

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**JOHNY DE JESUS MENDONÇA**

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *Digitaria eriantha*  
STEUD E SEU POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO *IN*  
*VITRO* E *IN VIVO***

**RECIFE  
2019**



Johny de Jesus Mendonça  
Engenheiro Agrônomo

**Diversidade de bactérias endofíticas de *Digitaria eriantha* steud e seu potencial de promoção de crescimento *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo

Orientador: Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Coorientador: Prof. Dr. José de Paula Oliveira

**Recife  
2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

#### Ficha catalográfica

M539d Mendonça, Johny de Jesus  
Diversidade de bactérias endofíticas de *Digitaria eriantha* Steud e seu potencial de promoção de crescimento *in vitro* e *in vivo* / Johny de Jesus Mendonça. – 2019.  
111 f.: il.

Orientador: Mario de Andrade Lira Junior.  
Coorientadores: Giselle Gomes Monteiro Fracetto, José de Paula de Oliveira.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, BR-PE, 2019.  
Inclui referências e apêndice(s).

1. Bactérias 2. Gramínea 3. Milho 4. Crescimento (Plantas)  
5. Propagação *in vitro* 6. Microorganismos do solo I. Lira Junior, Mario de Andrade, orient. II. Fracetto, Giselle Gomes Monteiro, coorient. II. Oliveira, José de Paula de, coorient. III. Silva, Davi José da, coorient. IV. Título

CDD 631.4

JOHNY DE JESUS MENDONÇA

**Diversidade de bactérias endofíticas de *Digitaria eriantha* Steud e seu potencial de promoção de crescimento *in vitro* e *in vivo***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2019

---

Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior Orientador  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Eric Xavier de Carvalho  
Pesquisador do Instituto Agrônômico de Pernambuco (IPA)

---

Prof. Dr. Vinicius Santos Gomes da Silva  
Instituto Federal de Pernambuco



*Dedico esse trabalho as pessoas mais importantes da minha vida, minha mãe Maria Isabel e meu pai Derivaldo Mendonça, pela oportunidade que eles não tiveram e eu tenho hoje graças ao apoio deles.*





## **AGRADECIMENTOS**

Neste momento tudo se resume no sentimento de felicidade e conquista, tenho muito a agradecer!

Agradeço a minha família, em especial aos meus pais, Isabel Mendonça e Derivaldo Mendonça, a minha irmã Ilderlânia Mendonça, vocês são o meu porto seguro, sou grato por acreditarem no meu potencial e me encorajarem a seguir em frente. Além disso, agradeço-os a compreensão pelas minhas ausências e a paciência empregada ao me ouvir falar sobre temas que eles jamais pensaram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior, por ter aceitado me orientar, pelo acolhimento, ética, confiança e paciência. Não medindo esforços para a realização deste trabalho. Como também, por ter me introduzido na área das BPCP e diversidade, áreas pelas quais estou encantado.

A minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto da UFRPE, por todo o esforço para a realização desse trabalho, pelos ensinamentos e orientações.

Ao meu Coorientador pesquisador Dr. José de Paula de Oliveira do IPA, pela amizade, por todo o esforço para a realização desse trabalho, pelos ensinamentos e orientações.

Agradeço a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo (PPGCS), pela oportunidade de realização do curso de Mestrado.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pelo apoio logístico e técnico. para desenvolver este trabalho. Disponibilizando os Laboratórios de Biologia do Solo, Genômica e de análises de sementes.

Ao pesquisador Dr. Eric Xavier de Carvalho do IPA, por não ter medido esforços para a realização deste trabalho, pelo incentivo, ensinamentos, e ajuda nas análises.

Aos Docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, em especial, Prof<sup>a</sup>. Dra. Carolina Etienne, e a Prof<sup>a</sup>. Dra Ana Dolores pelos ensinamentos e amizade

A Dra. Maria do Carmo Barreto (Carminha), minha querida amiga, obrigado pelo

incentivo, ensinamentos, ajuda nas análises e pela confiança a mim dedicada.

A Dra. Maria Luiza Bastos, pela amizade, pelos ensinamentos e auxílio na análise molecular.

Ao Dr. Jadson Emanuel Antunes pelo auxílio na análise molecular.

A Me. Elton Pedro Nunes Pena, pela amizade, ensinamentos e auxílio na análise molecular e na condução dos experimentos.

Ao Laboratório de Bioprocessos (CETENE), pela parceria.

Ao laboratório de genética humana- UFPE, pela análise e quantificação do DNA.

A pesquisadora Dra. Regina Ceres Torres, da Rosa do IPA, por todo auxílio na análise de germinação das sementes.

Ao agrônomo Petrônio pelo auxílio no programa de análise de fingerprint.

A Júnior pela amizade e todo auxílio na execução das atividades no Laboratório de Biologia do solo – IPA.

A Marilene, Mário Leandro, Kátia, Rosa e aos outros funcionários do IPA, pelo convívio, ajuda e colaboração nas análises laboratoriais.

A Maria do Socorro, pelo respeito e dedicação.

A todos os colegas do programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial, aos amigos Victor Lucas, Jéssica Oliveira, Augusto, Leandro, Emmanuelle e Iderlane.

Aos colegas do grupo de pesquisa, Michelle Justino, Cybelle, Vanessa Dina, Felipe Fracetto, Adriana Bezerra, Danilo, Natália, Karina, Lucas, Felipe, Ian, José Alberto, obrigado a todos pelo convívio e apoio.

Agradeço em especial ao casal de amigos, Tiago de oliveira e Eduardo, pelo carinho, receptividade, hospitalidade e acolhimento na chegada a esta cidade.

Aos amigos Franciel, Angélica, Heraldo, Rodrigo, Ramon, Luciano, Jéssica Jacilene, Tamiris, Larissa, Márcio e familiares pelo incentivo e apoio incondicional.

Deixo aqui a minha gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para a minha evolução pessoal e profissional.

Aqueles que não foram citados, agradeço igualmente, vocês não são menos importantes do que os outros. Assim como cada coluna tem um papel crucial na construção e estabilidade de um edifício, são vocês sustentam a minha existência.

Muito obrigado, de coração!

## Diversidade de bactérias endofíticas de *Digitaria eriantha* Steud e seu potencial de promoção de crescimento *in vitro* e *in vivo*

### RESUMO

As bactérias endofíticas podem contribuir na promoção de crescimento de plantas, reduzindo os custos de produção e os danos ambientais. Assim, é importante realizar trabalhos de prospecção de bactérias promotoras de crescimento em plantas e seu potencial biotecnológico, promovendo tecnologias que permitam a produção sustentável. O objetivo foi avaliar a biodiversidade da comunidade de bactérias endofíticas promotoras de crescimento do capim pangolão (*Digitaria eriantha* Steud), em diferentes habitats, e testar o efeito da promoção de crescimento no milho. Foram coletadas amostras de colmo, folha, raiz e solo da gramínea, na estação experimental de Araripina, nas estações secas e chuvosa, com calagem e sem calagem. As amostras desinfestadas superficialmente e usadas para isolamento nos meios semissólidos JMV, NFB e JNFB. Foram utilizados para contagem e isolamento, sendo então realizada a caracterização morfofisiológica, avaliação dos índices de diversidade e selecionados representantes dos grupos para avaliar a diversidade molecular, características promotoras de crescimento *in vitro* e testar sua eficiência no milho. Trezentos e dezesseis isolados de bactérias endofíticas nativas foram isoladas e caracterizadas, formando 73 grupos a 100% de similaridade. Destes, foram selecionados 80 representantes para análise de "fingerprint" por BOX-PCR. 67 isolados amplificaram o elemento BOX e a 70% de similaridade todos os isolados foram distintos. Com o sequenciamento do gene 16S rRNA classificou taxonomicamente aos filos (Actinobactérias, Firmicutes e Proteobactérias) e aos gêneros *Alcalinogenes*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Kocuria*, *Massilia*, *Neocardoides*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Shinella* e *Staphylococcus*. Todos apresentaram produção variável para o ácido indol-3-acético (AIA) na presença de L-triptofano, variando de 20 a 215 µg de AIA ml<sup>-1</sup> e a produção de sideróforos. 68% dos isolados foram positivos para fixação de nitrogênio, 35% para solubilização de fosfato e 13% para HCN. Os isolados promoveram o crescimento do milho, em relação altura e comprimento radicular. Os isolados bacterianos não diferiram das estirpes atualmente recomendadas para produção de inoculante o milho. O capim pangolão apresentou uma grande diversidade de bactérias endofíticas, que é afetada pelas condições edafoclimáticas e nichos de colonização, com maior diversidade na estação chuvosa e na área com calagem.

Palavras-chave: Bioprospecção. Poaceae. *Digitaria eriantha*. Proteobactéria. BPCP. Milho.



## Diversity and corn growth promotion by *Digitaria eriantha* Steud endophytic bacteria

### ABSTRACT

Endophytic bacteria may contribute to promote plant growth, reducing production costs and environmental damage. It is thus important to prospect plant growth promoting bacteria and their biotechnological potential, furthering sustainable production technologies. The goal was to evaluate pangolão endophytic bacteria community diversity in different environments and test their effect on corn growth promotion. Samples were harvested from stem, leaves, root and soil of the grass at the Araripina Experimental Station, at rainy and dry seasons, with or without liming. The samples were superficially disinfested and used for isolation on the JMV, NFB and JNFB semisolid media. These were used for population estimation and isolation, and later morphophysiological characterization, diversity index evaluation and group representatives were selected to evaluate molecular diversity, *in vitro* growth promotion characteristics and to test their efficiency on corn. Three hundred and sixteen endophytic native bacteria isolates were isolated and characterized, forming 73 groups at 100% similarity. From these 80 representatives were selected for BOX-PCR fingerprinting of which 67 isolates amplified and were distinct at a 70% similarity level. 16S rRNA sequencing identified at phylum (Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes) and genera *Alcalinogenes*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Massilia*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Neocardoides*, *Stenotrophomonas*, *Kocuria*, *Shinella*, *Pantoea*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. All presented variable production of indol-3-acetic acid (IAA) with L-tryptophan add, ranging from 20 to 215 µg IAA ml<sup>-1</sup> and siderophore production. 68% of the isolates were positive for nitrogen fixation, 35% for phosphate solubilization and 13 for HCN. The isolates promoted height and root length corn development. The isolates did not differ from strains currently recommended for corn inoculant production. Pangolão grass had high endophytic bacteria diversity, which is affected by edaphoclimatic conditions and colonization niche, with the rainy season and limed soils being more diverse

Keywords: Prospection, Poaceae. *Digitaria eriantha*. Proteobacteria. PGPB. Maize.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Localização do Nordeste brasileiro com recorte do estado de Pernambuco, e ênfase para Araripina situada na mesorregião do Sertão ..... 44
- Figura 2** – Populações endofíticas de *Digitaria eriantha* em Araripina, PE, considerando o efeito de diferentes épocas de amostragem, prática cultural da calagem apenas na época chuvosa, de diferentes partes de planta e de meios semissólidos ..... 50
- Figura 3** – Porcentagem de isolados por características morfofisiológicas avaliadas nos isolados de *Digitaria eriantha* em Araripina, PE ..... 52
- Figura 4** – Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA, a partir da matriz de similaridade genética usando o oligonucleotídeo BOX-AIR de 56 isolados bacterianos associados à similaridade genética usando o oligonucleotídeo BOX-AIR de 67 isolados bacterianos associados *D. eriantha*... 56
- Figura 5** – Porcentagem de gêneros bacterianos do capim pangolão, isolados na pastagem do Nordeste brasileiro ..... 59
- Figura 6** – Árvore filogenética determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro Jukes Cantor e teste de bootstrap com 1000 repetições. Sequências do gene 16S rRNA dos isolados endofíticos do capim pangolão..... 65
- Figura 7** – Localização do Nordeste brasileiro com recorte do estado de Pernambuco, e ênfase para Araripina situada na mesorregião do Sertão ..... 74
- Figura 8** – Formação dos grupos das bactérias endofíticas produtoras de AIA a 100% de similaridade..... 85
- Figura 9** – Formação dos grupos das bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato a 100% de similaridade..... 87
- Figura 10** – Formação dos grupos das bactérias endofíticas produtores de sideróforos a 100% de similaridade..... 89
- Figura 11** – Isolados diazotróficos avaliados in vitro para características associadas a promoção de crescimento (AIA, sideróforos, Redução de acetileno, solubilização de fosfato e produção de HCN..... 90
- Figura 12** – Formação dos grupos de acordo com os mecanismos de promoção de crescimento in vitro produção de ácido indolilacético (AIA), índice de solubilização de fosfato (IS), fixação biológica de N<sub>2</sub> (FBN in vitro), produção ácido cianídrico (HCN) e produção de sideróforos (PS) do capim pangolão, isolados na pastagem do Nordeste brasileiro ..... 92





## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Amostragens em pastagens de pangolão (*Digitaria eriantha*) nas mesorregiões do Sertão (Araripina), de Pernambuco ..... 44
- Tabela 2** – Características químicas do solo da área experimental. .... 45
- Tabela 3** – Números de isolados na *Digitaria eriantha* em Araripina, PE, considerando o efeito de diferentes épocas de amostragem, da calagem apenas na época chuvosa, de diferentes partes de planta e de meios de cultura ..... 51
- Tabela 4** – Avaliação da diversidade fenotípica de isolados endofíticos em capim pangolão, comparando os efeitos de local, época, parte da planta e calagem sobre medidas de diversidade ..... 54
- Tabela 5** – Identidade dos isolados endofíticos de colmo, folha, raiz e solo, na área com calagem e sem, nas estações seca e chuvosa, nos meios JMV, JNFB e NFB do capim pangolão, com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa Blast no GenBank ..... 60
- Tabela 6** – Identidade dos isolados endofíticos de colmo, folha, raiz e solo, na área com calagem e sem, nas estações seca e chuvosa, nos meios JMV, JNFB e NFB do capim pangolão, com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa Blast no GenBank ..... 61
- Tabela 7** – Isolados selecionados para análise dos mecanismos de promoção de crescimento *in vitro* e análise da eficiência no milho..... 76
- Tabela 8** – Mecanismos de promoção de crescimento *in vitro* avaliados dos isolados na *Digitaria eriantha* em Araripina, PE (Continua ..... 80
- Tabela 9** – Comparações dos tratamentos com isolados com os controles, pelo teste de Dunnett a 10% de probabilidade em negrito, após 35 dias em sistema hidropônico ..... 95
- Tabela 10** – Coeficientes de correlação dos dados *in vitro* de promoção de crescimento com os dados da avaliação biométrica inoculada ..... 102



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	21
1.1 Hipóteses .....	22
1.2 Objetivo Geral .....	22
1.3 Objetivos Específicos .....	22
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Pastagens .....	23
2.2 Bactérias endofíticas promotoras de crescimento (BPCP) .....	24
2.2.1 Mecanismos de promoção de crescimento .....	26
2.2.1.1 Ácido indol-3-acético (AIA) .....	26
2.2.1.2 Solubilização de fosfato .....	27
2.2.1.3 Fixação de nitrogênio .....	27
2.2.1.4 Ácido cianídrico (HCN) .....	28
2.2.1.5 Produção de sideróforos .....	28
2.2.2 Diversidade das bactérias endofíticas promotoras de crescimento (BPCP) ....	28
2.2.2.1 Diversidade genética das bactérias endofíticas promotoras de crescimento (BPCP).....	29
2.2.2.2 Análise de “fingerprint” pela amplificação do elemento BOX.....	30
2.2.3 Bactérias promotoras de crescimento em milho .....	31
REFERÊNCIAS .....	32
3 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CAPIM PANGOLÃO ( <i>Digitaria eriantha</i> Stent) .....	41
RESUMO .....	41
ABSTRACT.....	42
3.1 INTRODUÇÃO .....	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.2.1 Amostragem.....	44

3.2.2 Análise da diversidade das bactérias endofíticas .....	45
3.2.2.1 Desinfestação, isolamento e caracterização morfofisiológica das bactérias diazotróficas.....	45
3.2.3 Avaliação da diversidade genética .....	47
3.2.3.1 Extração do DNA genômico total dos isolados .....	47
3.2.3.2 BOX-PCR.....	48
3.2.3.3 Amplificação, sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados.....	48
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
3.3.1 Avaliação das populações de bactérias endofíticas na <i>Digitaria eriantha</i> .....	49
3.3.2 Avaliação da diversidade fenotípica das bactérias endofíticas .....	53
3.3.3 Diversidade genotípica dos isolados selecionados pela amplificação do elemento BOX .....	55
3.3.4 Amplificação e Sequenciamento do gene 16S rRNA ribossomal.....	57
3.3.4.1 Relações filogenéticas entre isolados bacterianos .....	64
3.4 CONCLUSÕES .....	66
REFERÊNCIAS .....	66
4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO ISOLADAS DE CAPIM PANGOLÃO AFETAM O MILHO?.....	71
Resumo .....	71
Abstract.....	72
4.1 INTRODUÇÃO .....	73
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	74
4.2.1 Amostragem.....	74
4.2.2 Seleção das bactérias endofíticas .....	74
4.2.3 Avaliação <i>in vitro</i> dos mecanismos de promoção de crescimento .....	77
4.2.3.1 Determinação de Ácido Indolacético (AIA) .....	77
4.2.3.2 Solubilização de fosfato .....	77
4.2.3.3 Crescimento em meio sem N – avaliação qualitativa da fixação biológica de nitrogênio .....	77

4.2.3.4 Produção de sideróforos .....	77
4.2.3.5 Produção de ácido cianídrico (HCN) .....	78
4.2.4 Eficiência das bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento do milho .....	78
4.2.5 Análise estatística .....	79
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.3.1 Avaliação da produção de ácidos indolacético (AIA) .....	84
4.3.2 Avaliação da Solubilização de fosfato .....	86
4.3.3 Crescimento em meio sem N – avaliação qualitativa da fixação biológica de nitrogênio .....	88
4.3.4 Avaliação da produção de Sideróforos .....	88
4.3.5 Avaliação da produção de HCN .....	90
4.3.6 Ligação dos mecanismos promotores de crescimento <i>in vitro</i> e a identificação dos isolados pelo sequenciamento parcial do 16S rRNA .....	90
4.3.7 Eficiência das bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento do milho. ....	94
4.4 CONCLUSÕES .....	103
REFERÊNCIAS .....	104
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	111



## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é protagonista mundial na produção agropecuária e um dos países responsáveis por desenvolver tecnologias que possibilitam uma produção agrícola sustentável, com efeito na mitigação de emissão dos gases CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> e NO<sub>3</sub>. Dentre elas, tem-se a substituição de insumos oriundo da indústria por alternativas biológicas como pelo uso de bactérias promotoras de crescimento (BPCP).

A utilização dessas bactérias para o aumento da produção agrícola será provavelmente uma das propostas mais importantes para a agricultura moderna, pela diminuição da dependência de fertilizantes químicos, como também enfatizado pelo Plano de Agricultura de Baixo Carbono do Governo Federal e sua contraparte no nível estadual. Ambos enfatizam a necessidade de redução de uso de insumos não biológicos em culturas de cereais como o milho, em função de sua alta demanda de fertilizantes, e culturas forrageiras, em função da grande proporção de pastagens com algum grau de degradação, bem como pela extensa área que ocupam.

Há literatura sobre a diversidade de bactérias responsáveis pela promoção de crescimento de plantas, que modulam o metabolismo da planta e estimulam seu crescimento e produtividade por mecanismos diretos e/ou indiretos. Alguns mecanismos potencialmente importantes são a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfato, a síntese e liberação de fitohormônios tais como AIA, a atuação no controle de fitopatógenos através da síntese e liberação de sideróforos e ácido cianídrico.

No entanto, poucos estudos avaliam estes diferentes mecanismos simultaneamente para um conjunto amplo de genótipos bacterianos. Ao mesmo tempo, trabalhos visando a adoção de práticas de inoculação microbiana em Poaceae tendem a usar misturas de estirpes, inclusive de diferentes espécies, mas não indicar de forma clara qual o principal mecanismo fisiológico envolvido com a promoção de crescimento.

### **1.1 Hipóteses**

- 1 A biodiversidade de bactérias endofíticas associadas ao capim pangolão é afetada pelas condições edafoclimáticas e nichos de colonização.
- 2 O estudo da diversidade da comunidade microbiológica associada ao capim pangolão é uma ferramenta que pode auxiliar na obtenção de bactérias eficientes para promoção do crescimento das plantas.

### **1.2 Objetivo Geral**

Avaliar a biodiversidade da comunidade de bactérias endofíticas promotoras de crescimento do capim pangolão, em diferentes habitats, e testar o efeito na promoção de crescimento no milho.

### **1.3 Objetivos Específicos**

1. Isolar e avaliar a diversidade de bactérias endofíticas promotoras de crescimento no capim pangolão em diferentes nichos e condições edafoclimáticas;
2. Estudar mecanismos de promoção de crescimento *in vitro* de bactérias endofíticas e sua possível relação com a promoção de crescimento *in vivo* na cultura do milho;



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Pastagens

De acordo com o IBGE (2017), as pastagens ocupam aproximadamente 158 milhões de hectares. Destes, estima-se que 30,5 milhões se encontram na região Nordeste, sendo 16 milhões com pastagens naturais e 14,5 milhões com pastagens cultivadas (IBGE, 2009). Com o gênero *Digitaria* presente nas pastagens, com cerca de 26 espécies nativas, das quais nove são endêmicas, além de 12 espécies exóticas distribuídas no Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, fazendo do Brasil o país das Américas com o maior número de espécies deste gênero (DIAS et al., 2007; ARAUJO et al., 2017).

O capim pangolão, anteriormente classificado como *Digitaria pentzii* Stent foi reclassificado como *Digitaria eriantha* Steud. cv. Suvernola (COOK; SCHULTZE-KRAFT, 2015). O pangolão é uma gramínea perene e fortemente estolonífera, com colmos simples ou ramificados na base, em linha reta ou dobrados nos nós e é considerada resistente à seca, ao fogo e ao pastejo (RATTRAY, 1960; COOK; SCHULTZE-KRAFT, 2015). Há registro de uso do capim pangolão em pastagem na Estação Experimental de Araripina do IPA, com a ausência de calagem ou adubação de cobertura ao longo de pelo menos 30 anos (TAVARES, 2017).

Agroecossistemas complexos como pastagens são descritos com potencial de ter alta diversidade de micro-organismos nativos, onde a atividade, abundância e composição das populações bacterianas são moduladas por diversos fatores bióticos e abióticos que influenciam a colonização nas plantas (RILLINGA et al., 2019). As bactérias endofíticas vivem nos tecidos de qualquer parte da planta, sendo protegidas do estresse ambiental e da competição microbiana (QIN et al., 2011; GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015). Com capacidade de fornecer compostos estruturalmente diversificados, com pouca bioatividade conhecida, podendo auxiliar no crescimento, desenvolvimento e proteção da planta contra estresses bióticos e abióticos.

