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.63, p. 2477–2483, 2013.

MAJDA, M.; ROBERT, S. The Role of Auxin in Cell Wall Expansion. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, p.951, 2018.

MANJULA, K.; PODILE, A. R. Increase in seedling emergence and dry weight of pigeon pea in the field with chitin-supplemented formulations of *Bacillus subtilis* AF 1. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, p.1057–1062, 2005.

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

MARKS, B. B. MEGÍAS, M., NOGUEIRA, M. A. E HUNGRIA, M. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **AMB Express**, p. 21, 2013.

MARON, P. A.; SARR, A.; KAISERMANN, A.; LÉVÊQUE, J.; MATHIEU, O.; GUIGUE, J.; KARIMI, B.; BERNARD, L.; DEQUIEDT, S.; TERRAT, S.; CHABBI, A.; RANJARD, L. High Microbial Diversity Promotes Soil Ecosystem Functioning Applied and **Environmental Microbiology**, v. 84 (9), 13p., 2018.

MATTOS, M. L. T. **Microbiologia do solo**. In: NUNES, R. R.; REZENDE, M. O. O. (Org.). *Recurso Solo: Propriedades e Usos*. São Carlos: Editora Cubo, 2015. p. 250-272.

- MELO, I.S; AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1998.
- MENDES M. A. S; URBEN, A. F. (2012). Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.
- MENDES, L.W. et al. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. *Microb. Ecol.*, 2015.
- MENDES, R.; AZEVEDO, J. L. Valor biotecnológico de fungos endofíticos isolados de plantas de interesse econômico. In: COATA-MAIA, L.; MALOSSO, E.; YANOMELO, A. M. (Org.). **Micologia: avanços no conhecimento**. Recife: Sociedade Brasileira de Micologia, v. 1, p. 129-140, 2007.
- MENDEZ-BRAVO, A.; CORTAZAR-MURILLO, E. M.; GUEVARA-AVENDAÑO, E.; CEBALLOS-LUNA, O.; RODRIGUEZ-HAAS B.; KIEL-MARTINEZ A. L. Plant growth promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. **PLoS ONE** 13(3):18p. 2018.
- MENDONCA, E. A. F.; SOARES, M. A. Atividade antagonística a microrganismos patogênicos por bactérias endofíticas isoladas de *Echinodorus scaber* Rataj. **Summa phytopathologica**, v.41, p.229-232, 2015.
- MENEGHINE, A. K. **Análise metagenômica e potencial biotecnológico de microrganismos de solo e água de uma área agrícola com adubação orgânica**. 2016. 98 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.
- MIETHLING R G, WIELAND H, BACKHAUS H, TEBBE CC. Variation of microbial communities in response to crop species, soil origin and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L 33. **Microbial Ecology**, v.40, p.43-56, 2000.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. Secretaria Nacional de Política Agrícola, Companhia Nacional de Abastecimento. Revista de política agrícola, 1:1, 2014.
- MIRAGAYA, J. C. G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 7-13, 2005.
- MISHRA, R. K.; BOHRA, A.; KAMAAL, N.; KUMAR, K.; GANDHI, K.; SUJAYANAND, G. K.; SAABALE, P. R.; NAIK; S. J, SARMA, B. K .; KUMAR, D.; MISHRA, M.; SRIVASTAVA, D. K.; SINGH, N. P. Utilization of biopesticides as sustainable solutions for management of pests in legume crops: achievements and prospects. **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v.28, Article number: 3, 2018.
- MOHANTY, S. R., DUBEY, G., & KOLLAH, B. Endophytes of *Jatropha curcas* promote growth of maize. **Rhizosphere**, v.3, p.20–28. 2017.
- MONIRUZZAMAN, M.; YAAKOB, Z.; KHATUN, R. Biotechnology for *Jatropha* improvement: a worthy exploration. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, vol. 54, p. 1262-1277, 2016.
- MONTEIRO, L. C. P. **Diversidade microbiana na rizosfera de plantas em competição**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2016.

MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, p.74-99, 2010.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Rizosfera In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. Ed. Lavras: Editora UFLA, p. 407-447, 2006.

MÓRRÍGAN, TARIEL (2010). **Peak Energy**, Climate Change, and the Collapse of Global Civilization: The Current PeakOil Crisis. Global Climate Change, Human Security & Democracy, Orfalea Center for Global & International Studies, University of California, Santa Barbara.

