

Bactérias endofíticas associadas a *Paspalum vaginatum* Swartz com potencial para promoção de crescimento vegetal e biocontrole

Endophytic bacteria associated with *Paspalum vaginatum* Swartz with potential for plant growth promotion and biocontrol

DOI: 10.34188/bjaerv6n2-010

Recebimento dos originais: 05/01/2023

Aceitação para publicação: 31/03/2023

Ana Carolina Vasconcelos Fernandes

Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos
Instituição: Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos
Endereço: Via Washington Luís, km 235, CEP.13565-905. São Carlos-SP
E-mail: vasconceloscarol97@gmail.com

Paulo Henrique Gomes Lisboa

Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de São Carlos
Instituição: Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos
Endereço: Via Washington Luís, km 235, CEP.13565-905. São Carlos-SP
E-mail: paulolisboa@estudante.ufscar.br

Paulo Henrique Marques de Andrade

Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular pela Universidade Federal de São Carlos
Instituição: Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos
Endereço: Via Washington Luís, km 235, CEP.13565-905. São Carlos-SP
E-mail: pandrad012@gmail.com

Bianca Baccili Zanotto Vigna

Doutor em Genética e Biologia Molecular pela Universidade Estadual de Campinas
Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Endereço: Via Washington Luiz, km 234, CEP.13560-970. São Carlos-SP - Caixa-postal: 339
E-mail: bianca.vigna@embrapa.br

Sônia Regina Nogueira

Doutor em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa
Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Endereço: Via Washington Luiz, km 234, CEP.13560-970. São Carlos-SP - Caixa-postal: 339
E-mail: sonia.nogueira@embrapa.br

Alessandra Pereira Fávero

Doutor em Agronomia Genética e Melhoramento de Plantas pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo
Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pecuária Sudeste
Endereço: Via Washington Luiz, km 234, CEP.13560-970. São Carlos-SP - Caixa-postal: 339
E-mail: alessandra.favero@embrapa.br

Paulo Teixeira Lacava

Doutor em Ciências pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura,
Universidade de São Paulo
Instituição: Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos
Endereço: Via Washington Luís, km 235, CEP.13565-905. São Carlos-SP
E-mail: ptlacava@ufscar.br

RESUMO

Espécies de *Paspalum* são importantes constituintes nas pastagens nativas de regiões tropicais e subtropicais das Américas. *Paspalum vaginatum* é nativo de áreas litorâneas no Brasil e é amplamente utilizado em campos de golfe nos Estados Unidos devido sua robustez e tolerância a estresses abióticos como a seca, encharcamento e salinidade. Bactérias localizadas no interior dessa espécie vegetal (endofíticas) podem ser parcialmente responsáveis pela tolerância a essas condições extremas. O uso de bactérias capazes de promover o crescimento vegetal como inoculantes é uma estratégia ecologicamente correta para substituir os fertilizantes químicos e melhorar a produção vegetal. Este estudo objetivou isolar e avaliar o potencial de solubilização de fosfato inorgânico (SFI), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido 3-indolacético (AIA) e potencial antagonístico contra fitopatógenos de bactérias endofíticas associadas a *P. vaginatum*. As bactérias foram isoladas de raízes e folhas de *P. vaginatum* e testadas *in vitro* para FBN, SFI, produção de AIA e antagonismo contra o fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp.. Entre os 72 isolados bacterianos testados, 43 fixaram nitrogênio (59,7%), 28 solubilizam fosfato inorgânico (38,9%), 70 produziram AIA (97,2%), mesmo que em baixa quantidade, e 12 apresentaram potencial antagonístico contra *Bipolaris* sp. (16,7%). As 24 bactérias com melhores resultados nos testes foram identificadas por sequenciamento do gene 16S rDNA. Os gêneros identificados foram *Bacillus* sp., *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp., *Agrobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Staphylococcus* sp. e *Streptomyces* sp..

Palavras-chave: Bactérias endofíticas, Promoção de crescimento vegetal, Fixação biológica de nitrogênio, Solubilização de fosfato inorgânico, Ácido 3-indolacético, Controle biológico, *Paspalum*.

ABSTRACT

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

Pesquisas têm sido desenvolvidas em diversos tipos de culturas para identificar potenciais bactérias promotoras de crescimento vegetal, sua influência no desenvolvimento das plantas e possível uso comercial, como em milho (BATISTELA et al., 2018; AQUINO et al., 2019), cana de açúcar (ANTUNES et al., 2022; SIMÕES et al., 2019), arroz (VERMA et al., 2017; PARRALES et al., 2022) e soja (ZHAO et al., 2018).

Espécies de *Paspalum* são importantes constituintes nas pastagens Brasileiras (AGUIAR, 2014), com o aumento da demanda por alimentos a eficiência da produção de forragem é um fator significativo no desempenho dessa demanda que hoje é dependente do uso de fertilizantes químicos e agrotóxicos (OLIVEIRA, 2016). O *Paspalum vaginatum* Swartz é nativo de áreas litorâneas no Brasil e é amplamente utilizado em campos de golfe nos Estados Unidos devido sua robustez e tolerância a estresses abióticos como a seca, encharcamento e salinidade (LONARD et al., 2015). Além disto, bactérias localizadas no interior dos tecidos dessa espécie (endofíticas) podem ser parcialmente responsáveis pela tolerância a essas condições de estresse (VANDENKOORNHUYSE et al., 2015). Diante do exposto, bactérias endofíticas associadas a *Paspalum vaginatum* Swartz com potencial para promoção do crescimento vegetal via solubilização de fosfato inorgânico, fixação biológica de nitrogênio, produção de ácido 3-indolacético e ação antagonista a fitopatógenos podem aumentar a produtividade de culturas desse gênero, bem como auxiliar na diminuição do uso de insumos sintéticos, contribuindo para o aumento de alternativas sustentáveis de práticas agrícolas.