Sendo assim, as endofíticas podem ser utilizados na agricultura, afim de reduzir custos, diminuindo a dependência de fertilizantes industrializados, e aumentando a produtividade (CARVALHO et al., 2017). Além disso, como enfatizado pelo Plano de Agricultura de Baixa Emissão de Carbono – Plano ABC do Governo Federal e do estado de Pernambuco para a redução dos impactos da produção agrícola sobre a produção de gases de efeito estufa (BRASIL, 2012; PERNAMBUCO, 2017). Uma das

alternativas apresentadas no Plano ABC para atingir essa demanda é utilização de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) (BRASIL, 2012), sendo um dos assuntos de maior importância para a agricultura moderna pelos baixos custos e impacto ambiental (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016)

No Brasil, as bactérias endofíticas têm sido isoladas e caracterizadas de diversos gêneros da família Poaceae (*Oryza sativa*, *Brachiaria*, *Pennisetum glaucum*, *Sorghum bicolor*, *Triticum* spp e *Zea mays*, .) e utilizadas como inoculantes (SILVA et al., 2012; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016; PATEL; ARCHANA, 2017). Com grande potencial no aumento da produtividade e redução de custos, diminuindo a dependência de fertilizantes industrializados (CARVALHO et al., 2017). Hungria, Nogueira e Araujo (2016), demonstraram o efeito positivo da inoculação de *A. brasilense* em *Brachiaria* sp. em três locais do Brasil durante dois anos. A inoculação com endofíticos pode ser uma estratégia importante para Pernambuco, uma vez que a área cultivada com cana-de-açúcar, cereais (VASCONCELOS; FERREIRA, 2014) e plantas forrageiras é a mais extensa do estado (IBGE, 2009).

## **2.2 Bactérias endofíticas promotoras de crescimento (BPCP)**

Os micro-organismos desempenham serviços ecológicos importantes como os ciclos biogeoquímicos e a manutenção do bom funcionamento do ecossistema (BARRIOS, 2007; BAE et al., 2018). Também podem facilitar a absorção de nutrientes pelas plantas (STAMFORD et al., 2015); alterar a disponibilidade e a toxicidade de metais às plantas (WOOD et al., 2016); proteção de plantas pela indução na produção de fitohormônios como os ácidos salicílico e jasmônico; aumento do sistema radicular com a produção de ácido indolacético; auxiliar nos processos como a fixação de nitrogênio atmosférico (FUKAMI et al., 2018); produção de sideróforos (LOACES; FERRANDO; SCAVINO, 2011) e favorecer a colonização de fungos micorrízicos (BURITY et al., 2000), e assim promover o crescimento de plantas.

As bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) podem estar em vida livre – em associação com partículas minerais e matéria orgânica, na rizosfera de plantas, com distintos graus de proximidade com as raízes e o solo circundante; endofíticas ou associativas através de processos simbióticos ou não (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015). As bactérias colonizadoras da rizosfera podem ser encontradas no interior das plantas como já foi postulado pela Galippe em 1887 e revisado por Compant et al. (2010) e demonstrado nas últimas décadas, que o interior

da planta é colonizado por uma variedade de endofíticas (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI; 1995; BALDANI, BALDANI; DOBEREINER, 1996; HARDOIM et al., 2008; SARKAR; REINHOLD-HUREK, 2014; HUNGRIA; RIBEIRO; NOGUEIRA, 2018).

Os endofíticos são capazes de entrar e colonizar uma parte do interior da planta (GLICK, 2015). As BPCP endofíticos pode ser dividido em dois tipos gerais: bactérias que infectam apenas um número muito limitado de plantas, como os rizóbios que interagem com as Fabaceae (GLICK, 2015); bactérias que estão no tecido interno das plantas, mas não fazem simbiose, normalmente com espectro amplo de colonização. Patel e Archana (2017), descreveram que estas bactérias penetram na área do córtex da planta até chegar à endoderme através da degradação da parede celular por enzimas, como celulasas e poligalacturonases, bem como fazem uso de flagelos, pili e vibração para ajudar na mobilidade e colonização das partes acima do solo das plantas hospedeiras.

Bactérias de vários gêneros foram relatadas como tendo associação endofítica com plantas, incluindo *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Rhizobium*, *Microbacterium*, *Shillella*, *Erwinea*, *Agrobacterium*, *Chryseomonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas* e *Sphingomonas*, *Acetobacter*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Enterobacter* e *Klebsiella* que foram isolados de uma ampla gama de plantas (ANTUNES et al., 2017; MUTAI; NJUGUNA; GHIMIRE, 2017; RODRÍGUEZ et al., 2018; BARRETO et al., 2018) dentre elas as Poaceae

As bactérias endofíticas vivem nos tecidos de qualquer parte da planta, sendo protegidas do estresse ambiental e da competição microbiana (QIN et al., 2011; GARCIA; KNAAK; FIUZA, 2015). Considerando seu nicho ecológico, tem sido sugerido que bactérias endofíticas podem apresentar vantagens ecológicas sobre as bactérias rizosféricas e epifíticas, por interagirem mais estreitamente com o hospedeiro, logo com menos competição por fontes de carbono dentro de um ambiente mais protegido (JAMES, 2000; SANTOYO et al., 2016).

A colonização pode ser não uniforme, a depender de alguns fatores, tais como: padrões variados de exsudação de raízes, efeitos de sensibilidade *quorum* bacteriana (COMPANT, CLÉMENT e SESSITSCH, 2010), influenciadas pela espécie, cultivar, idade, tipo de tecido da planta e estresse (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009; PATEL E ARCHANA, 2017). Estas bactérias podem afetar o crescimento e desenvolvimento das plantas, direta ou indiretamente. A promoção direta do

crescimento das plantas ocorre quando uma bactéria facilita a aquisição de recursos ou nutrientes essenciais do meio ambiente ou modula o nível de hormônios dentro de uma planta (GLICK, 2015). Contribuem na aquisição de nutrientes como nitrogênio (SILVA et al., 2018), fósforo e ferro (SINGH et al., 2018). Sintetizam e fornecem um ou mais fitohormônios (auxina, citocinina e giberelina), as bactérias podem diminuir os níveis do etileno por sintetizar uma enzima, 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase, que cliva o ACC, o precursor imediato do etileno em todas as plantas superiores (GLICK, 2015; SINGH et al., 2018). Protegendo-as dos danos causados pela produção do etileno quando estão sob condições de estresse bióticos e abióticos (GLICK, 2014). A promoção indireta do crescimento das plantas ocorre quando a BPCP previne, ou pelo menos diminui, os danos que poderiam ocorrer como consequência da infecção da planta com qualquer um dos vários fitopatógenos e pela diminuição de danos por insetos ou nematoides (Glick, 2015).

Muitos estudos foram realizados para melhorar o conhecimento sobre a associação bactéria-planta, empregando técnica molecular (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016), bem como co-inoculação (FUKAMI et al., 2018) e a produção industrial de inoculantes (DE-BASHAN, HERNANDEZ E BASHAN, 2015). No entanto, ainda há informações a serem descobertas sobre a magnitude e os mecanismos exatos envolvidos nos efeitos positivos dos inoculantes bacterianos na promoção de crescimento em plantas na recuperação de nitrogênio, fósforos e outros nutrientes.

## **2.2.1 Mecanismos de promoção de crescimento**

### **2.1.1.1 Ácido indol-3-acético (AIA)**

A auxina desempenha um grande papel no crescimento das plantas, principalmente, atuando no sistema radicular e nas respostas a estímulos ambientais (AMIN; LATIF, 2017). Por isso é amplamente estudada, e tem os mecanismos de função e regulação bem demonstrados. A principal forma de auxina natural, ácido indol-3-acético (AIA), tem sua produção por isolados microbianos e é mais eficiente no crescimento das plantas do que solução pura de AIA (PUENTE et al., 2018). É produzida por diferentes gêneros como *Azospirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, entre outros, com diferentes caminhos biossintéticos, e com produção variável de acordo com espécies (AMIN; LATIF, 2017).

As bactérias produtoras de AIA podem aumentar o crescimento da planta,

especialmente a iniciação e alongamento da raiz (SHAO et al., 2015), resultando em maior massa radicular e conseqüentemente, uma maior absorção de nutrientes pela planta (HUSSAIN et al., 2015; ARSHAD et al., 2016), inclusive N (SILVEIRA et al., 2016).

#### **2.1.1.2 Solubilização de fosfato**

A solubilização de fosfato é outro mecanismo bastante relatado e importante na disponibilização do fósforo às plantas em solos tropicais, que normalmente têm limitada disponibilidade de fósforo. Segundo Li et al. (2017), as BPCP desempenham um papel crítico nos modelos de ciclos biogeoquímicos das formas de ciclo P solúvel e insolúvel nos ecossistemas agrícolas. Parte do P do solo encontra-se imobilizado nas formas inorgânicas com cálcio, ferro e alumínio, ou em formas orgânicas (LI et al., 2017). As bactérias mobilizam fosfatos inorgânicos insolúveis da matriz mineral do solo podendo ser absorvidos pelas raízes das plantas (LYU et al., 2016), através da liberação de ácidos orgânicos, de baixo peso molecular, que através dos seus grupos hidroxilo e carbóximo, quelam cátions ligados ao fosfato, convertendo-o assim em formas solúveis (ARCHANA; BUCH; KUMAR, 2012), sendo conhecido como o principal mecanismo de solubilização.

A excreção destes compostos também promove a acidificação do ambiente do solo circundante, resultando na liberação de fósforo de complexos minerais insolúveis (MENDES, et al., 2014; LI et al., 2015) que pode ser assimilados pelas plantas. Estes micro-organismos juntamente com as fixadoras de nitrogênio desenvolvem relação protocooperação, favorecendo a promoção do crescimento da planta em ambientes com baixa disponibilidade de P (ARAÚJO; SAMPAIO; SCHAEFER, 2017).

#### **2.1.1.3 Fixação de nitrogênio**

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a conversão do N<sub>2</sub> atmosférico em amônia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), realizada por diversos micro-organismos simbióticos e de vida livre, conhecidos também como bactérias diazotróficas, sendo responsáveis por contribuir na entrada de nitrogênio nos ecossistemas naturais (CUSACK et al., 2009; REED et al., 2011; PATEL; ARCHANA, 2017). A FBN é catalisada pela enzima nitrogenase que requer ferro e molibdênio como cofatores codificados pelos genes nif (H,D,K), (BOLHUIS et al., 2010; GONZALEZ et al., 2012; GABY; BUCKLEY, 2012), através de uma reação altamente endergônica, com elevada energia de ativação, a qual é inibida

na presença de oxigênio (CANFIELD et al., 2010).

Estas enzimas são encontradas em muitas bactérias associativas ou endofíticas, como as dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia* e que são encontradas principalmente no solo da rizosfera, no rizoplane e no interior dos tecidos (LOWMAN et al., 2016; SILVEIRA et al., 2016; TAULÉ et al., 2016; XING et al., 2016). Com grande C potencial de aumentar a disponibilidade de nitrogênio para plantas, particularmente no caso de cereais (PATEL; ARCHANA, 2017).

#### **2.1.1.4 Ácido cianídrico (HCN)**

As bactérias endofíticas produtoras de ácido cianídrico (HCN) podem induzir a resistência nas plantas e a inibição de patógenos radiculares, como fungos, oomicetos, nematoides, protozoários (FLURY et al., 2017). Segundo os mesmos, também tem a capacidade de infectar e matar larvas de insetos.

Desta forma, as BPCP podem ser utilizadas como controle biológico produzindo medidas de controle ambientalmente amigáveis e de baixo custo usando micro-organismos antagonistas que reduzem o número e a atividade dos fitopatógenos.

#### **2.1.1.5 Produção de sideróforos**

As BPCP liberam substâncias de baixo peso molecular que atuam como quelantes de metais, como os sideróforos quelantes de ferro íon  $Fe^{3+}$ , na rizosfera (JI; GURURANI; CHUN, 2014; SULOCHANA et al., 2014), que pode atuar no controle biológico de micro-organismos fitopatogênicos ao adquirirem o ferro disponível no ambiente prejudicando-os (NIEHUS et al., 2017). Além disso, o ferro quelado pode ser utilizado como co-fator de diversas enzimas essenciais em importantes vias metabólicas dos organismos. Dentre estes, tem as bactérias diazotróficas que usa o ferro no processo de fixação do nitrogênio (MCROSE et al., 2017).

#### **2.2.2 Diversidade das bactérias endofíticas promotoras de crescimento (BPCP)**

Os agroecossistemas, são ambientes complexos com alta diversidade de microrganismos nativos, onde a atividade, abundância e composição das populações bacterianas são moduladas por diversos fatores bióticos e abióticos (RILLINGA et al., 2019). Os principais fatores que influenciam a colonização por PGPB são (em ordem de importância) espécies vegetais, exsudatos radiculares, propriedades químicas do

solo, clima e localização espacial (BURNS et al., 2015; RILLINGA et al., 2019). Por exemplo, Patel e Archana (2017) encontraram bactérias endofíticas em diferentes gramíneas (milho, trigo, milheto, sorgo e arroz) variando de acordo com as espécies e local de isolamento.

Desta forma, a avaliação da diversidade e potencial de promoção de crescimento das comunidades de bactérias endofíticas em diferentes ambientes permite avaliar o efeito ambiental sobre estas comunidades separadamente do efeito genotípico da planta, que normalmente é bastante importante na fixação de N por não leguminosas (DWIVEDI et al., 2015; RODRÍGUEZ-BLANCO; SICARDI; FRIONI, 2015; SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015; SANTOYO et al., 2016). Os estudos para selecionar e avaliar biodiversidade de endofíticas, geralmente baseiam-se, no método clássico, em características de isolados obtidos de vários tecidos internos de diferentes plantas (FERNANDES-JÚNIOR et al., 2015; PATEL; ARCHANA, 2017; BARRETO et al., 2018), com isolamento em meios de cultura semi-específicos – livres de nitrogênio, variando a fonte de carbono e pH.

A diversidade e riqueza das bactérias endofíticas pode ser aferida por diferentes formas e diversos índices. Como, por exemplo, os índices de diversidade de Shannon-Weaver (H), Simpson 1 H, equitabilidade (J), de dominância (D), de riqueza (Margalef) e riqueza estimada (Chao 1) (HAMMER et al., 2001). Por exemplo, Lambais, Lucheta e Crowley (2014), utilizaram os índices de Shannon, Simpson e Chao 1 para avaliar a diversidade de bactérias em diferentes árvores, sendo a diversidade na rizosfera maior que na filosfera ou dermosfera. Já Gupta et al. (2014), utilizaram os índices de diversidade de Shannon e Pielou em gramíneas e encontraram maior índice diversidade e uniformidade de bactérias diazotróficas, na rizosfera do que nas amostras de raiz.

Além dos métodos tradicionais, a diversidade microbiana pode ser avaliada de forma mais ampla, pela utilização de técnicas mais modernas como a biologia molecular, possibilitando o estudo dos micro-organismos tanto dependentes com independentes de cultivo, pela detecção de ácidos nucleicos (ANDREOTE; AZEVEDO; ARAÚJO, 2009; PATEL; ARCHANA, 2017).

### **2.2.2.1 Diversidade genética das bactérias endofíticas promotoras de crescimento (BPCP)**

A diversidade também pode ser analisada por diferentes técnicas moleculares,

que vem auxiliando na identificação da diversidade de bactérias diazotróficas e são imprescindíveis na descoberta de novas espécies. O sequenciamento do gene 16S rRNA é o método mais utilizado para identificação filogenética de bactérias (GONZALEZ et al., 2012; HIRSCH; MAUCLINE, 2012), podendo até chegar à espécie (GARRITY; HOLT, 2001). Este método é complementado por outras técnicas, pois já foi demonstrado que em vários gêneros de bactérias a variabilidade no 16S rRNA é frequentemente baixa e pode não refletir a diversidade detectada por outras propriedades morfofisiológicas ou genéticas (GERMANO et al., 2006; MENNA et al., 2006). Maroniche et al. (2017), encontraram variações na caracterização filogenética do *Azospirillum* com essa técnica e assim utilizou-se de outros métodos complementares.

O método de análise de sequências Multilocus (Multilocus Sequence Analysis – MLSA) tem sido cada vez mais utilizado em estudos de filogenia e taxonomia. O método consiste na análise de vários genes housekeeping dispersos em pelo menos 100 kb do genoma (COOPER; FEIL, 2004).

Definições bem-sucedidas de grupos filogenéticos de rizóbios têm sido alcançadas com o uso de MLSA (MENNA et al., 2006; MOULIN et al., 2004). Por exemplo, o MLSA foi utilizado para avaliar a diversidade de uma coleção de *Bradyrhizobium* (DELAMUTA et al., 2012). Em adição ao 16S rRNA, cinco genes housekeeping (*recA*, *atpD*, *glnII*, *gyrB* and *rpoB*) foram utilizados e os resultados demonstraram um nível consideravelmente mais elevado da diversidade genética, com indicação de novas espécies.

### **2.2.2.2 Análise de “fingerprint” pela amplificação do elemento BOX**

A análise de genes ribossomais das bactérias não consegue diferenciar ao nível de estirpes, assim sendo necessário utilizar outros métodos genéticos para diferenciá-los, tanto na rotina de manutenção das coleções de culturas, como na etapa de distribuição para as indústrias de inoculantes (HUNGRIA et al., 2008). Segundo os mesmos, um método internacionalmente reconhecido de caracterização de estirpes consiste na determinação do perfil de DNA após a amplificação com primers (oligonucleotídeos) relacionados a regiões repetitivas e conservadas do DNA, em geral no espaço intergênico, conhecida como a avaliação por box-PCR (repetitive-sequence-based-PCR). Os elementos repetitivos parecem estar localizados em posições distintas intergênicas no genoma, em ambas as orientações. Sendo as



famílias BOX — BOX A (54 pb), BOX B (43 pb) e BOX C (50 pb)(MARTIN et al., 1992) os principais elementos em bactérias. Apesar da existência de três elementos, a subunidade BOX A tem se mostrado como elemento altamente conservado (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; MARTIN et al., 1992; KOEUTH; VERSALOVIC; LUPSKI, 1995; MARTINS et al., 2015).

A técnica BOX-PCR é utilizada em diversos estudos com bactérias diazotróficas (KASCHUK et al., 2006; MENNA et al., 2009; MARTINS et al., 2015; ANTUNES et al., 2017). Além disso, ela é recomendada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA - para o controle de qualidade de coleções de culturas de rizóbios, bem como para a recomendação das estirpes como inoculantes (BRASIL, 2011).

### **2.2.3 Bactérias promotoras de crescimento em milho**

O milho (*Zea mays* L.) é um dos cereais mais cultivados, e é um dos principais alimentos para humanos e animais (ROSAS-CASTOR et al., 2014). O Brasil é um dos maiores produtores do grão, com produção distribuídas nas cinco regiões.

O Nordeste inclui uma das fronteiras agrícolas, a região Matopiba (Maranhão, Tocantins, Piauí e Bahia), pertencentes ao bioma Cerrado e onde se desenvolve agricultura de alta produtividade com uso intensivo de insumos modernos, com produção do grão (PEREIRA, PORCIONATO; NUNES DE CASTRO, 2018), dependentes de adubos nitrogenados, fosfatados e água para irrigação. Como também, uma produção em menor escala, provinda da agricultura familiar, que atende à demanda interna. Sergipe, por exemplo, nos últimos anos teve expansão na produção de milho, com novas variedades e aumento no uso de insumos químicos, a fim de assegurar produtividades elevadas (BARROS et al., 2016).

As variedades de milho existentes no mercado, são exigentes em insumos agrícolas, particularmente, fertilizantes-N-P, para obter o máximo rendimento agrícola (KUAN et al., 2016). Assim, há espaço para uso de biotecnologias, como as BPCP, que podem trazer inúmeros benefícios para a cultura do milho. No trabalho de Kuan et al. (2016) a produção de biomassa de parte aérea e radicular está correlacionada positivamente com a produção de AIA pelas cepas de *Bacillus*. Como também, relataram que os mecanismos das BPCP podem ser uma alternativa para melhorar o rendimento de grãos.

No Brasil as estirpes de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 são

amplamente utilizadas em inoculantes comerciais para gramíneas e co-inoculadas em leguminosas, responsáveis pela fixação de nitrogênio, síntese de fitohormônios e adaptação ambiental (HUNGRIA; RIBEIRO; NOGUEIRA, 2018). Segundo os supracitados, na safra de 2017 a 2018, cerca de 5 milhões de doses de inoculantes contendo as cepas Ab-V5 e Ab-V6 foram comercializadas no Brasil, e seu uso está se expandindo nos países vizinhos. Estes inoculantes são usados nos cereais mais importantes, como o milho (*Zea mays* L.) , arroz (*Oryza sativa* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.) (REIS; BALDANI; BALDANI, 2015) além da *Brachiaria* (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016).

## REFERÊNCIAS

- ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, São paulo, v. 40, n. 3, p. 417–32,. 2009.
- ANTUNES, J. E. L.; LYRA, M. C. C. P.; OLLERO, F. J.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, L. M. S.; ARAÚJO, A. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão preto, v. 16, n. 2, 10 2017.
- ARAUJO, H. R.; ALBUQUERQUE RANGEL, J. H. DE; FAGUNDES, J. L.; MUNIZ, E. N.; OLIVEIRA SANTOS, D. DE; NETO, J. A. S.; FILHO, E. S. C.; ARRUDA SANTOS, G. R. DE. Productive characteristics of the grass *Digitaria umfolozi* subjected to defoliation frequencies. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 343–354, 2017.
- ARAÚJO, M. DO S. B. DE; SAMPAIO, E. V. S. B.; SCHAEFER, C. E. R. Phosphorus desorption affected by drying and wetting cycles in Ferralsols and Luvisols of Brazilian Northeast. **Archives of Agronomy and Soil Science**, Oxon, v. 63, n. 2, p. 242–249, 2017.
- ARCHANA, G.; BUCH, A.; KUMAR, G. N. Pivotal Role of Organic Acid Secretion by Rhizobacteria in Plant Growth Promotion. *In: Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012. p. 35–53.
- BAE, H. S.; HUANG, L.; WHITE, J. R.; WANG, J.; DELAUNE, R. D.; OGRAM, A. Response of microbial populations regulating nutrient biogeochemical cycles to oiling of coastal saltmarshes from the Deepwater Horizon oil spill. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 241, p. 136–147, 2018.

BARRETO, M. DO C. S.; FIGUEIREDO, M. DO V. B.; SILVA, M. V. DA; ANDRADE, A. G. DE; OLIVEIRA, J. DE P. DE; ALMEIDA, C. M. A.; ARAÚJO, L. C. A. DE; JUNIOR, O. V. DOS R.; JUNIOR, M. U. F.; COSTA, A. F. DA; LIMA, V. L. DE M. Biotechnological Potential of Endophytic Bacteria to Improve the Micropropagated Seedling of Variety RB92579 Sugarcane. **Advances in Microbiology**, Califórnia, v. 08, n. 11, p. 859–873, 2018.

BARRIOS, E. Soil biota, ecosystem services and land productivity. **Ecological Economics**, Amsterdam, v. 64, n. 2, p. 269–285, 2007.

BARROS I.; SANTOS, W. M.; PACHECO, E. P.; PROCÓPIO, S.O.; SOUZA; H. N. **Adução Nitrogenada para a Cultura do Milho na Transição Zona da Mata-Agreste de Sergipe**. Aracaju: Embrapa: Tabuleiros costeiros, 2016. 19 p. (Embrapa-Tabuleiros costeiros. Documentos, 107).