MOTA, M. S.; GOMES, C. B.; SOUZA JUNIOR, I. T.; MOURA, A. B. Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. **Brazilian Journal of Microbiology**., v. 48, p. 62-70, 2017.

MUKHTAR, S.; MEHNAZ, S.; MIRZA.; M. S.; KAUSER, A. M. Isolation and characterization of bacteria associated with the rhizosphere of halophytes (*Salsola stocksii* and *Atriplex amnicola*) for production of hydrolytic enzymes **Brazilian Journal Microbiology**, v. 50, p. 85-97, 2019.

MUNAGANTI, R. K.; MUVVA, V.; KONDA, S.; NARAGANI, K.; MANGAMURI, U. K.; DORIGONDLA, K. R., AKKEWAR, D. M. Antimicrobial profile of *Arthrobacter kerguelensis* VL-RK\_09 isolated from Mango orchards. **Brazilian journal of microbiology**, v.47, p.1030–1038, 2016.

NAMULI, A., ABDULLAH, N.; SIEO, C. C.; ZUHAINIS, S. W.; OSKOU EIAN, E. Phytochemical compounds and antibacterial activity of *Jatropha curcas* Linn. Extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, p. 3982-3990, 2011.

NAVARRETE, A. A. et al. Acidobacterial community responses to agricultural management of soybean in Amazon forest soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 83, n. 3, p. 607–621, 2013.

NETTO, M. S. B.; LIMA, W. G.; CORREIA, K. C.; SILVA, C. F. B.; THON, M.; MARTINS, R. B.; MILLER, R. N. G.; MICHEREFF, S. J.; M. P. S.; CÂMARA. Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae espécies associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. **Fungal Biology**, v. 121, p. 437-451, 2017.

NIELSEN, S.; MINCHIN, T; KIMBER, S.; VAN ZWIETEN, L.; GILBERT, J.; MUNROE, P.; JOSEPH, S.; THOMAS, T. Comparative analysis of the microbial communities in agricultural soil amended with enhanced biochars or traditional fertilisers. *Agricultures, Ecosystems & Environment*, v. 191, p. 73-82, 2014.

NINGTHOUJAM, D. S.; SHOVARANI, N. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 Degrading p-Nitrophenol. **Research Journal of Microbiology**, v.5, p. 345-351, 2008.

OHIKE, T.; MAKUNI, K.; OKANAMI, M.; ANO, T. Screening of endophytic bacteria against fungal plant pathogens. **Journal of Environmental Sciences**, v.25, p.122-126. 2013.

OLIVEIRA, C. M., FRIZZAS, M. R.; DIANESE, A. C. **Principais pragas do pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) no Cerrado Brasileiro**. Brasília, Embrapa Cerrados. pp. 1-25, 2011. (Série Documentos, 306).

OLIVEIRA, I. J.; FONTES, J. R. A.; BRUNO FERNANDO FARIA PEREIRA, B. F. F.; Muniz,

A. W. Inoculation with *Azospirillum brasiliense* increases *maize* yield. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v.5, Article number: 6, 2018.

OLIVEIRA, M. D. G.; FERNANDES, M. G, MOTA, T. A.; OLIVEIRA, H. N. Distribuição espacial de adultos de *Empoasca kraemeri* (Hemiptera: Cicadellidae) em pinhão-manso *Jatropha curcas* L. **ENTOMOTROPICA**, V. 31, p. 237-243, 2016.

OMOTO, C.; BERNARDI, O.; SALMERON, E. **Manejo da resistência de *Spodoptera frugiperda* a inseticidas e plantas Bt** ESALQ/USP, jun. 2013. Disponível em: <<http://www.irac-br.org/folhetos>>

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.7, p.97-109, 2012.

OSKOUÉIAN, E.; ABDULLAH, N.; SAAD, W. Z.; OMAR, A. R.; AHMAD, S. KUAN, W. B.; AZLINA ZOLKIFLI, N.; HENDRA, R.; WAN HO, Y. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Jatropha curcas* Linn. **Journal of medicinal plant research**, v. 5, p. 49-57, 2011.

PAIM; E. C. A; SILVEIRA, A. J.; BEZERRA, J. L.; MARTINS, E. D.; LUZ, M. N.; SACRAMENTO, C. K. Etiologia do declínio de mangostanzeiros no sul da Bahia. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, 1074-1083, 2012.