O presente estudo teve como objetivos: a) isolar e caracterizar bactérias endofíticas (raiz e folha) de *Paspalum vaginatum* quanto à capacidade de promoção de crescimento vegetal (fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de ácido 3-indolacético) e antagonismo ao fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp..

Dentro desse contexto, o presente estudo visou contribuir com o avanço do conhecimento em bactérias benéficas promotoras de crescimento vegetal e biocontrole como uma alternativa ao uso de insumo minerais; em especial na cultura do *Paspalum*; buscando uma produção agrícola mais sustentável.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de raiz e folha de 10 indivíduos de *Paspalum vaginatum* (BGP 114) foram coletadas de forma aleatória no Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Paspalum* localizado na Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos, São Paulo, Brasil (21.9887° S, 47.8787° O). As amostras foram armazenadas em sacos plásticos para o transporte imediato até o Laboratório de Microbiologia e Biomoléculas – LaMiB, Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Paulo.

O isolamento das bactérias endofíticas foi realizado de acordo com Araújo et al. (2014) com modificações. As amostras de folha e raiz foram submetidas à desinfecção superficial, que consiste na imersão sucessiva das amostras em álcool 70% (2 minutos), seguido de hipoclorito de sódio 3% (3 minutos), álcool 70% (1 minuto), água destilada esterilizada (20 segundos). Para facilitar a apresentação dos dados, as linhagens obtidas receberam códigos. A quantificação das bactérias cultiváveis isoladas foi realizada por contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) e cálculo da frequência de isolamento (FI) de acordo com Araújo et al. (2014).

O potencial dos isolados em realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi avaliada qualitativamente *in vitro*. Utilizou-se tubos de ensaio contendo 5 mL de meio semissólido NFb (ácido málico, 5g.L-1; K₂HPO₄, 0,5g.L-1; MgSO₄.7H₂O, 0,2g.L-1; NaCl, 0,1g.L-1; CaCl₂.2H₂O, 0,02g.L-1; KOH, 4,5g.L-1; solução de micronutrientes, 2mL; solução de azul de bromotimol (0,5% em 0,2 KOH), 2mL; solução de FeEDTA (solução 1,64%), 4mL; e solução vitaminas, 1mL; pH 6,8), livre de nitrogênio, no qual as bactérias foram inoculadas, em triplicata, e incubadas a 28 °C por 96 horas (DÖBEREINER et al., 1995; ARAÚJO et al., 2014). Em seguida, foi verificada a formação de película de crescimento próximo à superfície dos tubos (CATTELAN, 1999). O resultado positivo para a fixação de N₂ foi determinado pela formação de halo horizontal de crescimento próximo à superfície dos tubos.

Para a análise de solubilização de fosfato inorgânico, os isolados foram inoculados, em duplicata em meio de cultura sólido contendo fosfato inorgânico, o fosfato de cálcio bibásico (10 g.L⁻¹ de glicose; 5g.L⁻¹ de NH₄Cl; 1g.L⁻¹ de NaCl; 1g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O; 0,8 g.L⁻¹ de CaHP0₄; 15 g.L⁻¹ de ágar; pH 7,2). Em seguida, incubou-se a 28 °C por 120 horas (VERMA et al., 2001). A presença do halo incolor ao redor das colônias indicou a capacidade dos isolados em solubilizar fosfato inorgânico. Os diâmetros dos halos claros (Dh), bem como os diâmetro das colônias correspondentes (Dc), foram medidos para posterior cálculo do índice de solubilização de fosfato (ISF).

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

Para a quantificação da produção de ácido 3-indolacético (AIA), utilizou-se o método originalmente proposto por Bric et al. (1991) adaptado para o método quantitativo (HUSEN, 2016). As colônias foram inoculadas em meio TSB por 72 horas e, posteriormente, eluidas na mesma densidade óptica (D.O), sendo 550nm = 0,1. Foram inoculados, em triplicata, 100 µL dessa solução de cultura padronizada em 3 mL de meio de cultura TSB 10% suplementado com L-triptofano (5 mM), e incubadas no escuro a 28°C por 72 horas sob agitação a 180 rpm. Posteriormente, coletou-se 2mL da suspensão bacteriana e centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 g. 900µL do sobrenadante foi encubado, juntamente com 400µL do Reagente de *Salkowski* (2 mL de FeCl₃ (0,5 mol.L⁻¹) e 98 mL de HClO₄ (35%)), por 30 minutos a 28 °C em cubeta de 1,5 mL. Por fim, a leitura das absorbâncias das amostras foi realizada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. Como controle negativo utilizou-se o meio de cultura TSB 10% com L-1 triptofano (5mM) acrescido do Reagente de *Salkowski*. As leituras foram normalizadas por meio de curva padrão, calculada com base em doses conhecidas do hormônio sintetizado (Sigma), nas seguintes concentrações: 1, 5, 25, 50, 75 e 100µg.mL⁻¹. A coloração rosa-avermelhada das amostras indicou a produção de auxinas.