BRASIL.; MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma economia de baixa emissão de carbono na agricultura : plano ABC (Agricultura de Baixa Emissão de Carbono)**. Brasília: MAPA/ACS:. 2012. 173 p

BURITY, H. A.; LYRA, M. D. C. C. P. DE; SOUZA, E. S. DE; MERGULHÃO, A. C. D. E. S.; SILVA, M. L. R. B. DA. Efetividade da inoculação com rizóbio e fungos micorrízicos arbusculares em mudas de sabiá submetidas a diferentes níveis de fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 4, p. 801–807, 2000.

BURNS, J. H.; ANACKER, B. L.; STRAUSS, S. Y.; BURKE, D. J. Soil microbial community variation correlates most strongly with plant species identity, followed by soil chemistry, spatial location and plant genus. **AoB PLANTS**, Oxford, v. 7, n. 0, p. plv030-plv030, 2015.

CARDOSO, I. C. M.; FILHO, O. K.; MARIOTTO, J. R.; MIQUELLUTI, D. J.; VICENTE, D.; NEVES, A. N. Ocorrência de bactérias endofíticas do gênero *Azospirillum* em arroz irrigado no estado de Santa Catarina. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 9, n. 2, p. 178–186, 2010.

CARVALHO, E. X. DE; MENEZES, R. S. C.; FREITAS, A. D. S. DE; SAMPAIO, E. V. DE S. B.; NETO, D. E. S.; TABOSA, J. N.; PRIMO, D. C.; QUEIROZ, R. O. DE. The <sup>15</sup>N natural abundance technique to assess the potential of biological nitrogen fixation (BNF) in some important C4 grasses. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore nsw, v. 11, n. 12, p. 1559–1564, 2017.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 669–678, 2010.

COOK, B. G.; SCHULTZE-KRAFT, R. Botanical name changes - nuisance or a quest for precision? **Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales**, Cali, v. 3, n. 1, p. 34, 2015.

COOPER, J. E.; FEIL, E. J. Multilocus sequence typing – what is resolved? **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 12, n. 8, p. 373–377, 2004.

DE-BASHAN, L. E.; HERNANDEZ, J. P.; BASHAN, Y. Interaction of *Azospirillum* spp. with Microalgae: A Basic Eukaryotic–Prokaryotic Model and Its Biotechnological Applications. *In: Handbook for Azospirillum*. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 367–388.

DELAMUTA, J. R. M.; RIBEIRO, R. A.; MENNA, P.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. Multilocus sequence analysis (MLSA) of *Bradyrhizobium* strains: revealing high diversity of tropical diazotrophic symbiotic bacteria. **Brazilian journal of microbiology**, São paulo, v. 43, n. 2, p. 698–710, abr. 2012.

DIAS, A. C. R.; CARVALHO, S. J. P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Problemática da ocorrência de diferentes espécies de capim- colchão (*Digitaria* spp.) NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Planta Daninha**, Vçosa, v. 25, n. 2, p. 489–499, 2007.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas**. Rio de janeiro: Embrapa: Agrobiologia, 1995. 60 p. (Embrapa- Agrobiologia . Documentos, S/N).

DWIVEDI, S. L.; SAHRAWAT, K. L.; UPADHYAYA, H. D.; MENGONI, A.; GALARDINI, M.; BAZZICALUPO, M.; BIONDI, E. G.; HUNGRIA, M.; KASCHUK, G.; BLAIR, M. W.; ORTIZ, R. Advances in Host Plant and Rhizobium Genomics to Enhance Symbiotic Nitrogen Fixation in Grain Legumes. **Advances in Agronomy**, San diego, v. 129, p. 1–116, 2015.

ESCOBAR RODRÍGUEZ, C.; MITTER, B.; ANTONIELLI, L.; TROGNITZ, F.; COMPANT, S.; SESSITSCH, A. Roots and Panicles of the C4 Model Grasses *Setaria viridis* (L). and *S. pumila* Host Distinct Bacterial Assemblages With Core Taxa Conserved Across Host Genotypes and Sampling Sites. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 9, p. 2708, 12 nov. 2018.

FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; AIDAR, S. DE T.; MORGANTE, C. V.; GAVA, C. A. T.; ZILLI, J. É.; SOUZA, L. S. B. DE; MARINHO, R. DE C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; BRASIL, M. DA S.; SEIDO, S. L.; MARTINS, L. M. V. The resurrection plant *tripogon spicatus* (poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern brazilian caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Vçosa, v. 39, n. 4, p. 993–1002, 2015.

FLURY, P.; PÉCHY-TARR, M.; AELLEN, N.; DENNERT, F.; HOFER, N.; KUPFERSCHMIED, K. P.; KUPFERSCHMIED, P.; METLA, Z.; MA, Z.; SIEGFRIED, S.; WEERT, S.; BLOEMBERG, G.; HÖFTE, M.; KEEL, C. J.; MAURHOFER, M. Antimicrobial and Insecticidal: Cyclic Lipopeptides and Hydrogen Cyanide Produced by Plant-Beneficial *Pseudomonas* Strains CHA0, CMR12a, and PCL1391 Contribute to Insect Killing. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 8, n. 100, p.1-15, 2017.

FUKAMI, J.; LA OSA, C. DE; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. **Functional Plant Biology**, Clayton, v. 45, n. 3, 2018.

GARCIA, T. V.; KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Bactérias endofíticas como agentes de controle biológico na orizicultura. **Arquivos do Instituto Biológico**, São paulo, v. 82, n. 1, p. 1-9, 2015.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The Road Map to the Manual. *In: **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology***. New York, NY: Springer New York, 2001. p. 119–166.

GERMANO, M. G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F. L.; HUNGRIA, M. RFLP analysis of the rRNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from 33 legume species. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, Londres, v. 56, n. 1, p. 217–229, 2006.

GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, Jena, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014.

GLICK, B. R. Introduction to Plant Growth-promoting Bacteria. *In: **Beneficial Plant-Bacterial Interactions***. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 1–28.

GODOY, D.; RANDLE, G.; SIMPSON, A. J.; AANENSEN, D. M.; PITT, T. L.; KINOSHITA, R.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **Journal of clinical microbiology**, Northwest, v. 41, n. 5, p. 2068–79, 2003.

GONZALEZ, A. M.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. M.; ALBANO, R. M.; MENDONÇA-HAGLER, L.; MARTINS, O. B.; PARANHOS, R. Diversity of bacterial communities related to the nitrogen cycle in a coastal tropical bay. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 4, p. 3401–3407, 2012.

GUPTA, V. V. S. R.; KROKER, S. J.; HICKS, M.; DAVOREN, C. W.; DESCHEEMAER, K.; LLEWELLYN, R. Nitrogen cycling in summer active perennial grass systems in South Australia: Non-symbiotic nitrogen fixation. **Crop and Pasture Science**, Dordrecht, v. 65, n. 10, p. 1044–1056, 2014.

HAMMER, D. A. T.; RYAN, P. D.; HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis *Palaeontologia Electronica*. **Palaeontologia Electronica**, Amherst, v. 4, .n. 1: p. 1-9, 2001. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)

HARDOIM, P. R.; OVERBEEK, L. S. VAN; ELSAS, J. D. VAN. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Oxford, v. 16, n. 10, p. 463–471, 2008.

HIRSCH, P. R.; MAUHLIN, T. H. Who's who in the plant root microbiome? **Nature Biotechnology**, Nova iorque, v. 30, n. 10, p. 961–962, 2012.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V. **Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR**. Londrina:Embrapa: Soja 2008. 12 p. (Embrapa-Soja Documentos, 79).

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics.

**Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 221, p. 125–131, 1 abr. 2016.

HUNGRIA, M.; RIBEIRO, R. A.; NOGUEIRA, M. A. Draft genome sequences of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6, commercially used in inoculants for grasses and legumes in Brazil. **Genome Announcements**, v. 6, n. 20, 2018.

IBGE.. Censo Agropecuário 2006: Brasil, grandes regiões e unidades da federação. Rio de Janeiro: IBGE, 2009.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Produção da Pecuária Municipal. Rio de Janeiro: IBGE, 2017.

JI, S. H.; GURURANI, M. A.; CHUN, S. C. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars.

**Microbiological Research**, Jena, v. 169, n. 1, p. 83–98, 2014.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; SANTOS, J. C. P.; BERTON-JUNIOR, J. F.

Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 205–217, 2006.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome research**, Plainview, v. 5, n. 4, p. 408–18, 1995.

KUAN, K. B.; OTHMAN, R.; ABDUL RAHIM, K.; SHAMSUDDIN, Z. H. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. **Plos one**, São Francisco, v. 11, n. 3, p. e0152478, 2016.

LAMBAIS, M. R.; LUCHETA, A. R.; CROWLEY, D. E. Bacterial Community Assemblages Associated with the Phyllosphere, Dermosphere, and Rhizosphere of Tree Species of the Atlantic Forest are Host Taxon Dependent. **Microbial Ecology**, Nova Iorque, v. 68, n. 3, p. 567–574, 2014.

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**, Lausana, v. 8, n. JUL, p. 1–20, 2017.

LI, X.; LUO, L.; YANG, J.; LI, B.; YUAN, H. Mechanisms for Solubilization of Various Insoluble Phosphates and Activation of Immobilized Phosphates in Different Soils by an Efficient and Salinity-Tolerant *Aspergillus niger* Strain An2. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 175, n. 5, p. 2755–2768, 2015.

- LI, Y.; LIU, X.; HAO, T.; CHEN, S.; LI, Y.; LIU, X.; HAO, T.; CHEN, S. Colonization and Maize Growth Promotion Induced by Phosphate Solubilizing Bacterial Isolates. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 7, n. 1253, p. 1-16, 2017.
- LIRA, M. D. A.; CARNEIRO, A.; MELLO, L. DE; VIEIRA, M.; VIRGINIA, M.; CARLOS, J.; DUBEUX, B.; DE, M. Produção animal em pastagens tropicais da América Latina. Recife, v. 25, 2017.
- LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbial Ecology**, Nova iorque, v. 61, n. 3, p. 606–618, 2011.
- LYU, Y.; TANG, H.; LI, H.; ZHANG, F.; RENGEL, Z.; WHALLEY, W. R.; SHEN, J. Major Crop Species Show Differential Balance between Root Morphological and Physiological Responses to Variable Phosphorus Supply. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 7, n. 1939, p. 1-15, 2016.
- MA, B.; LV, X.; WARREN, A.; GONG, J. Shifts in diversity and community structure of endophytic bacteria and archaea across root, stem and leaf tissues in the common reed, *Phragmites australis*, along a salinity gradient in a marine tidal wetland of northern China. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, Dordrecht, v. 104, n. 5, p. 759–768, 2013.
- MARONICHE, G. A.; GARCÍA, J. E.; SALCEDO, F.; CREUS, C. M. Molecular identification of *Azospirillum* spp.: Limitations of 16S rRNA and qualities of *rpoD* as genetic markers. **Microbiological Research**, Jena, v. 195, p. 1–10, 2017.
- MARTIN, B.; HUMBERT, O.; CAMARA, M.; GUENZI, E.; WALKER, J.; MITCHELL, T.; ANDREW, P.; PRUDHOMME, M.; ALLOING, G.; HAKENBECK, R. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 20, n. 13, p. 3479–83, 1992.
- MARTINS, P. G. S.; JUNIOR, M. A. L.; FRACETTO, G. G. M.; SILVA, M. L. R. B. DA; VINCENTIN, R. P.; LYRA, M. DO C. C. P. DE. *Mimosa caesalpinifolia* rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, Nova York, v. 197, n. 3, p. 459–469, 2015.
- MCROSE, D. L.; BAARS, O.; MOREL, F. M. M.; KRAEPIEL, A. M. L. Siderophore production in *Azotobacter vinelandii* in response to Fe-, Mo- and V-limitation. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 19, n. 9, p. 3595–3605, 2017.
- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 29, n. 4, p. 315–332, 2006.
- MENNA, P.; PEREIRA, A. A.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, Dordrecht, v. 48, n. 1–3, p. 120–130, 2009.

- MOULIN, L.; BÉNA, G.; BOIVIN-MASSON, C.; STĘPKOWSKI, T. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the Bradyrhizobium genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 30, n. 3, p. 720–732, 2004.
- MUTAI, C.; NJUGUNA, J.; GHIMIRE, S. Brachiaria Grasses ( *Brachiaria spp.* ) harbor a diverse bacterial community with multiple attributes beneficial to plant growth and development. **Microbiology Open**, Hoboken, v. 6, n. 5, p.1-11, 2017.
- NIEHUS, R.; PICOT, A.; OLIVEIRA, N. M.; MITRI, S.; FOSTER, K. R. The evolution of siderophore production as a competitive trait. **Evolution**, Hoboken, v. 71, n. 6, p. 1443–1455, 2017.
- MENDES, G. O.;FREITAS, A. L.M.; PEREIRA, O.L.; SILVA, I. L.; VASSILEV, N. B.; COSTA, M. D. Mechanisms of phosphate solubilization by fungal isolates when exposed to different P sources. **Annals of Microbiology**, Nova York, v. 64, n. 1, p. 239–249, 2014.
- PATEL, J. K.; ARCHANA, G. Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from Poaceae plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 417, n. 1–2, p. 99–116, 2017.
- PEREIRA, C. N.; PORCIONATO, G. L.; NUNES DE CASTRO, C. **Aspectos socioeconômicos da região do matopiba**.IPEA, 2018. 59p.
- PERNAMBUCO. **Decreto estadual nº 45.165, de 25 de outubro de 2017**. Plano Estadual de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a consolidação de uma economia de baixa Emissão de carbono na Agricultura - Plano ABC Pernambuco. Disponível em: <http://legis.alepe.pe.gov.br/arquivoTexto.aspx?tiponorma=6&numero=45165&complemento=0&ano=2017&tipo=> Acesso em: 13 de novembro de 2017
- PUENTE, M. L.; GUALPA, J. L.; LOPEZ, G. A.; MOLINA, R. M.; CARLETTI, S. M.; CASSÁN, F. D. The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. **Symbiosis**, Dordrecht, v. 76, n. 1, p. 41–49, 2018.
- QIN, S.; XING, K.; JIANG, J.-H.; XU, L.-H.; LI, W.-J. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Nova York, v. 89, n. 3, p. 457–473, 2011.
- RATTRAY, J. The Grass Cover of Africa. v. 49, p. 168, 1960.
- REIS, V. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Isolation, Identification and Biochemical Characterization of *Azospirillum spp.* and Other Nitrogen-Fixing Bacteria. *In: Handbook for Azospirillum*. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 3–26.



RILLINGA, J. I.; ACUÑA, J. A.; NANNIPIERID, P.; CASSANE, F.; MARUYAMAC, F.; JORQUERAB, M. A. Current opinion on methods and perspectives for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 130, n.1, p. 205–219, 2019.

RODRÍGUEZ-BLANCO, A.; SICARDI, M.; FRIONI, L. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Nova York, v. 51, n. 3, p. 391–402, 2015.

ROSAS-CASTOR, J. M.; GUZMÁN-MAR, J. L.; HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; GARZA-GONZÁLEZ, M. T.; HINOJOSA-REYES, L. Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): A review. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 488–489, p. 176–187, 2014.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M. DEL; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, Jena, v. 183, p. 92–99, 2016.

SARKAR, A.; REINHOLD-HUREK, B. Transcriptional profiling of nitrogen fixation and the role of NifA in the diazotrophic endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. **Plos One**, São francisco, v. 9, n. 2, p. 12, 2014.

SHAO, J.; XU, Z.; ZHANG, N.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. **Biology and Fertility of Soils**, Nova York, v. 51, n. 3, p. 321–330, 2015.

SILVA, V. S. G. DA; SANTOS, C. E. DE R. E S.; FREITAS, A. D. S. DE; STAMFORD, N. P.; SILVA, A. F. DA; LYRA, M. DO C. C. P. DE; SANTOS, L. R. C.; FERREIRA, J. DA S. Symbiotic efficiency of native rhizobia in legume tree *Leucaena leucocephala* derived from several soil classes of Brazilian Northeast region. **Australian Journal of Crop Science**, Lismore nsw, v. 12, n. 03, p. 478–485, 2018.

SILVA, M. DE O.; FREIRE, F. J.; LIRA JUNIOR, M. A.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; COSTA, D. P. DA; LIRA-CADETE, L. Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 1113–1122, 2012.

SILVEIRA, A. P. D. DA; SALA, V. M. R.; CARDOSO, E. J. B. N.; LABANCA, E. G.; CIPRIANO, M. A. P. Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 107, p. 313–319, 2016.

SINGH, R. K.; SINGH, V.; VIVEKANANDA, M.; KRISHI, P.; SANSTHAN, A.; MEENA, R. K. Can we use Maize ( *Zea mays* ) Rhizobacteria as Plant Growth Promoter ? **International Journal of Plant Research**, Chicago, v. 28, n. 1, p. 86-99, 2015.

SOUZA, R. DE; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 4, p. 401–419, 2015.

STAMFORD, N. P.; FIGUEIREDO, M. V. B.; JUNIOR, S. DA S.; FREITAS, A. D. S.; SANTOS, C. E. R. S.; JUNIOR, M. A. L. Effect of gypsum and sulfur with *Acidithiobacillus* on soil salinity alleviation and on cowpea biomass and nutrient status as affected by PK rock biofertilizer. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 192, p. 287–292, 31 ago. 2015.

TAVARES, J. E. **Histórico de uso da pastagem de capim pangolão da Estação Experimental de Araripina do IPA**. LIRA JUNIOR, M. A. Araripina: IPA 2017

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 19, n. 24, p. 6823–31, 25 dez. 1991.

WOOD, J. L.; ZHANG, C.; MATHEWS, E. R.; TANG, C.; FRANKS, A. E. Microbial community dynamics in the rhizosphere of a cadmium hyper-accumulator. **Scientific Reports**, Londres, v. 6, n. October, p. 1–10, 2016.

### 3 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS NO CAPIM PANGOLÃO (*Digitaria eriantha* Stent)

#### RESUMO

As bactérias endofíticas podem promover crescimento em planta, reduzindo os custos de produção e os danos ambientais. O objetivo do trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a diversidade das bactérias promotoras de crescimento no capim pangolão (*Digitaria eriantha*). Foram coletadas amostras de colmo, folha, raiz e solo da gramínea em Araripina-PE, semiárido tropical brasileiro, nas estações secas e chuvosa com e sem calagem. As amostras foram submetidas à desinfestação superficial e isoladas nos meios semissólidos JMV, NFB e JNFB, para estimativa populacional e isolamento, seguida por caracterização morfofisiológica, avaliação dos índices de diversidade e selecionados representantes dos grupos para avaliar a diversidade molecular. Foram obtidos 316 isolados, formando 73 grupos de similaridade a 100% de similaridade. Foram selecionados representantes para análise de "fingerprint" por BOX-PCR e a 70% de similaridade todos os isolados foram distintos. Destes, foram sequenciados 68 isolados para gene rRNA16S. Os isolados foram classificados taxonomicamente ao filo (Proteobactérias, Actinobactérias e Firmicutes) e aos gêneros *Alcalinogenes*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Massilia*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Neocardoides*, *Stenotrptophomonas*, *Kocuria*, *Shinella*, *Pantoea*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*. O capim pangolão apresentou uma grande diversidade de bactérias endofíticas, afetada pelas condições edafoclimáticas, com maior diversidade na estação chuvosa e na área com calagem.

Palavras-chave: Bioprospecção. BPCP. Proteobactéria. Poaceae. *Digitaria eriantha*.

***Digitaria Eriantha* ENDOPHYTIC BACTERIA DIVERSITY****ABSTRACT**

Endophytic bacteria may promote plant growth, reducing costs and environmental damage. This work aimed to isolate, characterize and evaluate the diversity of plant growth promoting bacteria of *Digitaria eriantha*. Colm, leaves, roots and soil samples were collected in Araripina-PE, Brazilian tropical semiarid, at the dry and rainy seasons and soils limed or not. Samples were superficially disinfested and isolates were obtained from JMV, NFB and JNFB semisolid media for population estimates and isolation, followed by morphophysiological characterization, diversity index evaluation and selection of group representatives for molecular diversity. 316 isolates were obtained, forming 73 100% similarity groups. Representatives were selected from these for BOX-PCR fingerprinting, all of which differed at 70% similarity. 68 isolates were sequenced by the 16S rRNA gene. Isolates were classified to phylum (Proteobacteria, Actinobacteria and Firmicutes) and genera *Alcalinogenes*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Massilia*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Neocardoides*, *Stenotrptophomonas*, *Kocuria*, *Shinella*, *Pantoea*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas*. *Digitaria eriantha* had high endophytic bacteria diversity, affected by edaphoclimatic conditions, with higher diversity on the rainy season and limed area.

Keywords: Bioprospection. PGPB. Proteobacteria. Poaceae. *Digitaria eriantha*.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Existem cerca de 300.000 espécies de plantas, e cada espécie pode ser um hospedeiro para um ou mais micro-organismos endofíticos (CHEBOTAR et al., 2015). Estes micro-organismos podem fornecer compostos estruturalmente diversificados, com bioatividade pouco conhecida, podendo auxiliar no crescimento, desenvolvimento e proteção da planta contra estresses bióticos e abióticos. Sendo assim, os endofíticos podem ser utilizados na agricultura para reduzir custos pela diminuição do uso de fertilizantes industrializados com aumento da produtividade (CARVALHO et al., 2017).

As bactérias endofíticas têm sido isoladas e caracterizadas de diversos gêneros da família Poaceae (*Oryza sativa*, *Brachiaria*, *Pennisetum glaucum*, *Sorghum bicolor*, *Triticum* spp e *Zea mays*, .) e utilizadas como inoculantes (SILVA et al., 2012; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016; PATEL; ARCHANA, 2017). O capim pangolão (*Digitaria eriantha* Stent) é uma gramínea tropical, distribuídas em diferentes biomas, resistente a seca (RATTRAY, 1960; DIAS et al., 2007; COOK; SCHULTZE-KRAFT, 2015; ARAUJO et al., 2017). Desta forma, agroecossistemas complexos, são escrito com potencial de ter alta diversidade de micro-organismos nativos, onde a atividade, abundância e composição das populações bacterianas são moduladas por diversos fatores bióticos e abióticos (RILLINGA et al., 2019).

Desta forma, a avaliação da diversidade das comunidades de bactérias endofíticas em diferentes ambientes permite avaliar o efeito ambiental sobre estas comunidades separadamente do efeito genotípico da planta, que normalmente é bastante importante na promoção de crescimento em gramíneas (DWIVEDI et al., 2015; RODRÍGUEZ-BLANCO; SICARDI; FRIONI, 2015; SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015; SANTOYO et al., 2016).

Sendo que os estudos para avaliar biodiversidade de bactérias endofíticas, por diferentes formas e diversos índices de diversidade., como, por exemplo, o índice de diversidade de Shannon-Weaver (H), Simpson 1 H, equitabilidade (J), de dominância (D), de riqueza (Margalef) e riqueza estimada (Chao 1)(HARPER, 1999).