PALMER, M. W. The estimation of species richness by extrapolation, *Ecology*, p. 1195 -1198, 1990.

PANPATTE, D. G.; JHALA, Y. K., SHELAT H. N.; VYAS R.V. *Pseudomonas fluorescens*: A Promising Biocontrol Agent and PGPR for Sustainable Agriculture. In: Singh D., Singh H., Prabha R. (eds) **Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity**. Springer, New Delhi,(2016)

PARIKH, S. J. Soil: the foundation of agriculture. *Nature Education Knowledge*, v.3, n. 10, p. 2, 2012.

PASSOS, J. F. M. Diversidade de bactérias cultiváveis em pomares de macieiras sob diferentes tipos de manejo e obtenção de clones metagenômicas indutores de resistências sistêmicas induzida nessa cultura. 2014. 61 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PATIL, P.; SABALE, S.; DEVALE, A. Isolation and Characterization of Protease Producing Bacteria from Rhizosphere Soil and Optimization of Protease Production Parameters. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.2, p. 58-64, 2015.

PAUL, D.; LADE, H. Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, Springer Verlag/EDP Sciences/INRA, v.34, p.737-752. 2014.

PEDRINHO, E. A. N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. 2009. 74 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal, 2009.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973.284p.

- PEIXOTO, B. M. **Classificação de sequências e análise de diversidade em metagenômica**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Computação) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- PELZER, G. Q. **Mecanismos de controle da murcha-de-esclerócio e promoção de crescimento em tomateiro mediados por rizobactérias**. 2010. 78p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal de Roraima, Boa Vista, 2010.
- PEREIRA, O. L.; DUTRA, D. C.; DIAS, L. A. S. *Lasiodiplodia theobromae* is the causal agent of a damaging root and collar rot disease on the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil. **Australasian Plant Disease**, p. 120-123, 2009.
- PEREIRA, P.; NESCI, A.; CASTILLO, C., ETCHEVERRY, M. Field studies on the relationship between *Fusarium verticillioides* and maize (*Zea mays* L.): effect of biocontrol agents on fungal infection and toxin content of grains at harvest. **International Journal of Agronomy**, v.7, 2011.
- PEREIRA, A. L.; SILVA, G. S.; RIBEIRO, V. Q. Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, p.572-578, 2006.
- PEREIRA, O. L.; DUTRA, D. C.; DIAS, L. A. S. *Lasiodiplodia theobromae* is the causal agent of a damaging root and collar rot disease on the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil. **Australasian Plant Dis Notes**, v. 4, p.120-123, 2009.
- PÉREZ-GARCÍA, A., ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v.22, p.187-193, 2011.
- PERNEZNY, K.; ELLIOTT, M.; PALMATEER, A.; HAVRANEK, N. Review Guidelines for Identification and Management of Plant Disease Problems: Part II. Diagnosing Plant Diseases Caused by Fungi, Bacteria and Viruses. University of Florida Extension Publication, p. 249, 2014. <<http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/ed/MG/MG44200.pdf>>. acesso /em 22 de Julho de 2019.
- PIMENTEL, Fernando. **O fim da era do petróleo e a mudança do paradigma energético mundial: perspectivas e desafios para a atuação diplomática brasileira**. Brasília. Fundação Alexandre de Gusmão, 2011.
- PONTES, M. H.; SZABO, A.; GRIFFITHS, M. D. The impact of Internet-based specific activities on the perceptions of Internet addiction, quality of life, and excessive usage: A cross-sectional study. **Addictive Behaviors Reports**. p. 19-25, 2015.
- PRASAD, M. P.; CHAUDHARY, M.; CHOUDHARY, M.; KUMAR, T. K.; JAT, L. K. Rhizosphere Microorganisms Towards Soil Sustainability and Nutrient Acquisition. **Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture**, p.31-49, 2017.
- PRASAD, M. P.; DAGAR, S. Identification and characterization of Endophytic bacteria from fruits like Avacado and Black grapes. **International Journal Microbiology and Applied Sciences**, v.3, p. 937-947, 2014.
- PRASAD, L.; PRADHAN, S.; DAS, L. M.; NAIK, S. N. Experimental assessment of toxic phorbol ester in oil, biodiesel and seed cake of *Jatropha curcas* and use of biodiesel in diesel engine. **Applied Energy**, v. 93, p. 245 -250, 2012. Special edition.
- PURCINO, A. A. C.; DRUMMOND, O. A. **Pinhão-Manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1986. 7p.