O potencial antagônico das culturas bacterianas isoladas de *Paspalum vaginatum* quanto ao fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp. foi analisado por meio de testes antagônicos. Primeiramente, foi realizada uma triagem, na qual os isolados bacterianos foram inoculados em placas de Petri contendo PDA (*Potato Dextrose Agar*) em quatro pontos equidistantes, em seguida discos (cortados de placas de Petri) de 0,5 cm de diâmetro contendo *Bipolaris* sp. previamente cultivado em meio PDA foram adicionados no centro de cada placa de Petri. As placas foram incubadas a 28 °C por 168 horas. Uma placa comportando apenas um disco com *Bipolaris* sp. no centro serviu como

controle do experimento. A segunda etapa dos testes antagônicos, foi realizada por meio do método de pareamento direto. Os isolados selecionados pela triagem anterior foram estriados, com auxílio de um de um palito descartável autoclavado, em uma das extremidades da placa. Em seguida, discos (cortados de placas de Petri) de 0,5 cm de diâmetro contendo *Bipolaris* sp. previamente cultivado em meio PDA foram adicionados à outra extremidade das placas (MARIANO, 1993). O procedimento foi realizado em triplicata. Para o cálculo da porcentagem de inibição, foi utilizada a metodologia de (QUIROGA; SAMPIETRO; VATTUONE, 2001).

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

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

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

sequências depositadas no banco GenBank do National Center for Biotechnology Information (NCBI) por meio da ferramenta BLASTn (MORGULIS, et al., 2008). As sequências consenso também foram submetidas ao banco de dados 16S-Based ID da plataforma EzBioCloud (YOON et al., 2017) para fins de comparação com o resultado obtido a partir do BLASTn, pois se trata de um banco específico de 16S.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o isolamento, a abundância bacteriana de folha e raiz foi estimada por meio da contagem de células viáveis expressas em Unidade Formadora de Colônia por grama de tecido vegetal (UFC.g⁻¹), perfazendo 0,051x10⁴ para folha e 1,9 x 10⁴ para raiz. A partir das bactérias isoladas, foram selecionadas e purificadas 33 de folha e 39 de raiz, totalizando 72 bactérias. Os dados encontrados no presente trabalho sugerem maior abundância bacteriana nas raízes quando comparado com as folhas, o que corrobora com os trabalhos de DE PAULA et al. (2022) que identificaram maior UFC e frequência de isolamento de bactérias associadas à raiz de diversas espécies de *Paspalum*, em relação à folha.

Foram selecionados 24 isolados bacterianos para identificação taxonômica por meio do sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal. Foram utilizados três parâmetros para escolha dos isolados a). Isolados que apresentaram ISF>2 e resultado positivo simultâneo para os testes de FBN, produção de AIA (isolados FO1T3, FO6T2, FO6T3, FO1I3, FO2I1, FO6I1, FO6I2, RA3T1', RA1I2); b) Seis isolados com maiores valores para produção de AIA (isolados FO1T3, FO8T1, FO8T2, FO2I1, FO8I1, FO9I2); c) Isolados que, na triagem, apresentaram potencial para ação antagonista ao fungo *Bipolaris* sp. (isolados FO1T2, FO6T2, FO1I1, RA1T5, RA4T2, RA7T1, RA1I1, RA5I2, RA7I1, RA10I1, RA10I3, RA10I5). A amplificação do fragmento de 752pb do gene 16S rDNA foi confirmada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5%. A maioria dos isolados foram identificados a nível de gênero. No entanto, foi possível identificar a espécie de pelo menos dois isolados, FO1I3 (*Pantoea ananatis*) e RA3T1' (*Pantoea eucrina*). Na Tabela 1 são apresentadas as linhagens bacterianas endofíticas e suas respectivas identificações.

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

Tabela 1. Identificação dos isolados bacterianos endofíticos associados a *Paspalum vaginatum*. Resultados referentes aos testes de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato inorgânico, produção de AIA e antagonismo ao fungo *Bipolaris* sp. para os isolados endofíticos associados a *Paspalum vaginatum*.

Tecido	Código do Isolado	Gênero bacteriano	FBN	ISF	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Triagem antagonismo
Folha	FO1T2	<i>Bacillus</i> sp.	+	1,58	1,45	+
Folha	FO1T3	<i>Pantoea</i> sp.	+	2,69	59,94	-
Folha	FO6T2	<i>Pantoea</i> sp.	+	3,01	21,25	+
Folha	FO6T3	<i>Enterobacter</i> sp.	+	3,13	25,07	-
Folha	FO8T1	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	-	59,66	-
Folha	FO8T2	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	-	59,09	-
Folha	FO1I1	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	3,32	+
Folha	FO1I3	<i>Pantoea</i> sp.	+	3,00	30,28	-
Folha	FO2I1	<i>Pantoea</i> sp.	+	3,02	62,25	-
Folha	FO6I1	<i>Enterobacter</i> sp.	+	4,00	22,73	-
Folha	FO6I2	<i>Enterobacter</i> sp.	+	4,46	19,86	-
Folha	FO8I1	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	-	79,23	-
Folha	FO9I2	<i>Agrobacterium</i> sp.	-	-	82,15	-
Raiz	RA1T5	<i>Pseudomonas</i> sp.*	+	-	4,95	+
Raiz	RA3T1'	<i>Pantoea</i> sp.	+	3,89	29,06	-
Raiz	RA4T2	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	3,12	+
Raiz	RA7T1	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	3,03	+
Raiz	RA1I1	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	6,19	+
Raiz	RA1I2	<i>Enterobacter</i> sp.	+	2,07	29,26	-
Raiz	RA5I2	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	4,36	+
Raiz	RA7I1	<i>Streptomyces</i> sp.	-	1,24	1,10	+
Raiz	RA10I1	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	4,41	+
Raiz	RA10I3	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	5,27	+
Raiz	RA10I5	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	5,70	+

("+" = positivo, "-" = negativo)

Dentre os doze isolados selecionados para sequenciamento devido sua ação antagonística, sete pertencem ao gênero *Bacillus*. Para analisar se há similaridade entre as sequências de DNA dos isolados do gênero *Bacillus*, foi realizado um alinhamento múltiplo das sequências pelo programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011) e identificou-se que os isolados FO1I1, RA7T1, RA5I2, RA10I1, RA10I3, RA10I5 têm 100% de similaridade e provavelmente pertence a mesma espécie, além de diferir consideravelmente do isolado FO1T2, que provavelmente pertence a uma segunda espécie.