Como também, tem sido utilizada a técnica de BOX - PCR, que consiste na determinação do perfil de DNA após a amplificação com *primers* relacionados a regiões repetitivas e conservadas do DNA, possibilitando a avaliação da diversidade bacteriana (MENNA et al., 2009; SANTOS et al., 2014; MARTINS et al., 2015; ANTUNES et al., 2017). Para identificação filogenética das bactérias, o gene 16S

rRNA tem sido utilizado como marcador molecular (GONZALEZ et al., 2012; HIRSCH; MAUCLINE, 2012). Desta forma, objetivo do trabalho foi isolar, caracterizar e avaliar a diversidade das bactérias endofíticas no capim pangolão.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Amostragem

A amostragem foi realizada na estação experimental do Instituto Agronômico de Pernambuco – IPA, Araripina, situado na mesorregião do Sertão de Pernambuco (Figura 1) em área cultivada com capim pangolão (*Digitaria eriantha* Stent) sem calagem ou adubação de cobertura há um mínimo de 30 anos (TAVARES, 2017).



**Figura 1** – Localização do Nordeste brasileiro com recorte do estado de Pernambuco, e ênfase para Araripina situada na mesorregião do Sertão

Foram realizadas duas coletas em Dezembro/2016 (estação seca) e Março/2017 (estação chuvosa). Nesta última, parte da área recebeu calagem, sendo realizadas amostras nas áreas com e sem calagem. Para cada amostra, foram coletadas 10 amostras simples, em um transecto, com solo aderido às raízes, nas estações seca sem calagem e chuvosa com e sem calagem (Tabela 1) com duas amostras compostas por ambiente. Além disso, as amostras de solo foram coletadas para caracterização química do solo na camada 0-20 cm.

**Tabela 1** – Amostragens em pastagens de pangolão (*Digitaria eriantha*) nas mesorregiões do Sertão (Araripina), de Pernambuco

Local de Amostragem	Amostragem	Estação	Calagem	Coordenadas geográficas
Araripina	Dezembro	Seca	Sem	7° 27' 42.82" S
			Sem	40° 25' 12.71" O
	Março	Chuvosa	Com	7° 27' 48".25" S
			Com	40° 25' 16.11" O

A caracterização química do solo foi realizada pelo Laboratório de Química do Solo do IPA, de acordo com a metodologia da EMBRAPA (CESAR, 2009) (Tabela 2).

**Tabela 2** – Características químicas do solo da área experimental.

<b>SEM CALAGEM</b>		<b>pH</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Al</b>	<b>Na</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>H+Al</b>
<b>Estação</b>	<b>Profundidade/cm</b>	<b>(água)</b>						<b>mg</b>	<b>cmolc</b>
		<b>1 : 2,5</b>	<b>cmolc dm-3</b>					<b>dm-3</b>	<b>dm-3</b>
Seca	0-20	5,50	2,00	1,60	0,10	0,03	0,10	3	3,71
<b>COM CALAGEM</b>		<b>pH</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>Al</b>	<b>Na</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>H+Al</b>
<b>Estação</b>	<b>Profundidade/cm</b>	<b>(água)</b>						<b>mg</b>	<b>cmolc</b>
		<b>1 : 2,5</b>	<b>cmolc dm-3</b>					<b>dm-3</b>	<b>dm-3</b>
Chuvosa	0-20	6,40	2,30	1,20	0,00	0,03	0,12	2	1,73

### 3.2.2 Análise da diversidade das bactérias endofíticas

#### 3.2.2.1 Desinfestação, isolamento e caracterização morfofisiológica das bactérias diazotróficas

As amostras foram separadas em folhas, colmo e raízes, desinfestadas de acordo com Barreto et al. (2018). Sendo que as folhas e colmos foram lavados em água corrente, secos em papel toalha e desinfestado superficialmente, através do uso de algodão embebido em álcool 70%, quebrando a tensão superficial. As raízes foram lavadas em água corrente para a retirada dos resíduos de solo não liberados pela agitação manual e cortadas em pedaços de aproximadamente 10cm. As raízes foram desinfestadas com álcool a 70% durante 30 segundos, lavados com hipoclorito de sódio (2,5%) por 1 min sob agitação e com água autoclavada por cinco vezes.

Após a desinfestação, as amostras foram lavadas em água destilada autoclavada e secas com papel toalha. De cada parte da planta, foram pesados 10g e trituradas em 90 mL de solução salina (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995), caracterizando assim a primeira diluição  $10^{-1}$ , com três repetições. Foram feitas diluições de  $10^{-2}$  até  $10^{-7}$  em tubos com 9 mL da mesma solução. Alíquotas de 0,1 mL dos extratos diluídos foram inoculados em triplicata em frascos tipo penicilina contendo 5 mL dos meios semissólidos NFB, JNFB e JMV, descritos por Döbereiner, (1999).

Os frascos foram incubados a 35 °C por 72-96 h em estufa bacteriológica, e determinado o número mais provável de bactérias pela tabela de McCrady. Nos casos em que houve a formação de película, foi feita a repicagem para meio semissólido de

origem e seguido por caracterização fenotípica de colônias isoladas.

A caracterização morfológica foi realizada no meio solido 79 utilizado por Reis et al. (2011), e foram avaliados a modificação do pH no meio de cultura (ácido, neutro e alcalino); produção ou não de muco; bordas, cores e tamanho das colônias (MELLONI et al., 2006) com os dados transformados em binários (1 – positivo e 0 – negativo), e realizado agrupamento pelo algoritmo de grupos pareados e com Índice de Jaccard, utilizando o programa PAST 2.17c (HAMMER et al., 2001).

Foi realizado o agrupamento dos isolados obtidos, ao nível de 100% de similaridade. Nos quais foram calculados os índices de diversidade e escolhidos 80 isolados de forma que se manteve a representatividade do grupo e condições de isolamento para etapas posteriores de estudo. Foram adotados os seguintes índices:

1. Índice de Shannon. (H) Um índice de diversidade, tendo em conta o número de indivíduos, bem como o número de estirpe. Varia de 0 para comunidades com apenas uma única estirpe a valores altos para comunidades com muitos táxons, cada um com poucos indivíduos.

$$\sum_{i=1}^s \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

Onde: N é número total de indivíduos e  $n_i$  é o número de indivíduos da estirpe.

2. Dominância (D)= índice de 1-Simpson. mede a probabilidade de que dois indivíduos escolhidos aleatoriamente de uma amostra pertencerão à mesma estirpe, com valor de D varia entre 0 e 1. Com este índice, 0 representa diversidade infinita, com todas as estirpes estão igualmente presentes e 1, sem diversidade, uma estirpe domina completamente a comunidade.

$$D = \sum \left(\frac{n}{N}\right)^2$$

Onde: n = número total de organismos de uma determinada estirpe e N = número total de indivíduos de todas as estirpes

3. Índice Simpson 1-D. O valor deste índice também varia entre 0 e 1, mas agora, quanto maior o valor, maior a diversidade da amostra. Nesse caso, o índice representa a probabilidade de que dois indivíduos selecionados aleatoriamente de uma amostra pertencerão a espécies diferentes. Observa-se confusão na literatura: o índice de dominância e Simpson são frequentemente confundidos.

$$1 - D = 1 - \sum \left(\frac{n}{N}\right)^2$$



Onde:  $n$  = número total de organismos de uma determinada espécie e  $N$  = número total de organismos de todas as espécies

4. Equitabilidade ( $J$ ). Diversidade de Shannon dividida pelo logaritmo do número de taxa. Isso mede a uniformidade com a qual os indivíduos são divididos entre os táxons presentes. Seu valor apresenta uma amplitude de 0 (uniformidade mínima) a 1 (uniformidade máxima)

$$J = \frac{H'}{\ln S}$$

Onde:  $H'$  diversidade de Shannon e  $S$  número total de espécies amostradas.

5. Índice de riqueza de Margalef:

$$Margalef = \frac{(S - 1)}{\ln n}$$

Onde:  $S$  é o número total de espécies amostradas, e  $n$  é o número de indivíduos.

6. Chao1: Estimativa da riqueza total de espécies.

$$Chao\ 1 = \frac{S + F1(F1 - 2)}{(2(F2 + 1))}$$

Onde:  $S$  é o número total de espécies amostradas.  $F1$  é o número de espécies únicas e  $F2$  o número de espécies duplicadas.

### 3.2.3 Avaliação da diversidade genética

#### 3.2.3.1 Extração do DNA genômico total dos isolados

Os isolados foram cultivados em 5,0 mL do meio de cultura Tryptic Soy Broth - TSB e incubados a 30 °C, em mesa agitadora, a 180 rpm por 72 h. Após esse período, uma alíquota de 2,0 mL da suspensão de células foi transferida para microtubos de 2,0 mL, sendo centrifugados por 2 min a 12.000x g. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e com o precipitado foi realizada a extração do DNA, utilizando-se o Kit MiniPrep (Axygen), conforme instruções do fabricante. Após a extração do DNA dos isolados, sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8%, 100 V por 30 min. Após a extração, o DNA de cada isolado foi quantificado em NanoDrop 2000c da Thermo científica e concentração do DNA de trabalho foi padronizada em 20-30 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$ . As amostras de DNA genômico foram armazenadas a -20 °C.

### 3.2.3.2 BOX-PCR

Para amplificação do elemento BOX, foi utilizado o oligonucleotídeo BOX-A1 (5'-GTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3') sintetizado pela Invitrogen™ (Life Technologies). A reação de amplificação com volume final de 25,0 µL foi a seguinte: 10% Tampão 10X; 0,2 mM dNTPs; 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 µM 0,3 U de Taq DNA polimerase platinum; DNA molde (20-30 ng. µL<sup>-1</sup>). As condições de amplificação foram ajustadas de Freitas et al. (2007): um ciclo de desnaturação inicial a 95 °C por 9 min, 30 ciclos de desnaturação (1 min, a 94 °C), anelamento (1 min, a 55 °C) e extensão (5 min, a 72 °C), um ciclo de extensão final a 72 °C por 10 min. Todas as reações foram realizadas no termociclador 2720 da Applied Biosystems.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese, contendo tampão TBE 0,5X a 100 V, durante 360 min em géis de agarose a 1,2 %, corados com SybrGold (Sigma) e fotografados em fotodocumentador LPIX-HE da Locus do Brasil.

Confirmou-se a amplificação para 69 isolados. Para estes um dendrograma foi construído usando o programa Geljv2 empregando o coeficiente de Jaccard algoritmo UPGMA ( método do grupo de pares não ponderados com média aritmética) (HERAS et al., 2015; DELAMUTA et al., 2017) a 70% de similaridade.

### 3.2.3.3 Amplificação, sequenciamento do gene 16S rRNA dos isolados

Representantes de cada grupo formado pelo agrupamento do BOX-PCR, , foram sequenciados. O DNA foi amplificado com os iniciadores para os genes rRNA 16S usando os primers Universal 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'TACGGTTAACCTT GTTACGACTT-3').

A reação de amplificação com um volume final de 50 µL foi: 2 µL de DNA (20-30 ng. µL<sup>-1</sup>), 1,5 µL de MgCl<sub>2</sub>, 5,0 µL tampão 10X para PCR, 1,0µL dNTP's, 2,0 µL de cada primer (27F e 1492R), 0,6 µL de Taq DNA Polimerase platinum e água Mili-Q para completar a reação. A reação de amplificação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial de 94°C, por 3 min, 30 ciclos de desnaturação (94 °C, por 45 segundos), anelamento (56°C, por 30 segundos), extensão (72 °C, por 2 min) e uma extensão final de 72°C, por 7 min. Os produtos amplificados foram avaliados em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV. Os produtos da PCR foram enviados para Macrogen, Coréia do Sul, para purificação e sequenciamento.

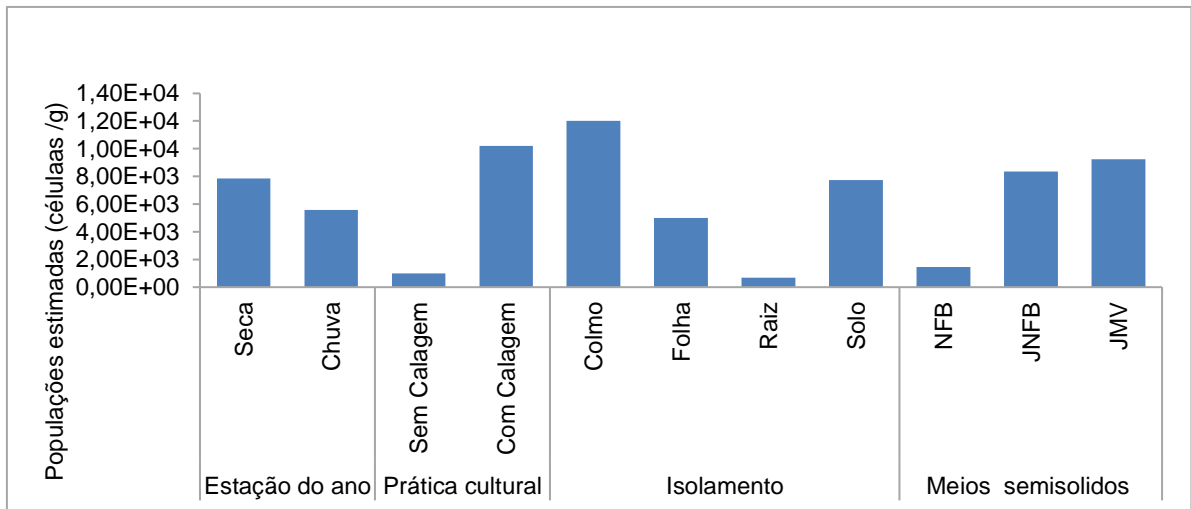
As sequências obtidas foram comparadas ao banco de dados do NCBI. Para a

determinação da identidade molecular, as sequências dos produtos da PCR dos isolados foram, individualmente, submetidas à análise de similaridade pelo algoritmo MEGABLAST (sequências altamente similares). Para os isolados que não tiveram alta similaridade utilizou o algoritmo BLASTn (sequências parecidas). As mesmas sequências foram então analisadas comparativamente quanto à porcentagem de identidade molecular, empregando-se o método de múltipla progressão de Clustal W (THOMPSON et al., 1999) pelo programa MEGA7.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Software Version 7). Para determinar o valor de similaridade e a matriz de distância foi utilizado o método de junção de vizinhos Juke-Cantor, para construir árvores gênicas das sequências concatenadas para cada isolado (KUMAR et al., 2018). A significância da ramificação dentro das árvores foi avaliada pela análise bootstrap de 1.000 repetições geradas por computador. As sequências que não apresentaram alta similaridade não foram incluídas na árvore filogenética.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Avaliação das populações de bactérias endofíticas na *Digitaria eriantha*

Foram encontradas populações endofíticas em todas as condições (com calagem/sem calagem, estação seca/estação chuvosa, e nas diferentes partes das plantas (colmo, folha e raiz) nos meios semissólidos NFB, JNFB e JMV. A densidade populacional foi maior nas na estação seca, na área que recebeu calagem, no colmo e usando os meios JMV e NFB, variando de  $6,7 \times 10^2$  a  $1,2 \times 10^4$  células por grama da parte utilizada (colmo, folha, raiz e solo) (Figura 2). De forma geral, a densidade bacteriana obtida neste estudo assemelha-se aos trabalhos de Verma et al. (2014), em que foi observada uma densidade de  $1,0 \times 10^6$  de bactérias isoladas de trigo no meio NFB, e Santos et al. (2013), observando uma densidade bacteriana em capim *Andropogon* de  $45,0 \times 10^3$ , em Tanzânia de  $0,9 \times 10^3$  e em capim *Buffel* de  $11,5 \times 10^3$ .



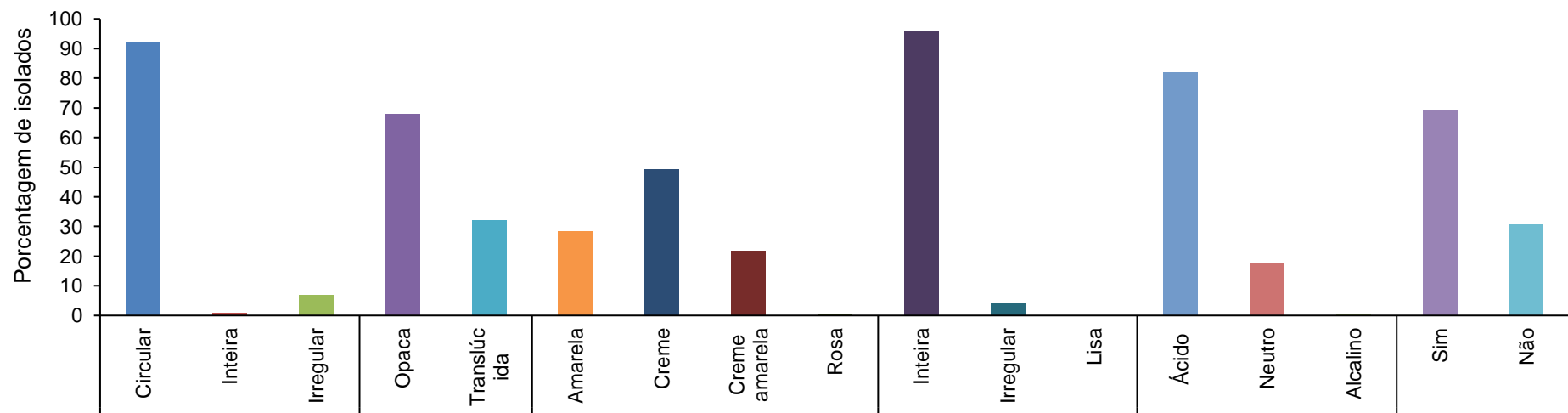
**Figura 2** – Populações endofíticas de *Digitaria eriantha* em Araripina, PE, considerando o efeito de diferentes épocas de amostragem, prática cultural da calagem apenas na época chuvosa, de diferentes partes de planta e de meios semissólidos

Foram obtidos 316 isolados obtidos no período chuvoso, nas áreas com adição de calagem, no colmo e utilizando o meio semissólido JNFB, quando comparados entre si, em cada condição de isolamento, com probabilidade de não ter sido devido ao acaso (Tabela 3). No trabalho de Silva et al. (2013), as amostras coletadas na estação chuvosa apresentaram uma maior população microbiana do que na estação seca. Resultado similar a este trabalho, que a maior densidade de isolados na estação seca e na área com calagem. Segundo Silva et al. (2013), a densidade populacional pode estar relacionada as mudanças no solo que afetaram as populações microbianas nativas, tais como variações sazonais na umidade e pH do solo que podem levar a mudanças nos padrões de distribuição das espécies microbianas, sendo que as bactérias preferem condições neutras a alcalinas.

**Tabela 3** – Números de isolados na *Digitaria eriantha* em Araripina, PE, considerando o efeito de diferentes épocas de amostragem, da calagem apenas na época chuvosa, de diferentes partes de planta e de meios de cultura

Condição	Número de isolados	Porcentagem	$\chi^2$
<b>Efeito da estação, para a área sem calagem</b>			
Seca	131	41,59	0,12057
Chuva	184	58,41	
<b>Efeito da calagem, para a estação chuvosa</b>			
Com Calagem	102	55,74	0,00282
Sem Calagem	81	44,26	
<b>Efeito da parte usada para isolamento, desconsiderando os demais fatores</b>			
Colmo	162	51,43	6,6x10 <sup>-36</sup>
Folha	62	19,68	
Raiz	79	25,08	
Solo	12	3,81	
<b>Efeito do meio de isolamento, desconsiderando os demais fatores</b>			
JMV	26	8,25	2,2x10 <sup>-26</sup>
JNFB	168	33,33	
NFB	121	38,41	
LGI	-	-	

95% dos isolados apresentaram forma circular, 67% opaca, predominância das cores creme e creme com amarelo, respectivamente, 49% e 21% e forma da borda inteira 90%, 87% dos isolados acidificaram o meio de cultura e 69% dos isolados produziram muco (Figura 3). Características fenotípicas semelhante foi encontrado no trabalho de Ehrhardt-Brocardo et al. (2015), com isolados no formato circular e borda lisa, colônias opacas e translúcidas, com presença de muco e a maioria acidificaram o meio. No trabalho de Sahoo et al. (2014) e Carneiro et al. (2013), eles também encontram bactérias com colônias circulares, rosa, branco, amarelo e produtoras de muco, sendo que as características fenotípicas sobressai a depender do local isolado.



**Figura 3** – Porcentagem de isolados por características morfofisiológicas avaliadas nos isolados de *Digitaria eriantha* em Araripina, PE

### 3.3.2 Avaliação da diversidade fenotípica das bactérias endofíticas

O agrupamento com todos os 316 isolados revelou a formação de 73 grupos com similaridade de 100%, variando 1 a 55 isolados por grupo. Os que apresentaram maior número de isolados foram os grupos 34, 2, 3, 28, 17 e 40, apresentando, respectivamente, 55, 26, 20, 28, 13 e 12 isolados, representando conjuntamente 44% dos isolados.

Os grupos formados demonstram alta diversidade fenotípica das bactérias presentes na pastagem com a *Digitaria eriantha*, em Araripina. Como pode ser observado na Tabela 4, o índice de diversidade de Shannon (H) total foi 3,58. Este resultado converge com o índice de dominância (D), que apresentou valores próximos de zero, indicando baixa dominância entre as estirpes encontradas.

O índice de Simpson (1-D), apresentou valores próximo a 1, demonstrado que os isolados selecionados aleatoriamente são distintos. Refletindo no índice de equitabilidade (J) e Riqueza (Margalef), respectivamente, mostrou alta uniformidade e riqueza.

**Tabela 4** – Avaliação da diversidade fenotípica de isolados endofíticos em capim pangolão, comparando os efeitos de local, época, parte da planta e calagem sobre medidas de diversidade

Ambiente de isolamento	Grupos	Isolados	Dominance _D	Simpson_1 -D	Shannon _H	Margalef	Equitability _J	Chao -1	
Diversidade geral									
Total	73	316	0,05424	0,9458	3,581	12,51	0,8346	104,1	
Estação em Araripina									
Seca	53	131	0,03852	0,9615	3,623	10,67	0,9124	82,55	
chuva	49	185	0,08675	0,9133	3,12	9,195	0,8017	68,46	
Partes de isolamento									
Colmo	52	163	0,0635	0,9365	3,378	10,01	0,855	73,23	
Folha	26	62	0,08169	0,9183	2,869	6,057	0,8805	43,5	
Raiz	34	79	0,06137	0,9386	3,136	7,552	0,8893	55,11	
Solo	10	12	0,125	0,875	2,21	3,622	0,9599	46	
Calagem na amostragem da estação chuvosa em Araripina									
Chuva	Com calagem	35	104	0,09708	0,9029	2,962	7,321	0,8331	48,6
	Sem calagem	30	81	0,08794	0,9121	2,871	6,599	0,844	125
Meio de cultura									
JMV	18	26	0,08284	0,9172	2,715	5,218	0,9394	48,33	
JNFB	53	168	0,0479	0,9521	3,493	10,15	0,8799	78,09	
NFB	44	122	0,07256	0,9274	3,236	8,951	0,855	65	

A diversidade (Shannon) no solo foi menor do que para folha, colmo ou raiz (Tabela 4). Entre os meios, a diversidade no JMV foi menor do que o meios JNFB e NFB. A diversidade na área sem calagem foi menor que a área com calagem. Por fim, na estação chuvosa foi menor do que a estação seca. Consequentemente aumentou o índice de dominância (D), diminuíram o índice de Simpson (1-D), uniformidade e índice de riqueza Margalef. Resultados de diversidade e equitabilidade foram encontrados com índices semelhantes por Verma et al. (2014) e Qu et al. (2016), e por Lambais et al. (2014), para o índice de diversidade.