PURI, A.; PADDA, K. P.; CHANWAY, C. P. **Nitrogen-Fixation by Endophytic Bacteria in Agricultural Crops: Recent Advances**. In: (ed. AMANULLAH) Fixation in Agricultura- updates. IntechOpen, p. 73-94, 2017.

QAISRANI, M. M.; ZAHEER, A.; MIRZA, M. S.; NAQQASH, T.; QAISRANI, T. B.; HANIF, M. K.; RASOOL, M. A comparative study of bacterial diversity based on culturable and culture-independent techniques in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.). **Saudi Journal of Biological Sciences**, 13p., 2019.

QUECINE, M. C.; ARAÚJO, W. L.; ROSSETO, P. B.; FERREIRA, A.; TSUI, S.; LACAVA, P. T.; MONDIN, M.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Sugarcane Growth Promotion by the Endophytic Bacterium *Pantoea agglomerans* 33.1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.78, p. 7511- 7518, 2012.

QUECINE, M.C.; BATISTA, B. D.; LACAVA, P. T. Diversity and biotechnological potential of plant-associated endophytic bacteria. In: Kumar, P. Ananda.; Govil, J. N. **Biotechnology: Plant Biotechnology**, v.2, p. 377-424, 2014.

QUINTELA, E. D. Manejo integrado dos insetos e outros invertebrados pragas do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, v. 25, p. 113-136,2004.

RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD ALLAH, E. F. *Bacillus*: A Biological Tool for Crop Improvement through Bio-Molecular Changes in Adverse Environments. **Frontiers in physiology**, 8, 667, 2017.

RAMADIMETJA A. MASHIANE<sup>1,2</sup> · OBINNA T. EZEOKOLI<sup>1,2</sup> · RASHEED A. ADELEKE<sup>1,2</sup> · CORNELIUS C. BEZUIDENHOUT. Metagenomic analyses of bacterial endophytes associated with the phyllosphere of a Bt maize cultivar and its isogenic parental line from South Africa. **World Journal Microbiology Biotechnology** , v. 80, 12p, 2017.

RAMOS, M. R.; FAVARETTO, N.; UHLMANN, A.; DIECKOW, J.; VEZZAN, F.; ALMEIDA, L. Vegetable production under the organic system: effects on soil physical attributes. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, p. 45-51, 2015.

RASCOVAN, N.; CARBONETTO, B.; PERRIG, D.; DÍAZ, M.; CANCIANI, W.; ABALO, M.; VAZQUEZ, M. P. (2016). Integrated analysis of root microbiomes of soybean and wheat from agricultural fields. **Scientific Reports**, v.6(1).

REGINATTO, T. S. C. **Diversidade de bactérias associadas a bromélias do Parque Estadual de Itapuã/RS**. 2008. 70 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

REN21 (Renewable Energy Policy Network for the 21st Century) (2015), Renewables 2015 Global Status Report, REN21 Secretariat, Paris.

ROCHA, M. A. M. **Instruções técnicas para a cultura do pinhão manso**. Vitória, ES: Incaper. 2011. 28 p. (Incaper. Documentos, 196).

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

RONQUIM, C. C. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**: Embrapa Monitoramento por Satélite, Campinas-SP, 2010, 26p. (Boletim de Pesquisa e

Desenvolvimento).

ROSADO, A. W. C.; MACHADO, A. R.; FREIRE, F. C. O.; PEREIRA, O. L. Phylogeny, identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia* associated with postharvest stem-end rot of coconut in Brazil. **Plant Disease**, v.100, p.561-568, 2016.

ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madison, v.50, p. 2372-2382, 2010.

ROSCOE, R. **O que muda com a liberação do plantio do pinhão-manso no Brasil?** Catálogo da Indústria do Biodiesel, 2008.

SAITO, K.; CHEN, M.; BARD, F.; CHEN, S.; ZHOU, H.; WOODLEY, D.; POLISCHUK, R.; SCHEKMAN, R.; MALHOTRA, V. TANGO1 facilitates cargo loading at endoplasmic reticulum exit sites. **Cell**, v.36, p.891-902, 2009.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SARAVI, S. S. S.; SHOKRZADEH, M. Role of pesticides in human life in the modern age: a review. In: Stoytcheva M (ed.) **Pesticides in the modern world-risks and benefits**. InTech; p. 4-11, 2011.