Os 72 isolados foram avaliados quanto a capacidade de solubilização de fosfato (SF), fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de ácido 3-indolacético (AIA), e antagonismo a *Bipolaris* sp.. Destes, 43 fixaram nitrogênio (59,7%), 28 solubilizam fosfato inorgânico (38,9%), 70 produziram AIA (97,2%), mesmo que em baixa quantidade, e 12 apresentaram potencial antagonístico contra *Bipolaris* sp. (16,7%), conforme Tabela 1.

Ao comparar as bactérias endofíticas isoladas de *P. vaginatum* quanto aos testes de NFB, SFI e produção de AIA observamos que, entre os 72 isolados bacterianos, 24 bactérias apresentaram resultado positivo para ambos três testes e duas bactérias testaram negativo para ambos três testes. Além disso, 23 isolados produziram apenas AIA, quatro isolados produziram AIA e solubilizaram

fosfato inorgânico e 19 isolados produziram AIA e fixaram nitrogênio. Assim, nenhuma bactéria apenas solubilizou fosfato inorgânico ou apenas fixou nitrogênio. Dentre os 72 isolados bacterianos endofíticos de *Paspalum vaginatum*, 43 fixaram nitrogênio (59,7%). Destes, 20 isolados de folha (46,5%) e 23 de raiz (53,5%).

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

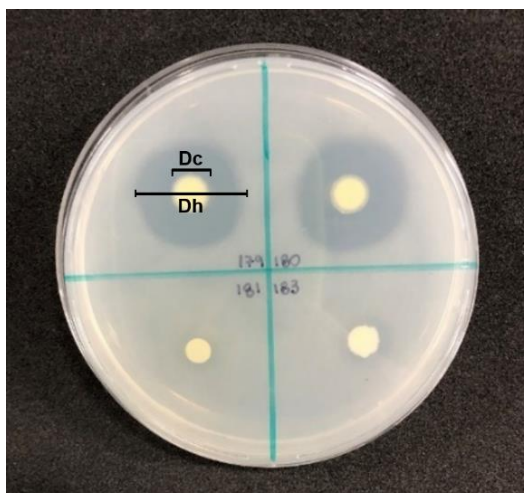
O plano nacional de fertilizantes 2050 destaca a fixação biológica de nitrogênio e a necessidade de expansão dessa tecnologia. Além disso, o plano coloca como meta aumentar a contribuição de FBN, principalmente em grandes culturas (como milho, soja e culturas forrageiras) em pelo menos 35% até 2030 e 50% até 2040 sobre a demanda de nitrogênio na agricultura brasileira, quando comparado com o ano de 2020 (BRASIL, 2021). Logo, os 43 isolados bacterianos que fixaram nitrogênio no presente trabalho demonstram potencial para uso comercial e contribuição nas metas para aumento de FBN em culturas forrageiras.

Dentre os 28 isolados bacterianos que solubilizaram fosfato inorgânico (38,9%) em meio contendo CaHPO_4 (fosfato de cálcio bibásico), indicado pela formação do halo em torno da colônia (Figura 1), 14 foram provenientes de folha (50%) e 14 de raiz (50%). A solubilização de fosfato pode ser classificada, a partir do índice de Solubilização de Fosfato (ISF), como baixa ($\text{ISF} < 2$), média ($2 < \text{ISF} < 3$) e alta ($\text{ISF} > 3$) (SILVA FILHO; VIDOR, 2000). Dessa forma, o ISF dos 28 isolados variou de 1,06 a 4,46, sendo que 7 bactérias apresentaram $\text{ISF} > 3$ e 3 apresentaram $2 < \text{ISF} < 3$.

O fósforo (P) é um dos principais nutrientes limitantes para o crescimento das plantas e, apesar de presente no solo, não é disponível para os vegetais significativamente, uma vez que estes absorvem o fósforo na forma de íons (GYANESHWAR et al., 2002; PAREDES-MENDOZA; ESPINOSA-VICTORIA; MANCERA, 2021). Bactérias endofíticas apresentam potencial para a formulação de inoculantes podendo solubilizar fosfato por diversos mecanismos e,

consequentemente, disponibilizar o P para as plantas, aumentar a eficiência da adubação fosfatada e minimizar o uso excessivo de fertilizantes fosfatados (AZEVEDO et al., 2018; LACAVA et al., 2021).

Figura 1. Placa de petri contendo fosfato de cálcio insolúvel, na qual foram inoculadas quatro bactérias. Os halos indicadores de solubilização (Dh) e do diâmetro da colônia (Dc) são representados na parte superior da placa e formados por isolado bacteriano positivo.