A análise dos índices de diversidade demonstrou que quanto maior a riqueza específica encontrada, menores tendem a ser os valores de dominância (D). Segundo Biondi e Bobrowski (2014), o comportamento contraditório entre os índices de Margalef e dominância (D) é um fato esperado, tendo em vista que quanto maior a riqueza de espécies de uma comunidade, menor tende a ser a dominância de uma espécie em particular. Neste mesmo sentido, o índice de Simpson (1-D) mediu a probabilidade de ter isolados estirpes diferentes. Resultados semelhante foram verificados no trabalho de Verma et al. (2014), para os índices de diversidade dos isolados associados ao trigo, selecionados em cinco locais na zona central da Índia.

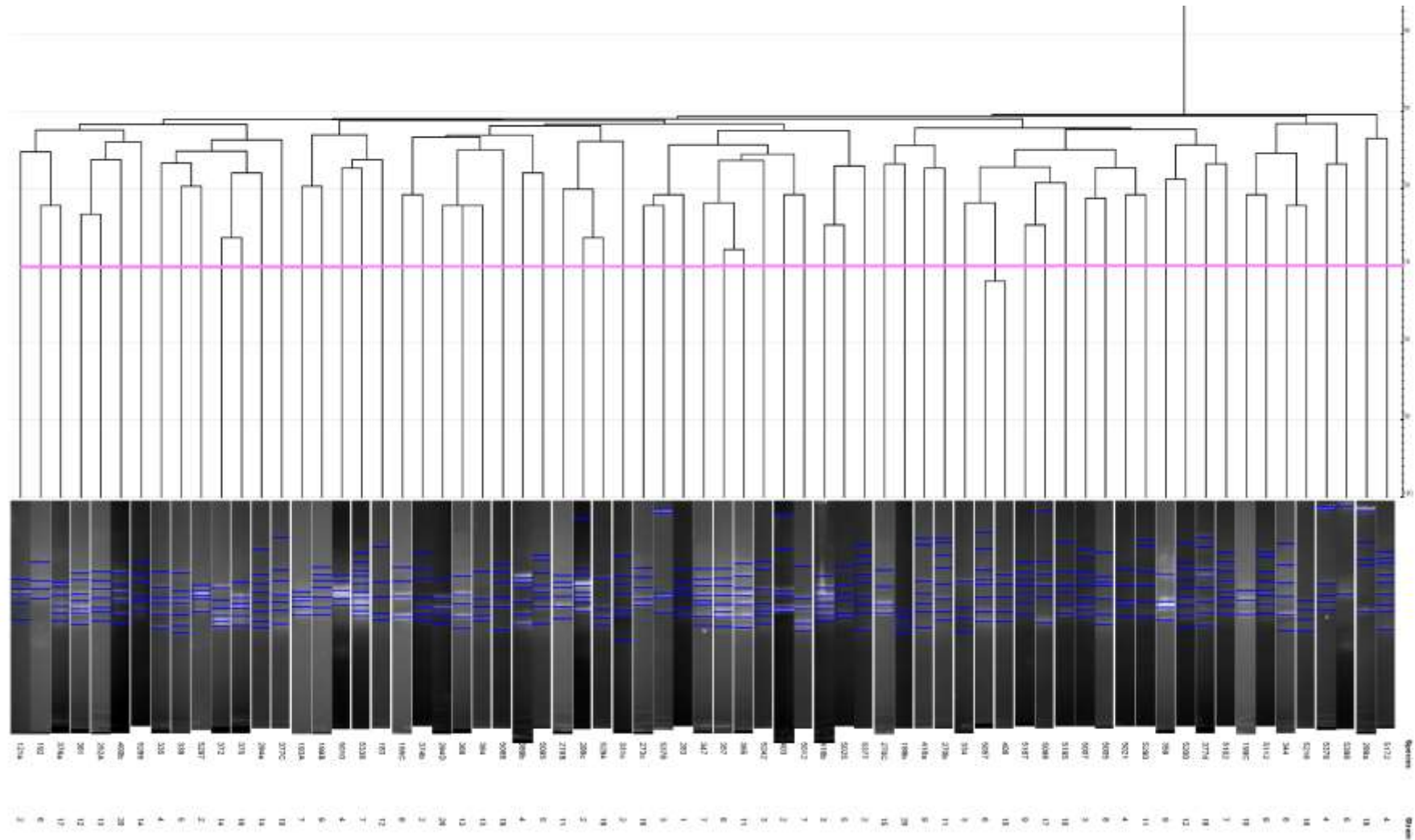


A riqueza estimada pelo índice de Chao1 demonstrou que apenas na área com calagem, a riqueza isolada foi próxima da riqueza estimada (Tabela 4). Este fato pode estar relacionado com o método utilizado por este trabalho, que é dependente de cultivo e meios seletivos, embora Lambais et al.(2014), mesmo com a técnica de sequenciamento, também não tenha identificado toda a diversidade bacteriana estimada por Chao1, fato relacionado a complexidade dos micro-organismos.

### **3.3.3 Diversidade genotípica dos isolados selecionados pela amplificação do elemento BOX**

Dos 80 isolados, 67 amplificaram com o oligonucleotídeo BOX-A1, que apresentou boa eficiência na produção de bandas polimórficas, conseguindo assim, diferenciar os isolados. Neste estudo, os perfis de banda possibilitaram a formação de um dendograma com 67 padrões de bandas distintos, com corte de 70% de similaridade.

Considerando-se que cada padrão de bandas representa um isolado, a análise por BOX-PCR mostrou perfis de banda bastante diversificados, com pesos moleculares variando de 100 a 4500 pb (Figura 4) e o agrupamento entre os mesmos apontando uma possível diversidade entre os isolados



**Figura 4** – Dendrograma obtido pelo agrupamento realizado pelo algoritmo UPGMA, a partir da matriz de similaridade genética usando o oligonucleotídeo BOX-AIR de 56 isolados bacterianos associados à similaridade genética usando o oligonucleotídeo BOX-AIR de 67 isolados bacterianos associados *D. eriantha*

### 3.3.4 Amplificação e Sequenciamento do gene 16S rRNA ribossomal

A amplificação do gene 16S rRNA gerou fragmentos de aproximadamente 1.500 pb. Aproximadamente 73 % (49) dos isolados apresentaram identidade acima de 97% com uso do algoritmo MEGABLAST (Tabela 5), enquanto oito isolados apresentaram identidade inferior a 97% e não foi possível encontrar gêneros altamente similares para outros dez isolados. Desta forma, utilizou o algoritmo BLASTn, com isolados apresentando identidade entre 67-86%, valores que estão em negrito na Tabela 5. Estes isolados, foram parecidos com os gêneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Shingomonas*, *Stenotrophomonas* e dois isolados de bactérias sem nenhuma semelhança com as catalogadas no GenBank. Desta forma, faz se necessário utilizar outros genes *housekeeping* para sua identificação no nível da espécie (DELAMUTA et al., 2017).

Foram identificados 4 filos, 5 classes, 10 ordens, uma subordem, 15 famílias e 20 gêneros diferentes de bactéria (Tabela 6), de acordo com LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature)(ADNAN et al., 2016; PARTE, 2018). Foi encontrada dominância para  $\gamma$ -proteobacteria (48%) e  $\alpha$ -proteobacteria (31%), comparável àquela relatada para as bactérias endofíticas de *Zea*, *Brachiaria* e *Setaria* (GARCÍA-SALAMANCA et al., 2013; MUTAI; NJUGUNA; GHIMIRE, 2017; RODRÍGUEZ et al., 2018). Sendo que comunidade  $\gamma$ -proteobactéria apresentou maior número de representantes, como foi observado por García-salamanca et al. (2013). Segundo os mesmos, a comunidade responde quimiotaticamente a exsudatos e são eficientes na utilização destes produtos. Em contrapartida, possuem mecanismos capazes de disponibilizar nutrientes inorgânicos para as plantas, favorecendo o crescimento e, em seguida, podendo ser observado o benefício comum da interação.

As classes foram encontradas em todas as condições de isolamento, colmo folha, raiz e solo, área com calagem e sem, nas estações chuvosa e seca e nos meios JMV, JNFB e NFB. A classe  $\gamma$ -proteobactéria apresentou representantes dos gêneros *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Stenotrophomonas*. Já para  $\alpha$ -proteobactéria foram identificados os gêneros *Massilia*, *Beijerinckia*, *Rhizobium* e *Shinella* (Tabela 6). Sendo que, colmo, folha e raiz apresentaram maior número de gêneros que o solo rizosférico (Figura 5). O *Rhizobium* e *Enterobacter* foram isolados em todas as condições de isolamento (Figura 5).

Os gêneros mais abundantes foram *Rhizobium* com 12 (17%) representantes,

*Enterobacter* com 11 (16 %), *Stenotrophomonas* com oito isolados (11 %), *Pseudomonas* com seis (8%) e *Shinella* e *Pantoea* com cinco isolados (7%) cada (Figura 5). Estes resultados foram similares aos relatados por Mutai; Njuguna e Ghimire (2017) que isolaram bactérias endofíticas da folha, raiz e solo da *Brachiaria*, com *Pseudomonas*, *Pantoea* e *Acinetobacter* sendo mais frequentes.

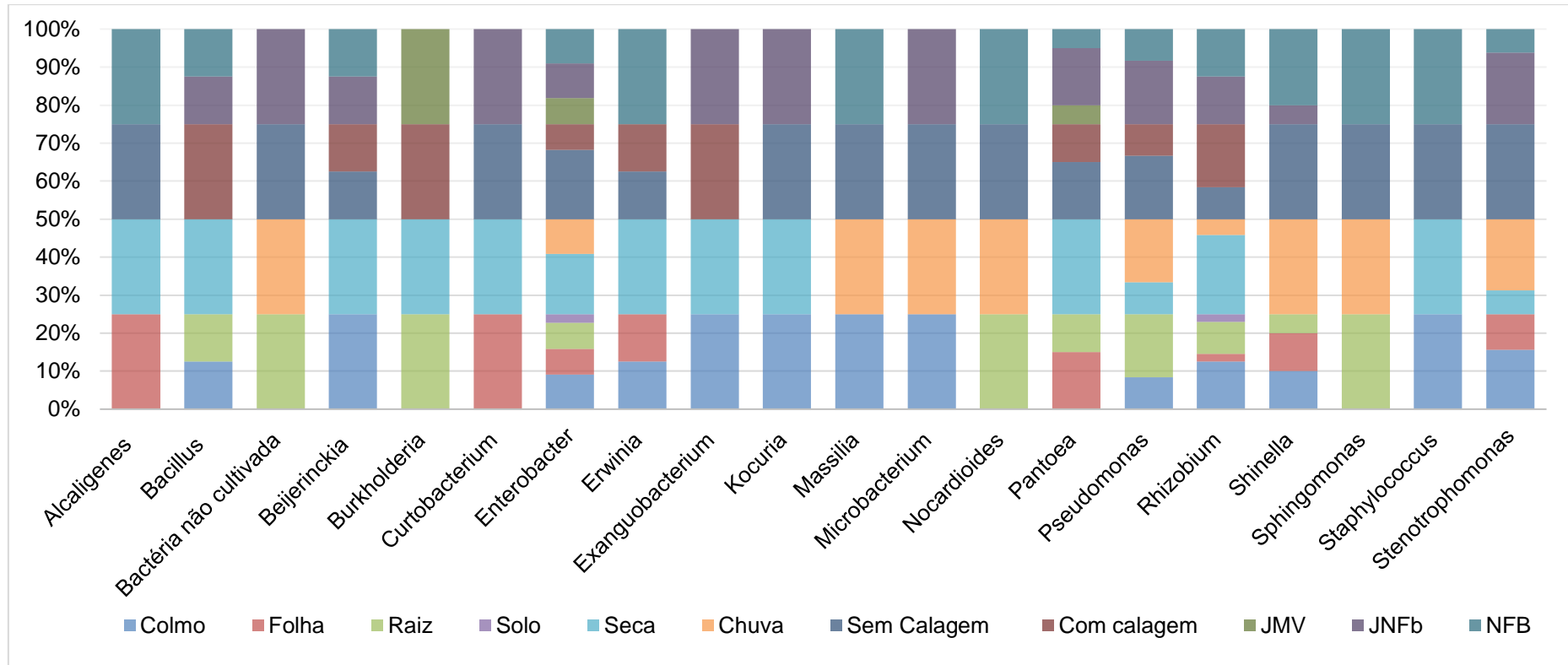


Figura 5 – Porcentagem de gêneros bacterianos do capim pangolão, isolados na pastagem do Nordeste brasileiro

**Tabela 5** – Identidade dos isolados endofíticos de colmo, folha, raiz e solo, na área com calagem e sem, nas estações seca e chuvosa, nos meios JMV, JNFB e NFB do capim pangolão, com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa Blast no GenBank

(Continua)

Isolado	Condição de isolamento				Pares de bases	Score	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	Descrição	Sequências mais similares no banco de dados
192C	Seca	NFB	Folha	Sem calagem	1143	1999	98%	0	99%	<a href="#">EF397580.1</a>	<i>Alcaligenes sp.</i>
<b>270B</b>	<b>Seca</b>	<b>JNFB</b>	<b>Colmo</b>	<b>Com calagem</b>	<b>1216</b>	<b>163</b>	<b>26%</b>	<b>1,00E-35</b>	<b>76%</b>	<b><a href="#">AY630336.1</a></b>	<b><i>Bacillus licheniformis</i></b>
357 <sup>a</sup>	Seca	NFB	Raiz	Com calagem	1131	1997	99%	0	99%	<a href="#">AB533704.1</a>	<i>Bacillus sp.</i>
<b>5289</b>	<b>Chuvosa</b>	<b>JNFB</b>	<b>Raiz</b>	<b>Sem calagem</b>	<b>1100</b>	<b>78,8</b>	<b>28%</b>	<b>4,00E-10</b>	<b>68%</b>	<b><a href="#">EU181793.1</a></b>	<b><i>bactéria não cultivada</i></b>
183C1	Seca	NFB	Colmo	Sem calagem	1016	1749	99%	0	98%	<a href="#">MF319858.1</a>	<i>Beijerinckia fluminensis</i>
344B1B	Seca	JNFB	Colmo	Com calagem	1164	1988	97%	0	98%	<a href="#">MK064217.1</a>	<i>Beijerinckia fluminensis</i>
372B	Seca	JMV	Raiz	Com calagem	1223	1978	93%	0	98%	<a href="#">KX859146.1</a>	<i>Burkholderia sp.</i>
294D	Seca	JNFB	Folha	Sem calagem	1212	2013	99%	0	97%	<a href="#">FR872429.1</a>	<i>Curtobacterium sp.</i>
121 <sup>a</sup>	Seca	JMV	Solo	Com calagem	1084	1792	99%	0.0	97%	<a href="#">JQ659621.1</a>	<i>Enterobacter asburiae</i>
288C	Seca	JNFB	Colmo	Sem calagem	1035	1469	93%	0	95%	<a href="#">JN228093.1</a>	<i>Enterobacter cloacae</i>
5068	Chuvosa	NFB	Folha	Sem calagem	1107	1932	99%	0	98%	<a href="#">KJ950709.2</a>	<i>Enterobacter cloacae</i>
193 <sup>a</sup>	Seca	NFB	Folha	Sem calagem	1064	1906	99%	0.0	99%	<a href="#">KT441068.1</a>	<i>Enterobacter cloacae</i>
374B	Seca	JMV	Raiz	Com calagem	1183	2117	99%	0	99%	<a href="#">MH767079.1</a>	<i>Enterobacter não cultivado sp</i>
377C	Seca	JNFB	Folha	Sem calagem	1204	2045	99%	0	98%	<a href="#">MH767079.1</a>	<i>Enterobacter não cultivado sp</i>
400B	Seca	NFB	Colmo	Sem calagem	1153	2021	99%	0	98%	<a href="#">MH767047.1</a>	<i>Enterobacter não cultivado sp</i>
5338	Chuvosa	JMV	Colmo	Sem calagem	1081	1864	99%	0	98%	<a href="#">KC236475.1</a>	<i>Enterobacter sp.</i>
<b>5072</b>	<b>Chuvosa</b>	<b>JNFB</b>	<b>Colmo</b>	<b>Sem calagem</b>	<b>1100</b>	<b>44,6</b>	<b>2%</b>	<b>8</b>	<b>93%</b>	<b><a href="#">CP012487.1</a></b>	<b><i>Enterobacter sp.</i></b>
359C	Seca	JNFB	Raiz	Com calagem	1156	1916	97%	0	97%	<a href="#">KJ532110.1</a>	<i>Enterobacter sp.</i>
5095	Chuvosa	NFB	Raiz	Sem calagem	1176	1965	97%	0	98%	<a href="#">MH917924.1</a>	<i>Enterobacter tabaci</i>
389B	Seca	NFB	Folha	Sem calagem	1086	1929	99%	0	99%	<a href="#">EF522135.1</a>	<i>Erwinia sp.</i>
334C1	Seca	NFB	Colmo	Com calagem	1247	2030	95%	0	97%	<a href="#">EF522135.1</a>	<i>Erwinia sp.</i>

**Tabela 6** – Identidade dos isolados endofíticos de colmo, folha, raiz e solo, na área com calagem e sem, nas estações seca e chuvosa, nos meios JMV, JNFB e NFB do capim pangolão, com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa Blast no GenBank

(Continua)

Isolado	Condição de isolamento				Pares de bases	Score	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	Descrição	Sequências mais similares no banco de dados
347B	Seca	JNFB	Colmo	Com calagem	1159	969	98%	0	98%	<a href="#">KT151931.1</a>	<i>Exanguobacterium aurantiacum</i>
406 <sup>a</sup>	Seca	JNFB	Colmo	Sem calagem	1138	1855	98%	0	97%	<a href="#">KM243757.1</a>	<i>Kocuria</i> sp.
5025	Chuvosa	NFB	Colmo	Sem calagem	1216	1984	93%	0	98%	<a href="#">JX566630.1</a>	<i>Massilia</i> sp.
5012B	Chuvosa	NFB	Colmo	Sem calagem	1168	2025	98%	0	98%	<a href="#">KP704418.1</a>	<i>Microbacterium</i> sp
5216	Chuvosa	JNFB	Colmo	Sem calagem	1090	1936	98%	0	99%	<a href="#">FJ200409.2</a>	<i>Microbacterium</i> sp
289 <sup>a</sup>	Seca	JNFB	Colmo	Sem calagem	853	50	4%	0,14	86%	<a href="#">GU015882.1</a>	bactéria não cultivada
5098	Chuvosa	NFB	Raiz	Sem calagem	1160	2071	99%	0	97%	<a href="#">AB087722.1</a>	<i>Nocardioides</i> sp.
5088	Chuvosa	NFB	Raiz	Sem calagem	1218	2071	99%	0	97%	<a href="#">AB087722.1</a>	<i>Nocardioides</i> sp.
294 <sup>a</sup>	Seca	JNFB	Folha	Sem calagem	1100	1332	98%	0	89%	<a href="#">KU145679.1</a>	<i>Pantoea</i> sp.
377D	Seca	JNFB	Folha	Sem calagem	1111	1639	97%	0	94%	<a href="#">KF036181.1</a>	<i>Pantoea dispersa</i> REB6
416 <sup>a</sup>	Seca	JMV	Raiz	Sem calagem	1113	1984	99%	0	99%	<a href="#">KJ200408.1</a>	<i>Pantoea</i> sp.
365 <sup>a</sup>	Seca	NFB	Raiz	Com calagem	1189	1999	96%	0	98%	<a href="#">JN544157.1</a>	<i>Pantoea</i> sp.
252 <sup>a</sup>	Seca	JNFB	Folha	Com calagem	1243	2050	99%	0	97%	<a href="#">JN391535.1</a>	<i>Pantoea</i> sp.
<b>5195</b>	<b>Chuvosa</b>	<b>JNFB</b>	<b>Colmo</b>	<b>Sem calagem</b>	<b>1100</b>	<b>50,9</b>	<b>20%</b>	<b>0,19</b>	<b>68%</b>	<b><a href="#">KF113577.1</a></b>	<b><i>Pseudomonas</i> sp.</b>
<b>5294</b>	<b>Chuvosa</b>	<b>JNFB</b>	<b>Raiz</b>	<b>Sem calagem</b>	<b>1100</b>	<b>44,6</b>	<b>3%</b>	<b>8</b>	<b>85%</b>	<b><a href="#">AP017560.1</a></b>	<b><i>Pseudomonas</i> sp.</b>
5290	Chuvosa	JNFB	Raiz	Sem calagem	1134	1934	99%	0	98%	<a href="#">AB680223.1</a>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
5377EA	Chuvosa	JNFB	Colmo	Sem calagem	1100	1483	97%	0	92%	<a href="#">JQ291604.1</a>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>
199B	Seca	NFB	Raiz	Com calagem	1232	2052	98%	0	97%	<a href="#">EU921258.1</a>	<i>Pseudomonas</i> não cultivada
199C	Seca	NFB	Raiz	Com calagem	1115	1923	99%	0	98%	<a href="#">JQ659977.1</a>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>
331C	Seca	JNFB	Solo	Com calagem	1125	1943	99%	0	98%	<a href="#">HQ677827.1</a>	<i>Rhizobium</i> sp
338 <sup>a</sup>	Seca	NFB	Colmo	Com calagem	1066	1727	97%	0	97%	<a href="#">KM019818.1</a>	<i>Rhizobium endophyticum</i>
273C	Seca	JNFB	Colmo	Com calagem	1134	1916	99%	0	97%	<a href="#">KY859842.1</a>	<i>Rhizobium pusense</i>
219B	Seca	NFB	Colmo	Com calagem	1119	1951	98%	0.0	99%	<a href="#">KY971001.1</a>	<i>Rhizobium</i> sp.