SARRIA-GUZMÁN, Y.; GOVAERTS, B.; VERHULST, N.; DENDOOVEN, L.; LUNA-GUIDO, M. 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillage-drop residue management. *Soil and Tillage Research*, v. 159, p. 1 – 8, 2016.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA N.; GONÇALVES, N. P. Produção de oleaginosas para o biodiesel. **Informe Agropecuário**, v.26, p.44-74. 2005.

SCHMIDT, V. A. **Ocorrência de bactérias endofíticas na cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2012. 82 p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

SELVAKUMAR, G.; KUNDU, S.; GUPTA, A.D.; SHOUCHE, Y.S.; GUPTA, H.S. Isolation and characterization of nonrhizobial plant growth promoting bacteria from nodules of kudzu (*Pueraria thunbergiana*) and their effect on wheat seedling growth. **Current Microbiology**, v.56, p.134-139, 2008.

SHAHZAD, R.; KHAN, A. L.; BILAL, S.; ASAF, S.; LEE, I. Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: an example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in tomato. **PeerJ**, 21p. 2017.

SHANNON, C. E. A mathematical theory of communication, *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review*, v.5 n.1, January 2001 [doi>10.1145/584091.584093]

SHIOMI, H.F.; MELO, I.S.; MINHONI, M.T.A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagonista a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, Curitiba, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008.

SHODA, M. Review: Bacterial Control of Plant Diseases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, p. 515-521, 2000.



SIERRA, G.A. A simple method for the detection of lypolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substracts. **Antonine van Leeuwenhoeck**, Dordrecht, v. 28, p. 15-22, 1957.

SILPA, D.; RAO, P. B.; KUMAR, G. K.; RAM, M. R. Screening of Amylase Producing *Bacillus* sp. Isolated from Banana Rhizosphere. **International Journal of Pharmacy e Pharmaceutical Research**, v.11, p.133-142, 2018.

SILVA; L. A. B.; OLIVEIRA, C. D.; COELHO, G. R.; ISHIKAWA, F. H.; CAPUCHO, A. S. PATOGENICIDADE DE ESPÉCIES DE *Lasiodiplodia* EM FRUTOS DE ACEROLEIRA, MANGUEIRA E VIDEIRA. **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia**, Maceió –AL, 2018.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de micro-organismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, p. 1495-1508, 2001.

SILVA, M. C. S. **Bioprospecção e caracterização de micro-organismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.)**. 2015. 78p. Dissertação Mestrado em Ciências (Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SILVA, C. A. V.; SILVA, F. E.; TABOSA, N. J. Comportamento de genótipos de arroz de terras altas na Zona da Mata de Pernambuco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.10, p.1030-1037, 2010.

SILVA, M. C. S. **Bioprospecção e caracterização de micro-organismos endofíticos de isolados de sementes de guaranazeiro e o controle da antracnose (*Colletotrichum* spp.)**. 2015. 78p. Dissertação Mestrado em Ciências (Biologia na Agricultura e no Ambiente) - Centro de energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

SILVA, J. A.; MATOS, D. L.; DAVID, G. Q.; RAMALHO, A. B.; PERES, W. M. BIOCOTROLE *IN VITRO* DE *Lasiodiplodia theobromae* POR ISOLADOS DE *Trichoderma* spp. **Cáceres**, v. 2, p.444-449, 2015.

SILVA, J. B. T; MELLO, S. C. M. Utilização de *Trichoderma* no controle de fungos fitopatogênicos: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2007. 17 p.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Revista brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 24, p. 311-319. 2000.

SILVA FILHO, S. N. G.; NARLOCH, C.; SCHARF, F. Solubilização de fosfatos naturais por micro-organismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 847-854, 2002.

SILVEIRA, E. L. **Inoculações de bactérias promotoras de crescimento no cultivo de arroz em solução nutritiva**. 2008. 83p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, fev. 2008.

SOBRAL, J.K.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; LACAVA, P.T. Aspectos gerais de micro-organismos endofíticos. In: ARAÚJO, W.L.; QUECINE, M.C.; LACAVA, P.T.; AGUILAR-VILDOSO, C.I.; MARCON, J.; LIMA, A.O.S.; SOBRAL, J.K.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A.;

AZEVEDO, J.L. (Ed.). **Micro-organismos endofíticos: aspectos teóricos e práticos de isolamento e caracterização**. Santarém: UFOPA, 2014. p. 11-27.