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

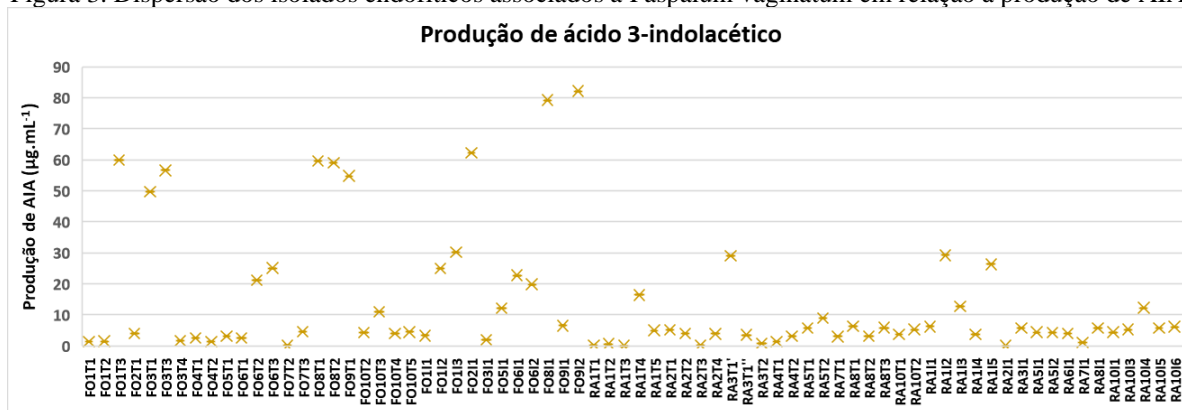
A solubilização do fosfato ocorre principalmente por meio da secreção de ácidos orgânicos. Eles são responsáveis por solubilizar fosfatos insolúveis em ortofosfato solúvel ($H_2PO_4^-$ ou HPO_4^{2-}). Para solubilização de fosfato, a bactéria deve estar próxima da fonte de fósforo (TAURIAN et al., 2010).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

Dentre as 70 bactérias endofíticas associadas a *Paspalum vaginatum* que produziram ácido 3-indolacético (AIA), a quantidade variou de 0,11 a 82,15 $\mu g \cdot mL^{-1}$. Essa auxina atua no estímulo

do desenvolvimento de pelos radiculares e raízes laterais devido sua ação na expansão e no alongamento celular (DAVIES, 2004). No entanto, altos níveis de AIA podem causar efeitos nocivos, como a inibição do crescimento das raízes primárias (DUCA et al., 2020). Portanto, para uso como inoculante, é fundamental conhecer o nível ótimo de AIA na planta alvo para seleção apropriada da bactéria. O AIA, na presença de FeCl_3 , converte-se para a cor rosa, este comportamento é utilizado na determinação do AIA. Dessa forma, diferentes ácidos minerais como ácido clorídrico, ácido perclórico, ácido fosfórico, ácido nítrico e ácido sulfúrico podem ser combinados com FeCl_3 para desenvolver a coloração rosa. No entanto, a combinação de FeCl_3 com reagente HClO_4 (ácido perclórico), formando o reagente de *Salkowski* é o mais sensível e apresenta menor interferência por outros compostos (PATEL et al., 2012). A produção de AIA por bactérias endofíticas e epifíticas consiste em um dos principais mecanismos associados à promoção de crescimento vegetal, com prevalência dos gêneros *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Xanthomonas* (TSAVKELOVA et al., 2006). O isolado FO9I2 se destacou pela maior síntese de AIA, apresentando quantidades de $82,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, seguido dos isolados, FO8I1, FO2I1, FO1T3, FO8T1, FO8T2, que produziram respectivamente, $79,23 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $62,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $59,94 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $59,66 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $59,09 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Dentre eles, duas pertencem ao gênero *Pantoea* e quatro ao gênero *Agrobacterium*. Em artigo publicado por De Paula et al. (2022), 43 bactérias isoladas *Paspalum atratum* (37% do total) produziram AIA, apresentaram resultado positivo para FBN e $\text{ISF} > 2$ e, destes 43, a produção de AIA variou entre 12.85 a $431.41 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, o maior produtor de AIA no estudo pertence ao gênero *Pantoea*.

Li et al. (2008) reportaram o isolamento de bactérias endofíticas de soja e descrevem linhagens de *Pantoea* sp. e *Burkholderia* sp. como grandes produtoras de AIA. Já Egamberdieva et al. (2021) relataram cepas de *Agrobacterium* sp., *Pseudomonas* sp. e *Bacillus* sp. como excelentes produtores de AIA em isolados bacterianos endofíticos de espinafre. Em estudo realizado por Wang et al. (2016), a síntese de AIA por bactérias endofíticas de *Kobresia capillifolia* variou de 3.31 a $146.93 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que a maioria dos isolados apresentaram baixa produção de AIA, como também observado no presente trabalho (Figura 2). No estudo realizado por Machado (2015) com bactérias endofíticas associadas a pinhão-mansão, a produção de AIA variou entre $0,14 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $84,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Tais trabalhos corroboram com os resultados encontrados no presente estudo.

Figura 3. Dispersão dos isolados endofíticos associados a *Paspalum vaginatum* em relação à produção de AIA.