**Tabela 6** – Identidade dos isolados endofíticos de colmo, folha, raiz e solo, na área com calagem e sem, nas estações seca e chuvosa, nos meios JMV, JNFB e NFB do capim pangolão, com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa Blast no GenBank

(Conclusão)

Isolado	Condição de isolamento				Pares de bases	Score	Cobertura (%)	E-value	Identidade (%)	Descrição	Sequências mais similares no banco de dados
375B	Seca	JNFB	Folha	Sem calagem	1169	2023	99%	0	98%	<a href="#">KY426387.1</a>	<i>Rhizobium sp.</i>
5021	Chuvosa	NFB	Colmo	Sem calagem	1163	1997	99%	0	98%	<a href="#">KY426380.1</a>	<i>Rhizobium sp.</i>
<b>5297</b>	<b>Chuvosa</b>	<b>JNFB</b>	<b>Raiz</b>	<b>Sem calagem</b>	<b>1100</b>	<b>52,7</b>	<b>7%</b>	<b>0,054</b>	<b>76%</b>	<b><a href="#">KF202632.1</a></b>	<b><i>Rhizobium sp.</i></b>
403B	Seca	NFB	Raiz	Sem calagem	1102	1932	99%	0	99%	<a href="#">KY971009.1</a>	<i>Rhizobium sp.</i>
361B	Seca	JNFB	Raiz	Com calagem	1191	2060	99%	0	98%	<a href="#">MK280695.1</a>	<i>Rhizobium sp.</i>
364 <sup>a</sup>	Seca	NFB	Raiz	Com calagem	1133	1980	99%	0	98%	<a href="#">KM894198.1</a>	<i>Rhizobium sp.</i>
<b>270C</b>	<b>Seca</b>	<b>JNFB</b>	<b>Colmo</b>	<b>Com calagem</b>	<b>540</b>	<b>95,1</b>	<b>33%</b>	<b>2,00E-15</b>	<b>76%</b>	<b><a href="#">AJ784209.1</a></b>	<b><i>Rhizobium sp.</i></b>
335C	Seca	NFB	Colmo	Com calagem	1175	1973	99%	0	97%	<a href="#">GU563787.1</a>	<i>Rizobium não cultivado</i>
<b>5102</b>	<b>Chuvosa</b>	<b>NFB</b>	<b>Raiz</b>	<b>Sem calagem</b>	<b>1100</b>	<b>377</b>	<b>72%</b>	<b>1,00E-99</b>	<b>72%</b>	<b><a href="#">JF262583.1</a></b>	<b><i>Shinella sp</i></b>
5010	Chuvosa	NFB	Colmo	Sem calagem	1192	2026	97%	0	98%	<a href="#">MF766453.1</a>	<i>Shinella zoogloeoides</i>
5005	Chuvosa	NFB	Colmo	Sem calagem	1130	1969	99%	0	98%	<a href="#">MF766453.1</a>	<i>Shinella zoogloeoides</i>
5057 <sup>a</sup>	Chuvosa	NFB	Folha	Sem calagem	1191	2447	88%	0	98%	<a href="#">MF766451.1</a>	<i>Shinella zoogloeoides</i>
5388	Chuvosa	JNFB	Folha	Sem calagem	1170	2017	99%	0	98%	<a href="#">MF766453.1</a>	<i>Shinella zoogloeoides</i>
<b>5112</b>	<b>Chuvosa</b>	<b>NFB</b>	<b>Raiz</b>	<b>Sem calagem</b>	<b>1100</b>	<b>112</b>	<b>36%</b>	<b>7,00E-20</b>	<b>68%</b>	<b><a href="#">LC230110.1</a></b>	<b><i>Sphingomonas sp.</i></b>
188B	Seca	NFB	Colmo	Sem calagem	1100	490	87%	5,00E-134	76%	<a href="#">JQ316247.1</a>	<i>Staphylococcus sp.</i>
195C1	Seca	NFB	Folha	Sem calagem	974	1631	96%	0	98%	<a href="#">KP241046.1</a>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
5378EB	Chuvosa	JNFB	Colmo	Sem calagem	1164	1953	99%	0	97%	<a href="#">KX672778.1</a>	<i>Stenotrophomonas não cultivada</i>
<b>5242</b>	<b>Chuvosa</b>	<b>JNFB</b>	<b>Folha</b>	<b>Sem calagem</b>	<b>1100</b>	<b>144</b>	<b>66%</b>	<b>1,00E-29</b>	<b>67%</b>	<b><a href="#">MK389340.1</a></b>	<b><i>Stenotrophomonas panacihumi</i></b>
376 <sup>a</sup>	Seca	JNFB	Folha	Sem calagem	1258	1984	97%	0	96%	<a href="#">JQ660216.1</a>	<i>Stenotrophomonas panacihumi</i>
5200	Chuvosa	JNFB	Colmo	Sem calagem	1196	2058	99%	0	98%	<a href="#">KX456368.1</a>	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
5167	Chuvosa	JNFB	Colmo	Sem calagem	1085	1188	95%	0	88%	<a href="#">AB461796.1</a>	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
5007	Chuvosa	NFB	Colmo	Sem calagem	1191	2023	98%	0	98%	<a href="#">KX456229.1</a>	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
5379 <sup>a</sup>	Chuvosa	JNFB	Colmo	Sem calagem	1186	2074	99%	0	98%	<a href="#">AF409004.1</a>	<i>Stenotrophomonas sp.</i>



**Tabela 6** – Classificação taxonômica das bactérias isoladas no capim pangolão de uma pastagem no Nordeste brasileiro

Filo	Classe	Ordem	Subordem	Família	Gênero	Total	Porcentagem					
Actinobactéria	Actinomycetales	Actinomycetales	Propionibacterineae	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium</i>	1	1,49					
				Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>	1	1,49					
				Nocardioidaceae	<i>Nocardioides</i>	2	2,99					
				Micrococcales	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium</i>	2	2,99				
Firmicutes	Bacilli ou Firmibacteria	Bacillales		Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	2	2,99					
				unassigned	<i>Exiguobacterium</i>	1	1,49					
				Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	1	1,49					
				Burkholderiales	Oxalobacteraceae	<i>Massilia</i>	1	1,49				
Proteobactéria	α-proteobacteria			Beijerinckiaceae	<i>Beijerinckia</i>	2	2,99					
				Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	12	17,91					
				Rhizobiaceae	<i>Shinella</i>	5	7,46					
				Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>	1	1,49				
				Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	11	16,42				
				γ-proteobactéria				<i>Erwinia</i>	2	2,99		
								<i>Pantoea</i>	5	7,46		
				β-proteobactéria				Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	6	8,96
								Lysobacterales	Lysobacteraceae	<i>Stenotrophomonas</i>	8	11,94
								Burkholderiales	Alcaligenaceae	<i>Alcaligenes</i>	1	1,49
Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	1					1,49				
				<i>Bactéria não cultivada</i>	2	2,99						

#### 3.3.4.1 Relações filogenéticas entre isolados bacterianos

A árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA agrupou os 20 gêneros bacterianos representativos em sete grupos principais (Figura 6). A maioria dos isolados (65,71%) pertencem aos G I, G V e GVI. Além destes, o isolado 270B (*Bacillus licheniformis*) se comportou como *outgroup*. Os isolados do GI apresentaram similaridade de 96% com *Enterobacter* e *Pantoea*. Já para o G VI, os isolados apresentaram similaridade de 100% com *Rhizobium* e *Shinella*. Ambos os grupos apresentaram isolados em todas condições de isolamento.

No G II, por sua vez, os isolados apresentaram 99% de similaridade com *Pseudomonas fluorescence* e *Pseudomonas* não cultivada, sendo encontradas apenas estirpes isoladas no colmo e sistema radicular, e nos meios JNFB e NFB. Já GIII com 85% de similaridade e três subgrupos com similaridade 99% com *Alcalinogenes* e 94% com *Masilia* e *Burkholderia* respectivamente, na folha, raiz e colmo, prevalecendo na estação seca e meio NFB.

O G IV com 99 % de similaridade, subdividiu em dois grupos com os isolados apresentando similaridade de 95% com *Pseudomonas hibiscicola* e 86% com *Stenotrophomonas*. Esta por último, foi isolada apenas no colmo e folha, e na área com calagem. Por fim, o G V com 97% de similaridade, subdividiu em dois grupos com isolados apresentando 100% similaridade com *Kucuria*, *Nocardioides* e *Microbacterium*, e 99% de similaridade com *Staphylococcus*.



### 3.4 CONCLUSÕES

O capim pangolão apresentou uma grande diversidade de bactérias endofíticas.

A biodiversidade de bactérias endofíticas associadas ao capim pangolão é afetada pelas condições edafoclimáticas e nichos de colonização do capim pangolão, com maior diversidade na estação chuvosa e na área com calagem.

Os isolados do capim pangolão foram classificados taxonomicamente ao filo (Proteobactérias, Actinobactérias e Firmicutes) e aos gêneros *Alcalinogenes*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Massilia*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Neocardoides*, *Stenotrptophomonas*, *Kocuria*, *Shinella*, *Pantoea*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*.

### REFERÊNCIAS

- ADNAN, M.; PATEL, M.; REDDY, M. N.; KHAN, S.; ALSHAMMARI, E.; ABDELKAREEM, A. M.; HADI, S. Isolation and characterization of effective and efficient plant growth-promoting rhizobacteria from rice rhizosphere of diverse paddy fields of indian soil. **Journal of Agricultural and Biological Science**, Faisalabad, v. 11, n. 9, 2016.
- ANTUNES, J. E. L.; LYRA, M. C. C. P.; OLLERO, F. J.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, L. M. S.; ARAÚJO, A. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão preto, v. 16, n. 2, 2017.
- ARAUJO, H. R.; ALBUQUERQUE RANGEL, J. H. DE; FAGUNDES, J. L.; MUNIZ, E. N.; OLIVEIRA SANTOS, D. DE; NETO, J. A. S.; FILHO, E. S. C.; ARRUDA SANTOS, G. R. DE. Productive characteristics of the grass *Digitaria umfolozi* subjected to defoliation frequencies. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 1, p. 343–354, 2017.
- BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; VIDEIRA, S. S.; BODDEY, L. H.; BALDANI, V. L. D. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 384, n. 1–2, p. 413–431, 25 nov 2014.
- BARRETO, M. DO C. S.; FIGUEIREDO, M. DO V. B.; SILVA, M. V. DA; ANDRADE, A. G. DE; OLIVEIRA, J. DE P. DE; ALMEIDA, C. M. A.; ARAÚJO, L. C. A. DE; JUNIOR, O. V. DOS R.; JUNIOR, M. U. F.; COSTA, A. F. DA; LIMA, V. L. DE M. Biotechnological Potential of Endophytic Bacteria to Improve the Micropropagated Seedling of Variety RB92579 Sugarcane. **Advances in Microbiology**, Califórnia, v. 08, n. 11, p. 859–873, 2018.

BIONDI, D.; BOBROWSKI, R. Utilização De Índices Ecológicos Para Análise Do Tratamento Paisagístico Arbóreo Dos Parques Urbanos De Curitiba-Pr. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 10, n. 18, p. 3006–3017, 2014.

BUCK, J.D. Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 44, n. 4, p. 992–993, 1982.

BURNS, J. H.; ANACKER, B. L.; STRAUSS, S. Y.; BURKE, D. J. Soil microbial community variation correlates most strongly with plant species identity, followed by soil chemistry, spatial location and plant genus. **AoB PLANTS**, Oxford, v. 7, n. 1, p.1-30, 2015.

CARNEIRO, M.; SANTOS, M.; RODRIGUES, D.; SANTOS, D.; BAKKE, O. A.; BAKKE, I. A. Ocorrência e atividade de bactérias diazotróficas em forrageiras cultivadas na região semiárida no Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n. 1, p. 27–34, 2013.

CESAR DA, F.; Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. **Embrapa tecnologia da informação**. 2009. 627p.

CHEBOTAR, V. K.; MALFANOVA, N. V.; SHCHERBAKOV, A. V.; AHTEMOVA, G. A.; BORISOV, A. Y.; LUGTENBERG, B.; TIKHONOVICH, I. A. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, Nova Iorque, v. 51, n. 3, p. 271–277, 3 maio 2015.

COOK, B. G.; SCHULTZE-KRAFT, R. Botanical name changes - nuisance or a quest for precision? **Tropical Grasslands - Forrajes Tropicales**, Cali, v. 3, n. 1, p. 34, 2015.

DIAS, A. C. R.; CARVALHO, S. J. P.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Problemática da ocorrência de diferentes espécies de capim-colchão (*Digitaria* spp.) NA CULTURA DA CANA-DE-AÇÚCAR. **Planta Daninha**, Vçosa, v. 25, n. 2, p. 489–499, 2007.

DELAMUTA, J. R. M.; MENNA, P.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Phylogenies of symbiotic genes of Bradyrhizobium symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 40, n. 5, p. 254–265, 2017.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Rio de Janeiro: Embrapa: Agrobiologia, 1995. 60 p. (Embrapa- Agrobiologia. Documentos, S/N).

DÖBEREINER JOHANA. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Rio de Janeiro: Embrapa: Agrobiologia, 1999. 68 p. (Embrapa- Agrobiologia. Documentos, 110).

DWIVEDI, S. L.; SAHRAWAT, K. L.; UPADHYAYA, H. D.; MENGONI, A.; GALARDINI, M.; BAZZICALUPO, M.; BIONDI, E. G.; HUNGRIA, M.; KASCHUK, G.; BLAIR, M. W.; ORTIZ, R. Advances in Host Plant and Rhizobium Genomics to Enhance Symbiotic Nitrogen Fixation in Grain Legumes. **Advances in Agronomy**, San diego, v. 129, p. 1–116, 2015.

EHRHARDT-BROCARDO, N. C. M.; STOCCO, P.; TRAMONTIN, A. L.; OLIVEIRA FILHO, L. C. I.; SANTOS, J. C. P. DIVERSIDADE CULTURAL, MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE DIAZOTRÓFICOS ISOLADOS DE NÓDULOS DE BRACATINGA1. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 39, n. 5, p. 923–933, 2015.

ESCOBAR RODRÍGUEZ, C.; MITTER, B.; ANTONIELLI, L.; TROGNITZ, F.; COMPANT, S.; SESSITSCH, A. Roots and Panicles of the C4 Model Grasses *Setaria viridis* (L.) and *S. pumila* Host Distinct Bacterial Assemblages With Core Taxa Conserved Across Host Genotypes and Sampling Sites. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 9, p. 2708, 2018.

GARCÍA-SALAMANCA, A.; MOLINA-HENARES, M. A.; DILLEWIJN, P. VAN; SOLANO, J.; PIZARRO-TOBÍAS, P.; ROCA, A.; DUQUE, E.; RAMOS, J. L. Bacterial diversity in the rhizosphere of maize and the surrounding carbonate-rich bulk soil. **Microbial Biotechnology**, Hoboken, v. 6, n. 1, p. 36–44, 2013.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The Road Map to the Manual. *In: Bergery's Manual® of Systematic Bacteriology*. New York, NY: Springer New York, 2001. p. 119–166.

GONZALEZ, A. M.; VIEIRA, R. P.; CARDOSO, A. M.; CLEMENTINO, M. M.; ALBANO, R. M.; MENDONÇA-HAGLER, L.; MARTINS, O. B.; PARANHOS, R. Diversity of bacterial communities related to the nitrogen cycle in a coastal tropical bay. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 4, p. 3401–3407, 2012.

HAMMER, D. A. T.; RYAN, P. D.; HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. **Palaeontologia Electronica**, Amherst, v. 4, .n. 1: p. 1-9, 2001. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)

HARPER, D. A. T. **Numerical palaeobiology : computer-based modelling and analysis of fossils and their distributions**. Nova Jersey: Wiley, 1999. 478p.

HERAS, J.; DOMÍNGUEZ, C.; MATA, E.; PASCUAL, V.; LOZANO, C.; TORRES, C.; ZARAZAGA, M. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 16, n. 1, p. 270, 2015.

HIRSCH, P. R.; MAUHLIN, T. H. Who's who in the plant root microbiome? **Nature Biotechnology**, Nova iorque, v. 30, n. 10, p. 961–962, 2012.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 221, p. 125–131, 1 abr. 2016.

- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; SANTOS, J. C. P.; BERTON-JUNIOR, J. F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 87, n. 2, p. 205–217, 2006.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA 7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 35, p. 1547–1549, 2018.
- LAMBAIS, M. R.; LUCHETA, A. R.; CROWLEY, D. E. Bacterial Community Assemblages Associated with the Phyllosphere, Dermosphere, and Rhizosphere of Tree Species of the Atlantic Forest are Host Taxon Dependent. **Microbial Ecology**, Nova iorque, v. 68, n. 3, p. 567–574, 2014.
- MARTINS, P. G. S.; JUNIOR, M. A. L.; FRACETTO, G. G. M.; SILVA, M. L. R. B. DA; VINCENTIN, R. P.; LYRA, M. DO C. C. P. DE. Mimosa caesalpinifolia rhizobial isolates from different origins of the Brazilian Northeast. **Archives of Microbiology**, Nova iorque, v. 197, n. 3, p. 459–469, 2015.
- MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. DE S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. DE. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235–246, 2006.
- MENNA, P.; PEREIRA, A. A.; BANGEL, E. V.; HUNGRIA, M. Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, Dordrecht, v. 48, n. 1–3, p. 120–130, 2009.
- MUTAI, C.; NJUGUNA, J.; GHIMIRE, S. Brachiaria Grasses ( *Brachiaria spp.* ) harbor a diverse bacterial community with multiple attributes beneficial to plant growth and development. **MicrobiologyOpen**, Hoboken, v. 6, n. 5, p.1-11, 2017.
- PARTE, A. C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Londres, v. 68, n. 6, p. 1825–1829, 2018.
- PATEL, J. K.; ARCHANA, G. Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from Poaceae plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 417, n. 1–2, p. 99–116, 2017.
- QU, T.; DU, W.; YUAN, X.; YANG, Z.; LIU, D.; WANG, D.; YU, L. Impacts of Grazing Intensity and Plant Community Composition on Soil Bacterial Community Diversity in a Steppe Grassland. **Plos One**, São francisco, v. 11, n. 7, p., 2016.
- RATTRAY, J. The Grass Cover of Africa. v. 49, p. 168, 1960.
- REIS, V. M.; PITARD, R. M.; DOURADO, F. dos S.; CAMACHO, N. N.; VIDEIRA, S. S.; CAMARGO, A. B.; BOA SORTE, P. F.; VIDAL, M. S.; SCHWAB, S.; BALDANI, J. I. Caracterização morfo-fisiológica e molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar Embrapa: Agrobiologia, 2011. 36p. (Embrapa-Agrobiologia . Documentos, 280).

RILLINGA, J. I.; ACUÑA, J. A.; NANNIPIERID, P.; CASSANE, F.; MARUYAMAC, F.; JORQUERAB, M. A. Current opinion on methods and perspectives for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 130, n.1, p. 205–219, 2019.

RODRÍGUEZ-BLANCO, A.; SICARDI, M.; FRIONI, L. Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). **Biology and Fertility of Soils**, Nova iorque, v. 51, n. 3, p. 391–402, 2015.

SAHOO, R. K.; ANSARI, M. W.; PRADHAN, M.; DANGAR, T. K.; MOHANTY, S.; TUTEJA, N. Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. **Protoplasma**, Wien, v. 251, n. 4, p. 943–953, 2014.

SANTOS, A. F. DE; MARTINS, C. Y. S.; SANTOS, P. O.; CORRÊA, É. B.; BARBOSA, H. R.; SANDOVAL, A. P. S.; OLIVEIRA, L. M.; SOUZA, J. T. DE; SOARES, A. C. F. Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 385, n. 1–2, p. 37–48, 2014.

SANTOS, M. C. M.; SANTOS, D. R.; BAKKE, O. A.; BAKKE, V. A. OCORRÊNCIA E ATIVIDADE DE BACTÉRIAS DIAZOTRÓFICAS EM FORRA-GEIRASCULTIVADAS NA REGIÃO SEMIÁRIDA NO BRASIL. **Caatinga**, Mossoró v. 26, n. 1, p. 27–34, 2013.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M. DEL; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, Jena, v. 183, p. 92–99, 2016.

SILVA, M. S.; SALES, A. N.; MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; DIAS, D. R.; SCHWAN, R. F. Brazilian Cerrado soil Actinobacteria ecology. **BioMed research international**, Londres, n. s/n, v.s/v, p. 1-13, 2013.

SILVA, M. DE O.; FREIRE, F. J.; LIRA JUNIOR, M. A.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; COSTA, D. P. DA; LIRA-CADETE, L. Isolamento e prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas na cana-de-açúcar em áreas com e sem cupinicida. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 4, p. 1113–1122, 2012.

SOUZA, R. DE; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão preto, v. 38, n. 4, p. 401–419, 2015.

TAVARES, J. E. **Histórico de uso da pastagem de capim pangolão da Estação Experimental de Araripina do IPA**. LIRA JUNIOR, M. A. Araripina: IPA 2017

VERMA, P.; NATH YADAV, A.; KHANNAM KAZY, S.; KUMAR SAXENA, A.; SUMAN, A. Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 3, n.5, p. 432-447, 2014.



#### 4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO ISOLADAS DE CAPIM PANGOLÃO AFETAM O MILHO?

##### Resumo

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas, e cresce a cada ano devido a novas tecnologias e aumento do consumo de insumos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de promoção de crescimento de bactérias endofíticas do capim pangolão (*Digitaria eriantha*) *in vitro* e sua possível relação com a promoção de crescimento *in vivo* no milho. Foram coletadas amostras de colmo, folha, raiz e solo, em pastagem estabelecida a pelo menos 30 anos sem manejo de fertilidade, no semiárido tropical brasileiro, nas estações secas e chuvosa, com calagem e sem calagem. Foram obtidos trezentos e dezesseis isolados de bactérias endofíticas nativas, formando 73 grupos a 100% similaridade. Destes foram selecionados 80 representantes para avaliar os mecanismos de promoção de crescimento e realizar teste de eficiência no milho. Todos apresentaram produção variável para o ácido indol-3-acético (AIA) na presença de L-triptofano, variando de 20 a 215 µg de AIA ml<sup>-1</sup> e a produção de sideróforos. 68% dos isolados foram positivos para fixação de nitrogênio, 35% para solubilização de fosfato e 13% para HCN. Estes resultados sugerem que estas bactérias apresentam potencial para promoção de crescimento. Os isolados promoveram o desenvolvimento do milho, em relação a altura e comprimento radicular. Alguns isolados promoveram melhor crescimento do milho em relação as plantas supridas com adubação completa. Os isolados bacterianos apresentaram potencial de promoção de crescimento semelhantes às estirpes recomendadas pelo MAPA para o milho.

Palavras-chave: BPCP. Poaceae. *Digitaria eriantha*. Milho.

## GROWTH PROMOTING BACTERIA ISOLATED FROM “PANGOLÃO” AFFECT CORN?

### Abstract

Brazil is one of the largest agricultural producers of the world, increasing every year due to new technologies and increasing input usage. This work aimed to evaluate the growth promotion potential of endophytic bacteria from “pangolão” grass (*Digitaria eriantha*) *in vitro* and its possible relation with corn growth promotion *in vivo*. Samples were collected from culm, leaves, root and soil, in a pasture established for at least 30 years, with no soil fertility management, in the Brazilian tropical semiarid. 316 native endophytic bacteria were isolated, forming 73 groups at 100% similarity. From these, 80 representatives were selected to evaluate growth promotion mechanisms and corn growth promotion. All produced variable amounts of indol-3-acetic acid (IAA) in the presence of L-tryptophan, ranging from 20 to 215  $\mu\text{g IAA ml}^{-1}$ , as well as siderophore production. 68 % of the isolates were positive for biological nitrogen fixation, 35% for phosphate solubilization and 13% for HCN. These results suggest these bacteria have potential for growth promotion. They increased corn development in height and root length. Some isolates induced better corn growth than that of plants receiving the full nutrient solution. Bacterial isolates had similar growth promoting potential to that of bacteria currently recommended for corn inoculant production

Keywords: PGPB. Poaceae. *Digitaria eriantha*. Maize.