SOUCHIE, E. L.; CAMPELLO, E. F. C.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. Mudanças de espécies arbóreas inoculadas com bactérias solubilizadoras de fosfato e fungos micorrízicos arbusculares. **Floresta**, Curitiba, v. 35, n. 2, p. 329-334, 2005.

SOUZA; CRUZ, J. C.; SOUSA, N. R.; PROCÓPIO, A. R. L.; SILVA, G. F. Endophytic bacteria from banana cultivars and their antifungal activity. **Genetics and Molecular Research**, v.13, p.8661-8670, 2014.

SOUZA, J. L.; FAVARATO, L. F. Desenvolvimento de hortaliças e atributos do solo com adubação verde e compostos orgânicos sob níveis de N. **Horticultura Brasileira**, Brasília, p. 19-26, 2015.

SOUSA, M. T. B. Análise da utilização do biodiesel como alternativa para o desenvolvimento sustentável. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DA REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 1., 2006, Natal. **Anais**. Natal:Editora, 2006.

STAUBMANN, R.; FOIDL, G.; FOIDL, N. Biogas production from *Jatropha curcas* press-cake. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.63, p.457-467, 1997.

SUN, P., CUI, J., JIA, X., & WANG, W. Isolation and Characterization of *Bacillus Amyloliquefaciens* L-1 for Biocontrol of Pear Ring Rot. **Horticultural Plant Journal**, v. 3, p.183-189, 2017.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; IKEDA, A. C.; HUNGRIA, M.; ADAMOSKI, D.; KAVACORDEIRO, V.; GLIENKE, C.; GALLI-TERASAWA, L. V. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express**. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**, 4.ed Porto Alegre: Artmed, 2009. 848p.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TANG, M.; GONG, M.; XU, C.; WU, S.; LIU, F. Identification and crude protein extract of endophytic bacteria strain KLXD06 antagonistic against MRSA isolated from *Hemsleya sinensis*. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p.1089-1092, 2014.

TAVARES, S. C. C. H. **Principais doenças e alternativas de controle**. In: EMBRAPA. Informações técnicas sobre a cultura da manga no Semiárido brasileiro. Brasília, 1995. p. 123-156.

TEATHER, R. M.; WOOD, P.J. Use of Congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 43, p. 777-780, 1982.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. **Revista Informe Agropecuário**, v.26, p.18-27, 2005.

TEIXEIRA, M. A.; MELO, I. S.; VIEIRA, R. F.; COSTA, F. E. C.; HARAKAVA, R. Micro-organismos endofíticos de mandioca de áreas comerciais e etnovarietades em três estados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, p. 43-49, 2007.

TEKINER, S.; KOTAN, R.; TOZLU, E.; DADAŞOĞLU, F. Determination of Some Biological Control Agents Against *Alternaria* Fruit Rot in Quince. **Alinteri Journal of Agriculture Sciences**, v.34, p.25-31, 2019.

THOMAS, O. O. **Fitoterapia**, v. 60, p.146-155, 1989.

THOMAS, R.; SAH, N.; SHARMA, P. Therapeutic Biology of *Jatropha curcas*: A Mini Review. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.9, p. 315-324, 2008.

THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, 2012.

THYS R. C. S.; GUZZON S. O.; OLIVERA F. C.; BRANDELLI A. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 67-73, 2006.

TIZNADO, M. L. A. M.; ESQUIVEL, G. L.; CAMPOS, O. J. C.; GUERRERO, L. G. R.; VELASCO, C. R. *Lasiodiplodia theobromae* agente causal de la pudrición blanda de frutos de *Artocarpus heterophyllus* Lam. en Nayarit, México. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 40, (e-018), 2018.

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TSANAKTSIDIS, C. G.; SPINTHIROPOULOS, K. G.; GULIYEV, F.; DIMITRIOU, D.; EUTHALTSIDOU, K.; TZILANTONIS, G. T. Relation between quality and production cost for pure biodiesel bases on the mixes of raw materials. In: International Conference on New Energy and Future Energy System (NEFES 2016), IOP Conf. Series: **Earth and Environmental Science**, v.40, 2016.