Os doze isolados que apresentaram potencial antagonista ao fungo *Bipolaris* sp. na triagem inicial foram identificados como pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Streptomyces*. A partir desses doze isolados, foi realizado pareamento direto entre o fungo e cada isolado. Nesse critério, os isolados RA4T2 e RA10I3, pertencentes aos gêneros *Staphylococcus* e *Bacillus*, respectivamente, exibiram resultado negativo para atividade antagonista. Possivelmente, houve uma interferência no resultado da triagem para os isolados RA4T2 e RA10I3, por outros isolados presentes concomitantemente nas placas. Os fungos compõem o maior e o mais diversos grupos de microrganismos fitopatogênicos, eles são responsáveis por uma perda substancial na qualidade e quantidade da produção agrícola em todo o mundo. Dessa forma, no Brasil, o modelo da agricultura convencional que visa o retorno econômico imediato trata de tais problemas quase que exclusivamente pela aplicação continuada e em larga escala de agrotóxicos (MORANDI et al., 2009; SAVARY et al. 2019). Entretanto, o uso desses agroquímicos pode trazer diversas consequências ambientais e para a saúde humana (RANI et al., 2021). Assim, surgem alternativas de manejo para o uso de agroquímicos, como o controle biológico de doenças de plantas, que pode ser definido como o controle de um microrganismo por meio de outro microrganismo (MORANDI et al., 2009). No presente estudo, a porcentagem de inibição (%i) calculada a partir do experimento de pareamento direto entre as bactérias endofíticas isoladas de *Paspalum vaginatum* e o fungo fitopatogênico *Bipolaris* sp. (Figura 3) variou de 12 a 77%, sendo que isolado FO1T2 (*Bacillus* sp.) exibiu a maior porcentagem de inibição (Tabela 2).

Da Silveira et al. (2019), reportam que sete isolados bacterianos endofíticos associados a cana de açúcar apresentaram ação antagonista contra *Bipolaris sacchari*, sendo três pertencentes ao gênero *Pantoea* e um ao gênero *Pseudomonas*. Ao estudar a bactéria endofítica pertencente ao gênero *Bacillus subtilis* isolado de *Eucommia ulmoides*, uma planta com propriedades medicinais, Ding et al. (2017) relatou inibição de 61,7% contra o fitopatógeno *Bipolaris maydis*. Já Villa-Rodriguez et al. (2019), ao estudar 195 bactérias endofíticas associadas ao trigo, relatou 14 endófitos

bacterianos com atividade antagonista contra o fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana*, sendo oito cepas pertencentes ao gênero *Bacillus*, duas pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e uma pertencente ao gênero *Stenotrophomonas*. Em trabalho realizado por Assari et al. (2016) com isolados bacterianos endofíticos da raiz de *Schima wallichii*, uma planta comumente usada pelas tribos locais, na Índia, para curar as feridas causadas por insetos como aranha e escorpião, sete isolados pertencentes ao gênero *Streptomyces* apresentaram atividade de inibição significativa contra a maioria dos fitopatógenos selecionados. Tais trabalhos corroboram com os resultados encontrados no presente estudo. O gênero *Pseudomonas* é conhecido por sua versatilidade metabólica e plasticidade genética, englobando tanto patógenos quanto antagonistas (ZENGERER, et al., 2018). Devido à sua capacidade de formar esporos, os gêneros *Bacillus* e *Streptomyces*, possuem vantagem em relação aos outros gêneros. Essas estruturas são tolerantes condições inóspitas, como calor, frio, variação de pH, agroquímicos, fertilizantes e tempo de estocagem, o que facilita o uso desses gêneros de microrganismos na formulação de produtos mais estáveis e viáveis, além da sua aplicação no tratamento de folhas na forma de sprays (REHCIGL, 2018; BARRATT et al., 2018).

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

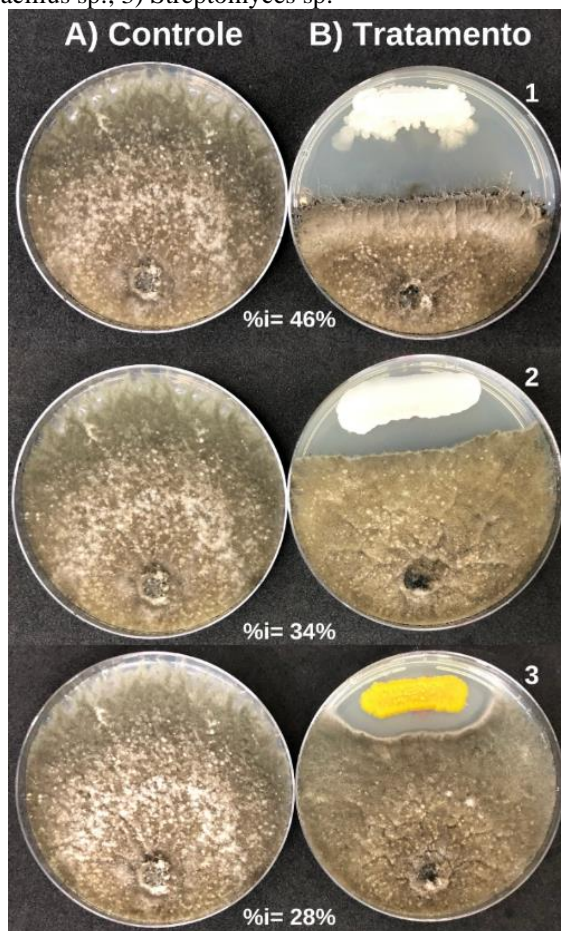


Tabela 2. Porcentagem de inibição dos isolados bacterianos endofíticos de *P. vaginatum* referente ao fitopatógeno *Bipolaris* sp.