#### 4.1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem importante papel mundial na produção de commodities agrícolas, que cresce a cada ano através da adoção de novas tecnologias e aumento do consumo de insumos industrializados. Entre as principais culturas, destaca-se a produção de milho (*Zea mays* L.), sendo o Brasil o terceiro maior produtor mundial do grão, cuja área plantada na safra 2018/2019 foi de cerca de 16,6 mil de hectares, com produção 91,1 mil de toneladas (CONAB, 2019). Esta produção é altamente dependente de insumos agrícolas, sendo os fertilizantes nitrogenados e fosfatados os mais utilizados para obter o máximo rendimento na produção (KUAN et al., 2016). No entanto, estes insumos podem contribuir para o agravamento do aquecimento global (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016) e causar eutrofização (VALENTE, PADILHA e SILVA, 2018).

A utilização de bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP) é uma alternativa para diminuir a dependência por fertilizantes e reduzir o impacto ambiental (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016). As bactérias endofíticas compreendem microrganismos que são benéficos para as plantas devido à sua capacidade de colonizar tecidos internos promovendo o crescimento (PATEL; ARCHANA, 2017). Alguns representantes incluem *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (ANTUNES et al., 2017; RODRÍGUEZ et al., 2018; BARRETO et al., 2018).

As BPCP podem estimular o crescimento das plantas por diversos mecanismos, que incluem: a produção de ácido indolacético (AIA), sideróforos ou ácido cianídrico - HCN, solubilização de fosfato ou fixação biológica do nitrogênio (CHIMWAMUROMBE; REINHOLD-HUREK, 2015; PATEL; SARAF, 2017; MACHADO et al., 2018; KANG et al., 2018; HAIYAMBO; ABDELKRIM et al., 2018; PÉREZ-CORDERO; CHAMORRO-ANAYA; ZOOTECA, 2018;). No entanto, ainda não se sabe quais desses mecanismos leva à promoção de crescimento. Desta forma, esses mecanismos combinados beneficia o crescimento das plantas (GLICK, 2015). Contudo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de promoção de crescimento de bactérias endofíticas do capim pangolão (*Digitaria eriantha* Stent) *in vitro* e sua possível relação com a promoção de crescimento *in vivo* no milho.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Amostragem

As amostragens de planta foram realizadas na estação experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, município de Araripina, situado na mesorregião do Sertão de Pernambuco (Figura 7), em uma área com pastagem de capim pangolão (*Digitaria eriantha* Stent) sem calagem ou adubação de cobertura por um mínimo de 30 anos (TAVARES, 2017).



**Figura 7** – Localização do Nordeste brasileiro com recorte do estado de Pernambuco, e ênfase para Araripina situada na mesorregião do Sertão

### 4.2.2 Seleção das bactérias endofíticas

Amostras da planta foram separadas em folhas, colmo e raízes desinfestadas de acordo com Barreto et al. (2018). De cada parte da planta, foram pesados 10 g e moídas em 90 mL de solução salina (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995), caracterizando assim a primeira diluição  $10^{-1}$ , com três repetições. Foram feitas diluições de  $10^{-2}$  até  $10^{-7}$  em tubos com 9 mL da mesma solução. Alíquotas de 0,10 mL dos extratos diluídos foram inoculados em triplicata em frascos tipo penicilina contendo 5 mL dos meios semissólidos (NFB, JNFB JMV), como mencionado por Döbereiner et al. (1999).

Os frascos foram incubados a 28 °C, por 72-96 h, em estufa bacteriológica e determinado o número mais provável de bactérias pela tabela de McCrady. Nos casos em que houve formação de película, foi feita repicagem para meio semissólido de origem e seguido por caracterização morfológica de colônias isoladas por esgotamento.

A caracterização morfológica foi realizada no meio sólido 79 (REIS et al., 2011) e foram avaliados o pH do meio de cultura (ácido, neutro e alcalino); produção ou não

de muco; bordas, cores e tamanho das colônias (MELLONI et al., 2006). Os dados foram transformados em binários (1 – positivo e 0 – negativo) e realizado agrupamento pelo algoritmo de grupos pareados e o Índice de Jaccard, utilizando o programa PAST 2.17c (HAMMER et al., 2001) e feito o agrupamento dos isolados obtidos a 100% de similaridade. Destes, foram escolhidos 80 isolados de forma que se manteve a representatividade dos grupos e condições de isolamento (Tabela 7).

**Tabela 7** – Isolados selecionados para análise dos mecanismos de promoção de crescimento in vitro e análise da eficiência no milho

<b>Isolados</b>	<b>Gênero</b>	<b>Isolados</b>	<b>Gênero</b>	<b>Isolados</b>	<b>Gênero</b>	<b>Isolados</b>	<b>Gênero</b>
121A	<i>Enterobacter</i>	331C	<i>Rhizobium</i>	403B	<i>Rhizobium</i>	5172b1	<i>Enterobacter</i>
121B1	Não sequenciada	334C1	<i>Erwinia</i>	406A	<i>Kocuria</i>	5175	Não sequenciada
183C1	<i>Beijerinckia</i>	335C	<i>Rhizobium</i>	416A	<i>Pantoea</i>	5185	Não sequenciada
188B	<i>Staphylococcus</i>	338A	<i>Rhizobium</i>	416B	Não sequenciada	5186B	Não sequenciada
192C	<i>Alcaligenes</i>	344B1B	<i>Beijerinckia</i>	416D	Não sequenciada	5195	<i>Pseudomonas</i>
193A	<i>Enterobacter</i>	347B	<i>Exanguobacterium</i>	5005	<i>Shinella</i>	5197A	Não sequenciada
195C1	<i>Stenotrophomonas</i>	357A	<i>Bacillus</i>	5007	<i>Stenotrophomonas</i>	5200	<i>Stenotrophomonas</i>
199B	<i>Pseudomonas</i>	359C	<i>Enterobacter</i>	5010	<i>Shinella</i>	5207	Não sequenciada
199C	<i>Pseudomonas</i>	361B	<i>Rhizobium</i>	5012B	<i>Microbacterium</i>	5216	<i>Microbacterium</i>
219B	<i>Rhizobium</i>	363A	Não sequenciada	5021	<i>Rhizobium</i>	5242	<i>Stenotrophomonas</i>
225B	Não sequenciada	364A	<i>Rhizobium</i>	5025	<i>Massilia</i>	5255	Não sequenciada
252A	<i>Pantoea</i>	365A	<i>Pantoea</i>	5057A	<i>Shinella</i>	5289	Bactéria não cultivada
270B	<i>Bacillus</i>	372B	<i>Burkholderia</i>	5068	<i>Enterobacter</i>	5290	<i>Pseudomonas</i>
270C	<i>Rhizobium</i>	374B	<i>Enterobacter</i>	5088	<i>Nocardiodes</i>	5294	<i>Pseudomonas</i>
273C	<i>Rhizobium</i>	375B	<i>Rhizobium</i>	5095	<i>Enterobacter</i>	5297	<i>Rhizobium</i>
288C	<i>Enterobacter</i>	376A	<i>Stenotrophomonas</i>	5098	<i>Nocardiodes</i>	5338	<i>Enterobacter</i>
289A	Bactéria não cultivada	377C	<i>Enterobacter</i>	5102	<i>Shinella</i>	5377EA	<i>Pseudomonas</i>
294A	<i>Pantoea</i>	377D	<i>Pantoea</i>	5103	Não sequenciada	5378EB	<i>Stenotrophomonas</i>
294D	<i>Curtobacterium</i>	389B	<i>Erwinia</i>	5112	<i>Sphingomonas</i>	5379A	<i>Stenotrophomonas</i>
297A		400B	<i>Enterobacter</i>	5167	<i>Stenotrophomonas</i>	5388	<i>Shinella</i>

Gênero=Sequências mais similares no GenBank NCBI

### **4.2.3 Avaliação *in vitro* dos mecanismos de promoção de crescimento**

#### **4.2.3.1 Determinação de Ácido Indolacético (AIA)**

A quantificação do AIA foi realizada pelo método de Kuss et al. (2007) modificado. Os isolados foram cultivados no meio de cultura TSB 3g/L + L-triptofano (5mM) e adicionado o reagente de Salkowski,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0,5 M) com  $\text{HCl}_4$  (35 %). As amostras foram armazenadas em local escuro por 30min e realizadas as leituras em espectrofotômetro  $\lambda = 520 \text{ nm}$ . A concentração de compostos indol foi estimada com uma curva padrão, previamente preparada com meio de cultura estéril não inoculado e quantidades conhecidas de AIA: 0,5, 10, 30, 50, 70, 90 e 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , foram preparadas de acordo com a equação  $Y = 0,0121 X - 0,0075$  ( $R^2 = 0,9995$ ).

#### **4.2.3.2 Solubilização de fosfato**

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada em meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999). As bactérias foram multiplicadas em meio líquido 79 por 72h a 180 rpm e inoculadas em 3 pontos distintos sobre o meio de cultura NBRIP sólido. Após o período de incubação de até 15 dias a 28 °C no escuro, calculou-se o índice de solubilização pela razão entre os halos de solubilização e da colônia.

#### **4.2.3.3 Crescimento em meio sem N – avaliação qualitativa da fixação biológica de nitrogênio**

Os isolados bacterianos foram avaliados quanto à capacidade de fixar  $\text{N}_2$  *in vitro* pelo crescimento sem fonte de nitrogênio, pela inoculação em tubos de ensaio contendo 10 mL de meio de cultura NFb. A formação de uma película superficial indica a presença de microrganismos fixadores de nitrogênio (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995; BODDEY et al., 1995).

#### **4.2.3.4 Produção de sideróforos**

A produção de sideróforos foi avaliada segundo a metodologia de Schwyn e Neilands, (1987). Os isolados foram crescidos em meio TSB, diluídos 10 vezes (1/10) em água deionizada por 72 h a 32 °C. Aqueles que converteram a cor azul da solução CAS para amarelo dentro de 15 min foram considerados produtores de sideróforos e realizadas as leituras em espectrofotômetro  $\lambda = 630 \text{ nm}$ . O cálculo da produção de sideróforos foi realizado da seguinte maneira:  $A/A_{\text{ref}}$  ( $A$  = absorvância da amostra e  $A_{\text{ref}}$  = absorvância do branco).

#### 4.2.3.5 Produção de ácido cianídrico (HCN)

Para avaliação da produção de HCN foi utilizado método colorimétrico (BAKKER; SCHIPPERS, 1987) adaptado por (CATTELEAN, 1999). A mudança da coloração do papel de filtro de amarelo para marrom-alaranjado indica produção de HCN.

#### 4.2.4 Eficiência das bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento do milho

A eficiência das bactérias promotoras de crescimento foi avaliada em casa de vegetação no delineamento experimental em blocos casualizados com seis repetições.

Utilizou-se o híbrido AG 1051 cultivado em garrafas esterilizadas tipo *long neck* preenchidas com uma solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), diluída 4 vezes, e modificada para 20 % do N da solução completa sem inoculação – Tratamento Controle I; com 20 % N da solução Hoagland com os isolados bacterianos – Tratamento com isolados bacterianos; solução 100% de N da solução Hoagland – Tratamento controle II; e 20 % N da solução Hoagland com inoculante comercial (Ab-V5 e Ab-V6) – Tratamento inoculante comercial.

Na montagem das garrafas, foram colocadas duas tiras de papel germitest de 1,8 cm de largura e comprimento correspondente à altura da mesma, servindo como suporte para o desenvolvimento das raízes das plantas e promovendo o contato entre a solução nutritiva e as sementes de milho, que foi apoiada em uma pequena quantidade de algodão na boca da garrafa. Subsequentemente, todas as garrafas foram autoclavadas durante 1 hora, pressão de 1,0 atm e temperatura de 120 °C, sendo estas cobertas na extremidade com papel alumínio.

As sementes foram desinfestadas superficialmente com álcool a 70% durante 30 segundos, depois imersas em solução de hipoclorito de sódio a 2,5% durante 2 minutos e lavadas oito vezes com água destilada autoclavada. Posteriormente foram colocadas para germinar em papel germitest esterilizado, umedecido e incubados a 25 °C durante 4 dias.

Para o preparo do caldo bacteriano, as bactérias foram repicadas em placas de Petri em meio 79. Após o crescimento das colônias, foi retirada uma pequena quantidade de muco utilizando-se uma alça de platina e inoculada em 2 mL de meio 79 líquido em tubos de penicilina. As bactérias foram cultivadas sob agitação orbital a



180 rpm. As plântulas foram transplantadas para as garrafas contendo solução nutritiva e inoculadas com 1,0 mL de meio líquido contendo os isolados. A solução nutritiva foi repostada duas vezes, sempre que o volume inicial (350 mL) reduziu.

As plantas foram colhidas aos 35 dias após inoculação e determinadas a área foliar, altura, comprimento radicular e diâmetro do colo. A parte aérea das plantas e o sistema radicular foram cortados, secos em estufa a 65 °C por 72 horas para a avaliação da massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca parte radicular (MSPR)

A eficiência relativa foi calculada para massa seca total, usando as equações:

I) Eficiência relativa inoculante comercial

$$ERIC = \left( \frac{MSPI \text{ de cada tratamento}}{MSP \text{ controle inoculante comercial}} \right) \times 100$$

II) Eficiência relativa controle com 20 % N da solução Hoagland

$$ERIC = \left( \frac{MSPI \text{ de cada tratamento}}{MSP \text{ controle 20 \% N da solução Hoagland}} \right) \times 100$$

III) Eficiência relativa com 100 % N da solução Hoagland

$$ER_{100 \% N} = \left( \frac{MSPI \text{ de cada tratamento}}{MSP \text{ controle 100 \% N da solução Hoagland}} \right) \times 100$$

#### 4.2.5 Análise estatística

Os dados *in vitro* foram agrupados a 100% de similaridade pelo modelo Jaccard e algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). Já para os biométricos da planta foram previamente tratados eliminando os outlier e transformados por log10, para atender as premissas de análise de variância, normalidade e homocedase. Quando apropriado foi aplicado o teste de Dunnett a 10% de probabilidade, fazendo comparações múltiplas dos tratamentos com isolados separadamente para cada tratamento controle. Assim como o teste de Tukey a 10% de probabilidade, fazendo comparações múltiplas das médias.

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 8 – Mecanismos de promoção de crescimento in vitro avaliados dos isolados na *Digitaria eriantha* em Araripina, PE (Continua)

Isolados	Sequências mais similares no banco de dados	AIA $\mu\text{g.ml}^{-1}$	IS	FBN <i>in vitro</i>	HCN	PS
121A	<i>Enterobacter</i>	43,86	0,94	+	-	1,03
121B1	Não sequenciada	192	-	+	-	1,17
183C1	<i>Beijerinckia</i>	224,05	-	+	-	1,1
188B	<i>Staphylococcus</i>	226,38	-	+	-	1,11
192C	<i>Alcaligenes</i>	185,43	5,11	+	-	0,29
193A	<i>Enterobacter</i>	201,57	-	+	-	0,98
195C1	<i>Stenotrophomonas</i>	192,9	-	-	-	0,94
199B	<i>Pseudomonas</i>	18,76	2,08	+	-	0,33
199C	<i>Pseudomonas</i>	69,33	4,7	-	-	0,29
219B	<i>Rhizobium</i>	24,05	-	+	-	1,18
225B	Não sequenciada	63,9	-	+	-	1
252A	<i>Pantoea</i>	8,57	6,78	+	-	0,83
270B	<i>Bacillus</i>	20,71	-	+	+	1,18
270C	<i>Rhizobium</i>	227,9	-	+	-	1,13
273C	<i>Rhizobium</i>	26,19	-	+	+	0,92
288C	<i>Enterobacter</i>	192,33	4,11	-	-	1,15
289A	Bactéria não cultivada	191,57	7,26	-	-	0,69
294A	<i>Pantoea</i>	191,95	-	-	-	1,2
294D	<i>Curtobacterium</i>	37,86	-	-	-	1,06
297A	Não sequenciada	68,76	-	+	-	1,16
331C	<i>Rhizobium</i>	10,1	-	+	-	1,11
334C1	<i>Erwinia</i>	211,9	9,2	-	-	0,93
335C	<i>Rhizobium</i>	80,9	9,75	-	-	1,24
338A	<i>Rhizobium</i>	25,48	-	+	-	1,19

Tabela 8 – Mecanismos de promoção de crescimento *in vitro* avaliados dos isolados na *Digitaria eriantha* em Araripina, PE

(Continua)

Isolados	Sequências mais similares no banco de dados	AIA µg.ml <sup>-1</sup>	IS	FBN <i>In vitro</i>	HCN	PS
344B1B	<i>Beijerinckia</i>	18,57	-	+	-	1,06
347B	<i>Exanguobacterium</i>	11,19	5,73	+	-	0,99
357A	<i>Bacillus</i>	21,24	-	+	-	1,16
359C	<i>Enterobacter</i>	146,43	6,53	+	-	1,11
361B	<i>Rhizobium</i>	179,67	2,36	+	+	1,1
363A	Não sequenciada	41,67	-	+	-	0,94
364A	<i>Rhizobium</i>	108,43	-	+	-	1,13
365A	<i>Pantoea</i>	14,9	10,95	+	-	1,16
372B	<i>Burkholderia</i>	212,38	14,6	+	-	1,23
374B	<i>Enterobacter</i>	12,38	7,28	+	-	0,17
375B	<i>Rhizobium</i>	85,38	-	-	-	0,62
376A	<i>Stenotrophomonas</i>	33,81	9,46	+	+	0,75
377C	<i>Enterobacter</i>	25,33	3,89	+	-	0,84
377D	<i>Pantoea</i>	175,05	-	+	-	1,13
389B	<i>Erwinia</i>	128,86	2,63	+	-	0,81
400B	<i>Enterobacter</i>	194,14	6,05	+	-	1,03
403B	<i>Rhizobium</i>	20,29	-	+	-	0,94
406A	<i>Kocuria</i>	82,24	5,44	-	-	1,25
416A	<i>Pantoea</i>	115,57	1,51	+	-	1,01
416B	Não sequenciada	24,52	2,31	+	-	0,22
416D	Não sequenciada	34,9	5,05	+	-	1,23
5005	<i>Shinella</i>	54,57	-	+	-	0,53
5007	<i>Stenotrophomonas</i>	145,67	-	-	-	1,07
5010	<i>Shinella</i>	166,43	-	+	-	1,11
5012B	<i>Microbacterium</i>	20,67	-	-	-	0,96
5021	<i>Rhizobium</i>	92,29	-	-	-	1,16

**Tabela 8** – Mecanismos de promoção de crescimento in vitro avaliados dos isolados na *Digitaria eriantha* em Araripina, PE

(Continua)

Isolados	Isolados	Isolados	Isolados	Isolados	Isolados	Isolados
5025	<i>Massilia</i>	202,71	-	+	-	0,69
5057A	<i>Shinella</i>	44,38	-	+	-	1,08
5068	<i>Enterobacter</i>	157,43	-	+	-	0,92
5088	Nocardioides	203,81	-	+	-	0,93
5095	<i>Enterobacter</i>	34,71	14,81	+	-	0,37
5098	Nocardioides	38,38	-	-	-	1,16
5102	<i>Shinella</i>	40,33	-	+	-	0,72
5103	Não sequenciada	41,14	-	-	+	0,43
5112	<i>Sphingomonas</i>	40,38	-	-	+	1,16
5167	<i>Stenotrophomonas</i>	27,71	-	+	+	0,84
5172b1	<i>Enterobacter</i>	28,14	-	+	+	1,19
5175	Não sequenciada	26,1	-	-	+	1,17
5185	Não sequenciada	16,19	-	+	-	0,53
5186B	Não sequenciada	34,81	-	-	-	0,69
5195	<i>Pseudomonas</i>	180,14	4,13	+	-	0,97
5197A	Não sequenciada	201,81	-	+	+	0,98
5200	<i>Stenotrophomonas</i>	194,9	-	+	+	0,51
5207	Não sequenciada	165,48	3,62	-	-	0,1
5216	<i>Microbacterium</i>	68,38	-	-	-	0,6
5242	<i>Stenotrophomonas</i>	238,19	-	+	-	0,91
5255	Não sequenciada	181,9	-	-	-	1,08
5289	<i>Bactéria não cultivada</i>	28,67	-	-	-	0,5
5290	<i>Pseudomonas</i>	50,38	-	-	-	0,73
5294	<i>Pseudomonas</i>	164,29	-	+	-	0,42
5297	<i>Rhizobium</i>	196	-	+	-	1,17
5338	<i>Enterobacter</i>	19,48	3,19	-	-	0,89
5377EA	<i>Pseudomonas</i>	34,62	-	+	-	0,69

**Tabela 8** – Mecanismos de promoção de crescimento *in vitro* avaliados dos isolados na *Digitaria eriantha* em Araripina, PE (Conclusão)

<b>Isolados</b>	<b>Isolados</b>	<b>Isolados</b>	<b>Isolados</b>	<b>Isolados</b>	<b>Isolados</b>	<b>Isolados</b>
5378EB	<i>Stenotrophomonas</i>	18,52	-	+	-	0,39
5379A	<i>Stenotrophomonas</i>	27,57	2,92	-	-	0,78
5388	<i>Shinella</i>	16,48	-	+	-	1,11

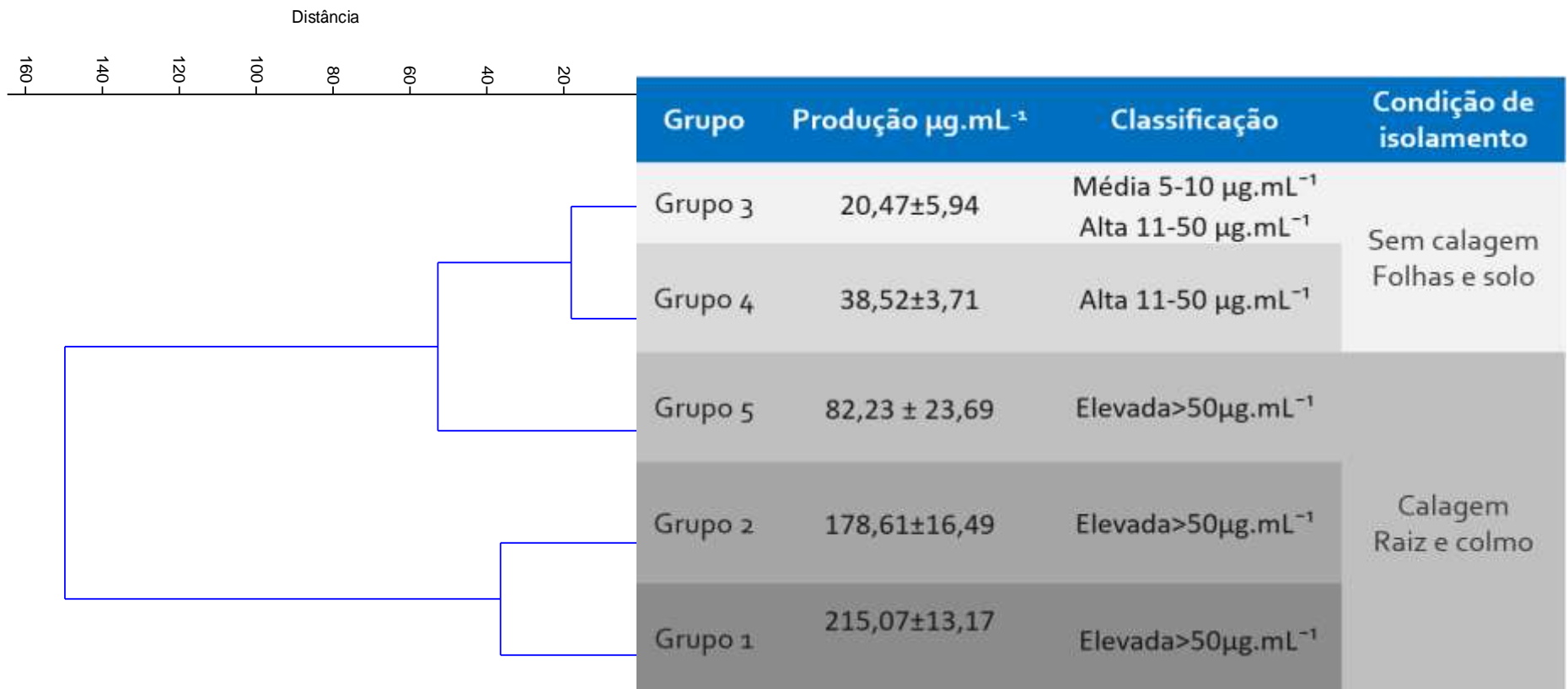
AIA = Ácido indolacético; IS = Índice de solubilização de fosfato; FBN *in vitro* = Fixação biológica de nitrogênio *in vitro*; HCN = Ácido cianídrico; PS = Produção de sideróforos; +=Positivo para o mecanismo; -=Negativo para o mecanismo

#### 4.3.1 Avaliação da produção de ácidos indolacético (AIA)

Formaram cinco grupos ao nível de 70% de similaridade (Figura 8), com médias variando de 20 a 215  $\mu\text{g. mL}^{-1}$ . De acordo com a classificação descrita no trabalho de Kavamura (2012), os isolados que prevaleceram foram aqueles com produção alta e elevada, respectivamente, 46% e 51%, não ocorrendo isolados com baixa produção de AIA.