ULLAH, A., AKBAR, A., LUO, Q., KHAN, A. H., MANGHWAR, H., SHABAN, M., & YANG, X. Microbiome Diversity in Cotton Rhizosphere Under Normal and Drought Conditions. **Microbial Ecology**, 2018.

UNGARO, M.R.G.; REGINATO NETO, A. Métodos de propagação e germinação de sementes de *Jatropha curcas* L. In: 4º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. **Anais**. Varginha, p. 720-724, 2007.

UZAIR, B.; KAUSAR, R.; BANO S, A.; FATIMA, S.; BADSHAH.; HABIBA, U.; FASIM, F. Isolation and Molecular Characterization of a Model Antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* Divulging *In Vitro* Plant Growth Promoting Characteristics. **BioMed Research International**, v.2018(2), 7.p, 2018.

VALARINI, P. J.; OLIVEIRA, F. R.; SCHILICKMANN, S. de F.; POPPI, R. J. Qualidade do solo em sistemas de produção de hortaliças orgânico e convencional. **Horticultura Brasileira**, Brasília, p. 485–491, 2011.

VAL-MORAES, S. P.; MARCONDES, J.; ALVES, L. M. C.; LEMOS, E. G. M. Impact of sewage sludge on the soil bacterial communities by DNA microarray analysis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, p. 1997-2003, 2011.

VALVERDE J. R.; GULLOÓN S, PEÂREZ MELLADO R. Looking for Rhizobacterial Ecological Indicators in Agricultural Soils Using 16S rRNA metagenomic Amplicon Data. **PLoS ONE**, v.11(10): e0165204, 2016.

- VEGA, N. O. W. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. **Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín**, v.60, p. 3621-3643, 2007.
- VENUGOPAL, M.; SARAMMA, A. V. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from a mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. **Process Biochemistry**. v.41, p. 1239-1243, 2006.
- VERMA, S.C.; LADHA, J.K.; TRIPATHI, A.K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep-water rice. **Journal of Biotechnology**, v.91, p. 127-141, 2001.
- VURUKONDA, S. S. K. P.; GIOVANARDI, D.; STEFANI, E. Plant Growth Promoting and Biocontrol Activity of *Streptomyces* spp. as Endophytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, 952, 2018.
- WANI, P. A.; KHAN, M. S. *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p. 3262-3267, 2010.
- WANG, K.; YAN, P.; CAO, L.; DING, Q.; SHAO, C.; ZHAO, T. Potential of Chitinolytic *Serratia marcescens* Strain JPP1 for Biological Control of *Aspergillus parasiticus* and Aflatoxin. **BioMed Research International**, 7 p., 2013
- WANG, Z.; XU, G.; MA, P.; LIN, Y.; YANG, X.; CAO, C. Isolation and Characterization of a Phosphorus-Solubilizing Bacterium from Rhizosphere Soils and Its Colonization of Chinese Cabbage (*Brassica campestris ssp. chinensis*). **Frontiers in microbiology**, v.8 , 1270, 2017.
- VIJAYALAKSHMI, R.; KAIRUNNISA, K.; NARENDER SIVVASWAMY, S.; DHARAN, S. S.; NATARAJAN, S. Enzyme Production and Antimicrobial Activity of Endophytic Bacteria Isolated from Medicinal Plants. **Indian Journal of Science and Technology**, v.9, 2016.
- WARD, L. M.; HEMP, J.; SHIH, P. M.; MCGLYNN, S. E.; FISCHER, W. W. Evolution of Phototrophy in the Chloroflexi Phylum Driven by Horizontal Gene Transfer. **Frontiers in Microbiology**, 9, 2018.
- WOESE, C. R. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, p.221-271, 1987.
- WOOD, D. E.; SALZBERG, S. L. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, v. 15, 2014.
- XIE, C.H.; YOKOTA, A. *Pleomorphomonas oryzae* gen. nov., sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from paddy soil of *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.1233-1237, 2005.
- XU, D., XIA, X., XU, N.; NA, L. Isolation and identification of a novel endophytic bacterial strain with antifungal activity from wild blueberry *Vaccinium uliginosum*. **Annals of Microbiology**, v.57, p.673-676, 2007.
- ZAMBUDIO, S.; FERREIRA, A. L. Fixação Biológica de Nitrogênio. **XXI Ciência para a Vida**, n. 1, p. 10-15, 2012.