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

4 CONCLUSÕES

Raízes de *Paspalum vaginatum* apresentaram uma maior frequência de isolamento bacteriano endofítico quando comparado com as folhas. Dentre os 72 isolados endofíticos avaliados para fatores de promoção de crescimento vegetal *in vitro*, 43 fixaram nitrogênio atmosférico (59,7%), 28 solubilizam fosfato inorgânico (38,9%), 70 produziram AIA (97,2%) e 10 apresentaram atividade antagônica a *Bipolaris* sp. (13,9%). Nove isolados bacterianos endofíticos foram capazes de solubilizar fosfato, fixar nitrogênio e produzir AIA simultaneamente. De acordo com o sequenciamento do gene 16S rDNA, os isolados endofíticos selecionados pertencem aos gêneros *Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp., *Pseudomonas* sp. (ou *Stenotrophomonas* sp.), *Staphylococcus* sp. e *Streptomyces* sp..

AGRADECIMENTOS

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo suporte financeiro (Proc. n. 2020/11315-6).

REFERÊNCIAS

AFZAL, I., et al. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. *Microbiological research*, v. 221, p. 36–49, 2019.

AGUIAR, A. R. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas em *Paspalum notatum* Flüge. 2014. Dissertação (Mestrado em Agrobiologia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

ANDRADE, P. H. M. Análise da diversidade genética e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana associada a *Coffea arábica* L. de cultivo convencional e orgânico. Tese (Doutorado em Genética Evolutiva e Biologia Molecular) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2019.

ANTUNES, J. E. L., et al. Isolation and Characterization of Plant Growth-Promotion Diazotrophic Endophytic Bacteria Associated to Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Grown in Paraíba, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 65, 2022.

AQUINO, J. P. A. DE, et al. Plant growth-promoting endophytic bacteria on maize and sorghum1. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, v. 49, 2019.

ARAÚJO, W. L. et al. Micro-organismos Endofíticos: Aspectos Teóricos e Práticos de Isolamento e Caracterização. 1. ed. Santarém: Universidade Federal do Oeste do Pará. 2014.

ASSARI, A. K. et al. Distribution and identification of endophytic species from as potential biocontrol agents against fungal plant pathogens. *Polish Journal of Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 319-329, 2016.

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

BARRATT, B. I. P., et al. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. *BioControl*, v. 63, n. 1, p. 155–167, 2018.

BATISTELA, J. C.; KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; ANDREANI JUNIOR, R. Influência da inoculação com bactérias endofíticas no desenvolvimento de plantas de milho. *Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais*, v. 9, n. 2, p. 11–18, 2018.

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*, 17:399-406, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância em Saúde Ambiental e Saúde do Trabalhador. Agrotóxicos na Ótica do Sistema Único de Saúde: relatório nacional de vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos. Brasília: MS, 2016. Disponível em: https://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_nacional_vigilancia_populacoes_expostas_a_grotoxicos.pdf. Acesso em 04 jul. 2022.

BRASIL. Secretaria especial de assuntos estratégicos. Plano nacional de fertilizantes 2050: Uma estratégia para os Fertilizantes no Brasil. Brasília, 2021. Disponível em:<

<https://static.poder360.com.br/2022/03/plano-nacional-de-fertilizantes-brasil-2050.pdf>>. Acesso em 04 jul. 2022.

BRIC, J. M.; BOSTOCK, R. M.; SILVERSTONE, S. E. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 2, p. 535-538, 1991.

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

CHAKRAVORTY, S.; HELB, D.; BURDAY, M.; CONNELL, N.; ALLAND, D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*. v. 69, n. 2, p. 330-9, 2007.

Chen, Y. et al. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. *Applied Soil Ecology*, v. 84, p. 235–244, 2014.

DA SILVEIRA, A.P.D., et al. Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. *Antonie van Leeuwenhoek* 112, 283–295, 2019.

DAVIES, P. J. *Plant hormones: Biosynthesis, signal transduction, action!* 3. ed. Dordrecht, Boston: Kluwer Academic, 2004. xii, CP16, 750 p. ISBN 1402026854.

DE PAULA, A. F. de, et al. Endophytic and rhizospheric bacteria associated with *Paspalum atratum* and its potential for plant growth promotion with different phosphate sources. *Frontiers in plant science*, v. 13, p. 884716, 2022.

DING, T., et al. An endophytic bacterial strain isolated from *Eucommia ulmoides* inhibits southern corn leaf blight. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, p. 903, 2017.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDINI, J. I. *Como Isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas*. Brasília: Embrapa-SPI/Itaguai, 1995.

DUCA, D. R.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid biosynthesis and its regulation in plant-associated bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 104, n. 20, p. 8607–8619, 2020.

Egamberdieva, D. et al. Diversity and Plant Growth-Promoting Ability of Endophytic, Halotolerant Bacteria Associated with *Tetragonia tetragonioides* (Pall.) Kuntze. *Plants (Basel, Switzerland)*, v. 11, n. 1, 2021.

FAO. *The future of food and agriculture – Alternative pathways to 2050 global perspectives studies* Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food and Agriculture Organization, 2018.

GYANESHWAR, P., et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, v. 245, n. 1, p. 83–93, 2002.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98. 1999.

HUSEN, E. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. Indonesian Journal of Agricultural Science, v. 4, n. 1, p. 27-31, 2016.

KIM, K. Y. et al. Organic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium* 60-2G. Korean Journal of Soil Science and Fertilizer, v. 35, n. 1, p. 59-67, 2002.

LACAVA, P.T. et al. Phosphate Solubilization by Endophytes from the Tropical Plants. In: Maheshwari D.K.; Dheeman S.. (Org.). Sustainable Development and Biodiversity. 26ed. Springer Nature Switzerland AG: Springer International Publishing, v. 3, p. 207-226, 2021.

LARSSON, A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics*30(22): 3276-3278. 2014.

LEITE, M. C. de B. S., et al. Bioprospection and genetic diversity of endophytic bacteria associated with cassava plant. *Revista Caatinga*, v. 31, n. 2, p. 315–325, 2018.

LI, J. H., et al. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 40, n. 1, p. 238–246, 2008.

LIU, T., et al. Genetic diversity and promotion plant growth of culturable endophytic diazotrophs associated with seashore *Paspalum* cultivars. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, v. 49, n. 2-3, p. 243-257, 2021.

LOIRET, F. G., et al. A putative new endophytic nitrogen-fixing bacterium *Pantoea* sp. from sugarcane. *Journal of applied microbiology*, v. 97, n. 3, p. 504–511, 2004.

LONARD, R. I.; JUDD, F. W.; STALTER, R. Biological Flora of Coastal Dunes and Wetlands: *Paspalum vaginatum* Sw. *Journal of Coastal Research*, v. 31, n. 1, p. 213, 2015.

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

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

MENDOZA-ARROYO, G. E., et al. Inorganic phosphate solubilization by a novel isolated bacterial strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and its application potential as biofertilizer. *Agriculture*, v. 10, n. 9, p. 383, 2020.

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

MORGULIS A., COULOURIS G., RAYTSELIS Y., MADDEN T.L., AGARWALA R., SCHÄFFER A.A. "Database indexing for production MegaBLAST searches." *Bioinformatics* 15:1757-1764. 2008.

OLIVEIRA, A. U. A Mundialização da Agricultura Brasileira. São Paulo: Iände Editorial, 2016. 545 p. ISBN: 978-85-7506-145-9

OLIVEIRA, J. T. C., et al. Plant growth-promoting mechanisms and genetic diversity of bacteria strains isolated from *Brachiaria humidicola* and *Brachiaria decumbens*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 93, n. 4, e20191123, 2021.

OTEINO, N., et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in microbiology*, v. 6, p. 745, 2015.

PAREDES-MENDOZA, M.; ESPINOSA-VICTORIA, D.; MANCERA, H. A.-Z. Estudio de metabolitos producidos por bacterias que solubilizan fosfato aislado de la raíz y rizoplaneo de gramíneas. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v. 4 n. 4, p. 4944–4949, 2021.

PARRALES, Y. R., et al. Desempenho agrônômico da cultura de arroz *Oryza sativa* sob irrigação com aplicação de MPC, microrganismos promotores de crescimento e hormônios vegetais na área de Babahoyo. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v. 5, n. 1, p. 921–938, 2022.

PATEL, H. A., et al. Isolation and characterization of bacterial endophytes from *Lycopersicon esculentum* plant and their plant growth promoting characteristics. *Nepal Journal of Biotechnology*, v. 2, n. 1, p. 37–52, 2012.

QUIROGA, E. N.; SAMPIETRO, A. R.; VATTUONE, M. A. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, n. 1, p. 89–96, 2001.

RANI, L., et al. An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, v. 283, p. 124657, 2021.

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

SAVARY, S., et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature ecology & evolution*, v. 3, n. 3, p. 430–439, 2019.

SHAH, D., et al. Molecular and Biochemical Characterization, Antimicrobial Activity, Stress Tolerance, and Plant Growth-Promoting Effect of Endophytic Bacteria Isolated from Wheat Varieties. *Microorganisms*, v. 10, n. 1, 2021.

SIEVERS F., WILM A., DINEEN D., GIBSON T.J., KARPLUS K., LI W., LOPEZ R., MCWILLIAM H., REMMERT M., SÖDING J., THOMPSON J.D. and HIGGINS D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:539. (2011).

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, n. 2, p. 311–319, 2000.

SILVA, C. de F., et al. SOIL MICROBIOLOGICAL ACTIVITY AND PRODUCTIVITY OF MAIZE FODDER WITH LEGUMES AND MANURE DOSES. *Revista Caatinga*, v. 31, n. 4, p. 882–890, 2018.

SIMÕES, W. L., et al. Efficient inoculation of diazotrophic bacteria into sugarcane by the drip irrigation system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 54, 2019.

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J., et al. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*, v. 4, p. 26, 2014.

TAURIAN, T., et al. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and Soil*, v. 329, 1-2, p. 421–431, 2010.

TSAVKELOVA, E. A., et al. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 117–126, 2006.

Vandenkoornhuysen, P. et al. The importance of the microbiome of the plant holobiont. *The New phytologist*, v. 206, n. 4, p. 1196–1206, 2015.

VERMA, S. K., et al. Seed-vectored endophytic bacteria modulate development of rice seedlings. *Journal of applied microbiology*, v. 122, n. 6, p. 1680–1691, 2017.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, v. 91, 2-3, p. 127–141, 2001.

VILLA-RODRIGUEZ, E. et al. *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). *Biological control*, v. 132, p. 135-143, 2019.

WANG, Y., et al. The diversity and potential function of endophytic bacteria isolated from *Kobresia capillifolia* at alpine grasslands on the Tibetan Plateau, China. *Journal of Integrative Agriculture*, v. 15, n. 9, p. 2153–2162, 2016.

YOON, S. H., HA, S. M., KWON, S., LIM, J., KIM, Y., SEO, H. and CHUN, J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol.*67:1613-1617. 2017.

ZENGERER, V., et al. *Pseudomonas orientalis* F9: A Potent Antagonist against Phytopathogens with Phytotoxic Effect in the Apple Flower. *Frontiers in microbiology*, v. 9, p. 145, 2018.

ZHAO, L.; XU, Y.; LAI, X. Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 269–278, 2018.