Comparando área com calagem e sem 60 % dos isolados como elevadas produções de AIA vieram da área com aplicação de calcário, enquanto dentre os isolados da área sem calagem predominaram os isolados com alta produção.

Já comparando o local de isolamento (folha, colmo, raiz e rizosfera), mais de 50% dos isolados de raiz e colmo apresentaram produção elevada, enquanto os isolados de folhas e solo foram em sua maioria de alta produção de AIA. No trabalho de Patel e Archana (2017), também encontraram bactérias endofíticas na folha, colmo e raiz do trigo produzindo AIA entre 33,8 e 890,66  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , embora outros trabalhos tenham encontrado valores entre 0,2 e 131  $\mu\text{g.ml}^{-1}$  (MACHADO et al., 2013; FERNANDES-JÚNIOR et al., 2015; FIGUEREDO et al., 2016; SAHUR et al., 2017). A variabilidade na produção de AIA pelos isolados foi encontrada também nos resultados de Shukla et al. (2018).



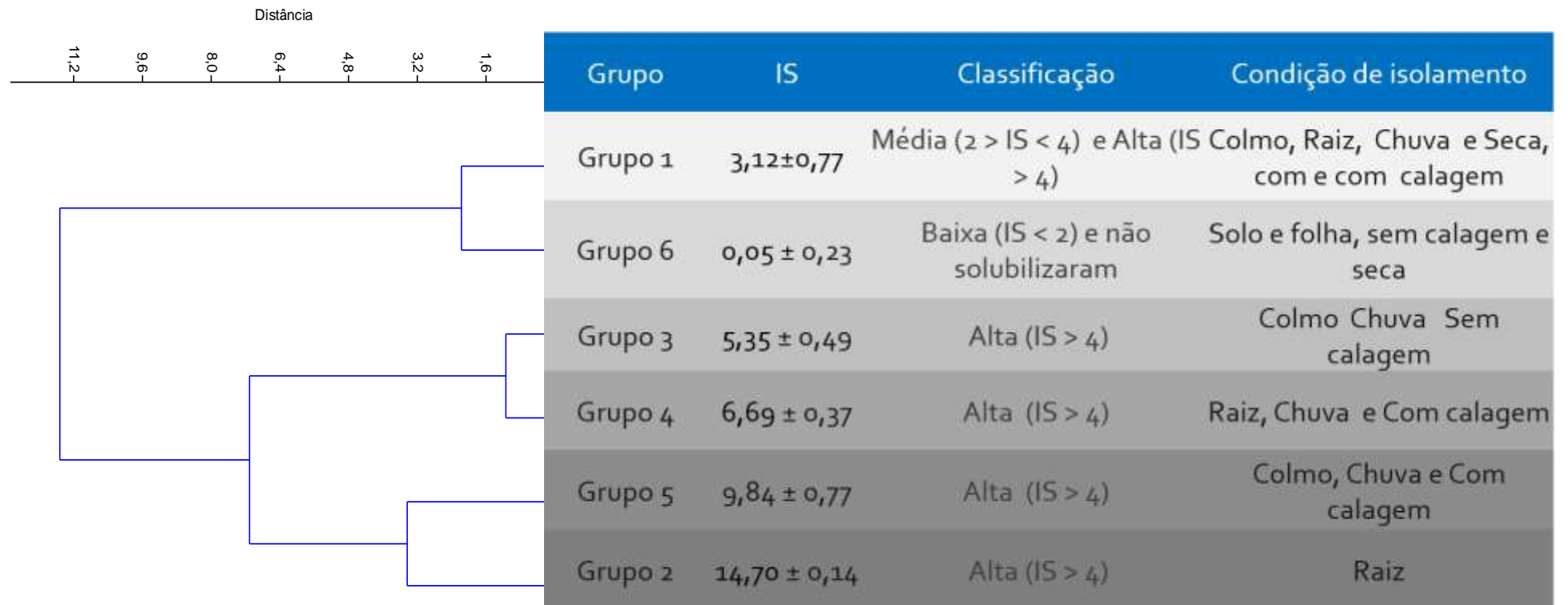
**Figura 8** – Formação dos grupos das bactérias endofíticas produtoras de AIA a 100% de similaridade

#### 4.3.2 Avaliação da Solubilização de fosfato

Foi observado halo de solubilização em apenas 35% dos 80 isolados selecionados, com Índice de solubilização (IS) variando entre 0,99-14,60. Dos isolados que solubilizaram fosfato 7% tiveram baixa ( $IS < 2$ ), 29% média ( $2 > IS < 4$ ) e 64% dos isolados tiveram alta ( $IS > 4$ ) solubilização de acordo com a classificação de Chagas junior et al. (2010). Não foram obtidos isolados com alta solubilização de fosfato a partir do solo rizosférico. Também não encontrados IS médio na área que tinha recebido calagem ou IS de fosfato baixo dos isolados da folha e colmo, estação seca e nos meios JNFB e JMV.

Seis grupos foram formados a 70% de similaridade IS (Figura 9). Destes, no grupo 6 estão os representantes que não solubilizaram ou tiveram isolados com baixo índice de solubilização. No grupo 1, reuniram-se todos os isolados com índice de solubilização (IS) médio e representantes com índice solubilização de fosfato alto. Para os demais grupos, todos os isolados apresentaram alto índice de solubilização de fosfato.





**Figura 9** – Formação dos grupos das bactérias endofíticas solubilizadoras de fosfato a 100% de similaridade

### **4.3.3 Crescimento em meio sem N – avaliação qualitativa da fixação biológica de nitrogênio**

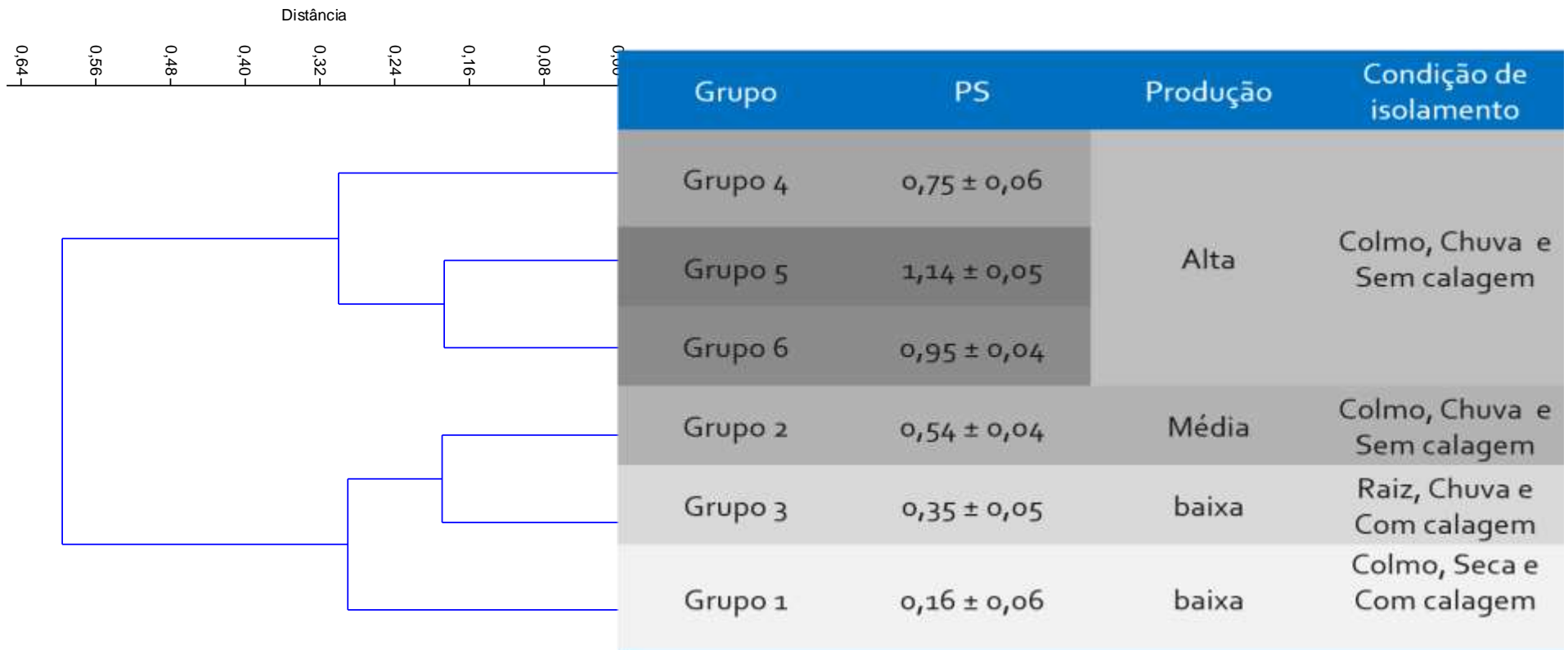
A maioria, 69%, dos isolados apresentou formação da película, indicativo de serem fixadoras de N. Os isolados que apresentaram a formação da película, predominaram os oriundos de colmo e raiz, respectivamente, 40% e 32,7%, no período chuvoso e na área sem calagem com 61% em ambos, bem como os isolados obtidos com os meios JNFB e NFB, respectivamente, 42% e 40%.

### **4.3.4 Avaliação da produção de Sideróforos**

Foram formados 6 grupos a 70 % de similaridade, (Figura 10) quanto à produção de sideróforos. Os isolados que tiveram produção baixas ( $0,16 \pm 0,06$  e  $0,35 \pm 0,05$ ) (Tabela 8), prevaleceram no colmo e raiz, comparando o local de isolamento, em proporções acima de 60%. Já entre as estações, 66% na estação seca e 100% na estação chuvosa. Entre as áreas com aplicação de calcário ou não, prevaleceram isolados na área com calagem com porcentagem acima de 60% os dois grupos, e entre os meios semissólidos, o JMV e JNFB prevaleceram acima de 66%.

Já os isolados com produção média ( $0,54 \pm 0,04$  e  $0,73 \pm 0,06$ ) de sideróforos foram vieram 50 % no colmo, comparando o local de isolamento (folha, colmo, raiz e rizosfera). Em relação as estações, áreas com aplicação de calcário e meios semissólidos, respectivamente, tiveram 100% dos isolados no período da chuva, mais de 90 % na área sem calagem e mais de 75% isolados no meio JMV.

Por fim, os isolados com maior produção de sideróforos ( $1,14 \pm 0,05$  e  $0,95 \pm 0,04$ ) prevaleceram com 45% isolados no colmo, comparando os locais de isolamento (folha, colmo. raiz e rizosfera). Nas estações e área com aplicação de calcário, prevaleceu o período de chuva, área sem calagem, e mais de 50% dos isolados nos meios JNFB e NFB.



**Figura 10** – Formação dos grupos das bactérias endofíticas produtores de sideróforos a 100% de similaridade

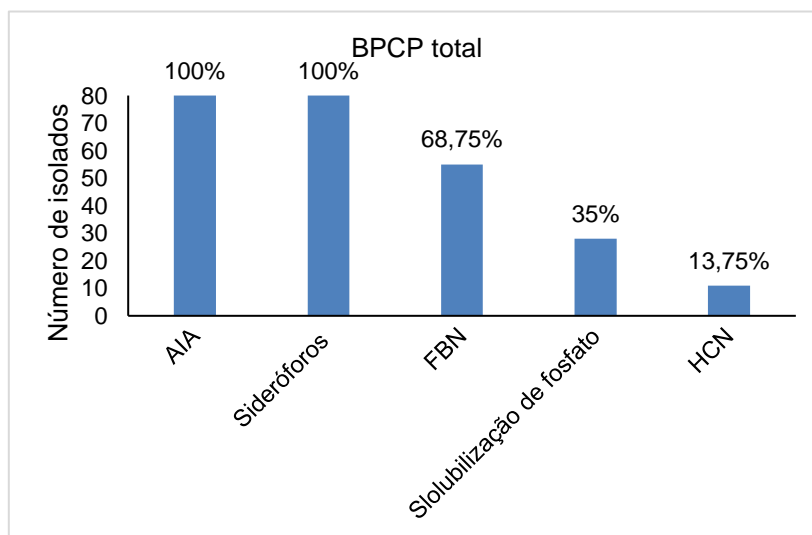
#### 4.3.5 Avaliação da produção de HCN

Onze isolados foram identificados como produtores de HCN pela avaliação qualitativa (Tabela 8) 60% dos quais foram obtidos do colmo, 73% da área se calagem, 63% da estação seca e também 63% do NFB. As bactérias produtoras de HCN neste trabalho não foram encontradas na rizosfera da planta como é relatada no trabalho de Verma et al. (2013) e Singh et al., (2015).

Além disso, a produção de HCN por isolados bacterianos pode estar relacionada com a solubilização de fosfato. Neste trabalho, o isolado 376 A (*Stenotrophomona*) além de produzir HCN, solubilizou fosfato. Resultado semelhante foi encontrado por Shukla et al. (2018), que demonstraram essa correlação entre produtores de HCN e solubilização de fosfato.

#### 4.3.6 Ligação dos mecanismos promotores de crescimento *in vitro* e a identificação dos isolados pelo sequenciamento parcial do 16S rRNA

Todos os isolados produziram AIA e sideróforos, com a maioria dos isolados apresentando alta produção de AIA, acima de  $50 \mu\text{g. mL}^{-1}$  (Tabela 8) enquanto 69, 35 e 14% dos isolados eram positivos para FBN, solubilizaram Fósforo e positivo para HCN, respectivamente (Figura 11).



**Figura 11** – Isolados diazotróficos avaliados *in vitro* para características associadas a promoção de crescimento (AIA, sideróforos, Redução de acetileno, solubilização de fosfato e produção de HCN)

Quando os 80 isolados bacterianos foram agrupados pelo conjunto dos mecanismos de promoção de crescimento, foram formados sete grupos (Figura 12).

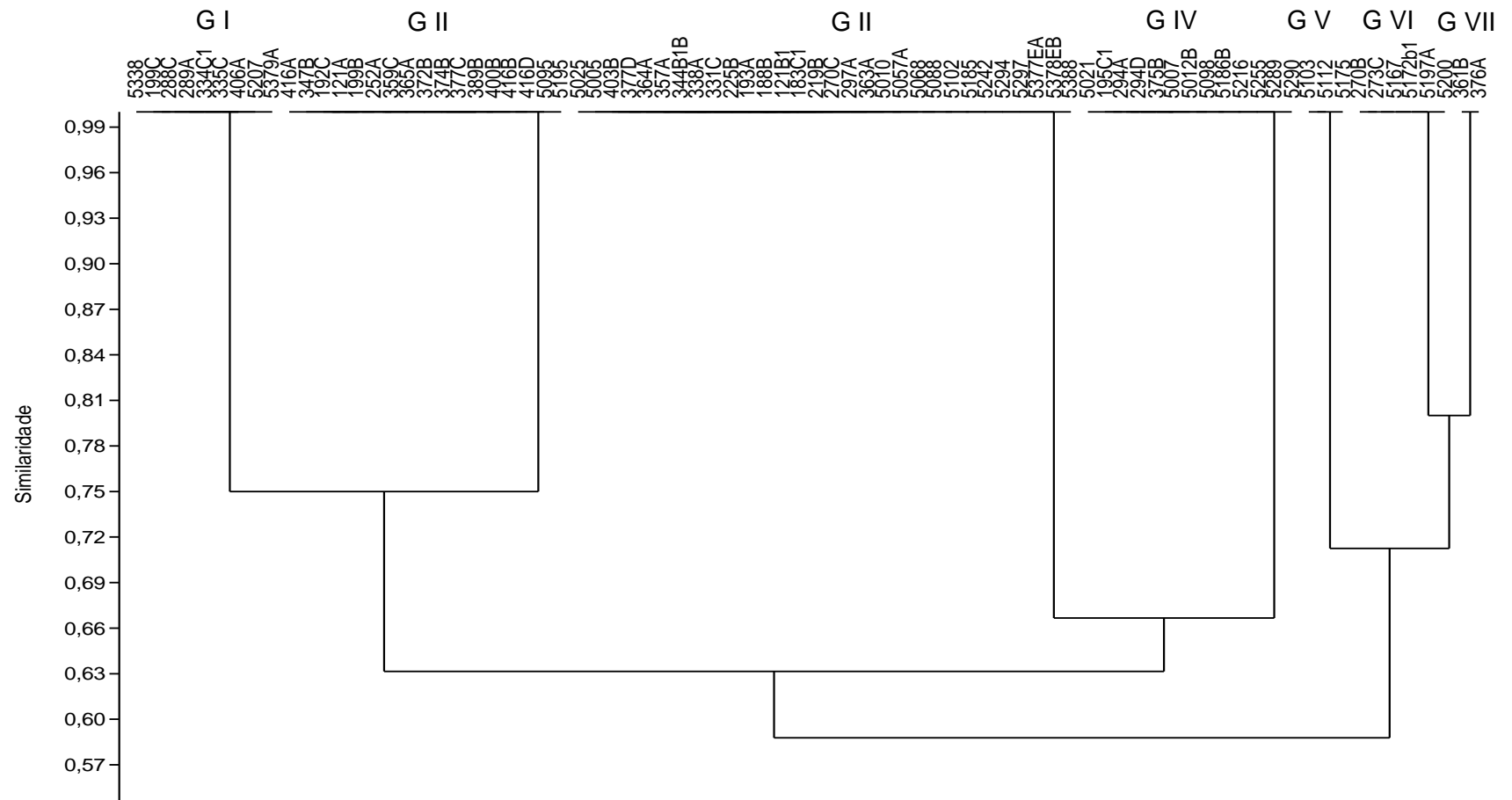
No grupo 7, os isolados 376A (*Stenotrophomonas*) e 361B (*Rhizobium*)

apresentaram todos os mecanismos avaliados (AIA, Solubilização de fosfato, FBN, HCN e Sideróforos), com produção de AIA elevada e índice de solubilização de fosfato alto e médio, respectivamente, 376A e 361B. Ambos foram isolados no período chuvoso, no meio JNFB, nas duas áreas sem calagem e com calagem e nas partes folha e raiz.

O *Rhizobium* e *Stenotrophomonas*, são descritos na literatura associados na rizosfera das Fabaceae (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2010) e não leguminosas (HAIYAMBO; CHIMWAMUROMBE; REINHOLD-HUREK, 2015) apresentando diversos mecanismos de promoção de crescimento, resultados semelhantes a este trabalho, como a fixação de nitrogênio, produção de ácido indolacético (MACHADO et al., 2018; KANG et al., 2018; HAIYAMBO; CHIMWAMUROMBE; REINHOLD-HUREK, 2015), produção de sideróforos (KANG et al., 2018; ETESAMI; ALIKHANI, 2016), produção de HCN, solubilização de fosfato (ABDELKRIM et al., 2018; PÉREZ-CORDERO; CHAMORRO-ANAYA; ZOOTECA, 2018; PATEL; SARAF, 2017). Shukla et al. (2018) verificaram que as interações das bactérias produtoras de sideróforos e ácido cianídrico aumentaram a solubilização de fosfato. Na formação dos grupos não foi verificado essa interação. Entretanto, o isolado 376A (*Stenotrophomonas*) apresentou elevada solubilização de fosfato, produção de HCN e sideróforos.

Já no grupo 6, os isolados agrupados foram os que tiveram produção de AIA elevada e alta (66% e 34%), índice solubilização de fosfato médio e baixo (17% e 83%), FBN (50%) e HCN (63%), tiveram como representantes 270B (*Bacillus*), 273C (*Rhizobium*), 5338 (*Enterobacter*). Resultados parecidos também foram encontrados no trabalho de Rodrigues et al. (2016); para *Enterobacter* capaz de produzir ácido indolacético, solubilizar fosfato e fixar nitrogênio. Já a produção de HCN e sideróforos como aconteceu neste trabalho foram relatadas nos trabalhos de Sarkar et al. (2018) e Xu et al. (2018), respectivamente. O *Bacillus* por sua vez, apresentou resultados semelhantes aos que Sinha et al., (2019), fixaram nitrogênio, produziu AIA, solubilizou fosfato. A produção de sideróforos convergiram com o trabalho de Kumar et al. (2017) e HCN com os relatos de Marag e Suman (2018).

No grupo 5, ficaram os que tiveram produção elevada de AIA e solubilização baixa de fosfato, HCN e FBN com 33% dos isolados para cada mecanismo, incluindo representantes dos gêneros *Nocardioides* (5098), *Shinella* (5102) e *Sphingomonas* (5112).



**Figura 12** – Formação dos grupos de acordo com os mecanismos de promoção de crescimento in vitro produção de ácido indolilacético (AIA), índice de solubilização de fosfato (IS), fixação biologia de N2 (FBN in vitro), produção ácido cianídrico (HCN) e produção de sideróforos (PS) do capim pangolão, isolados na pastagem do Nordeste brasileiro

Zappelini et al. (2018) verificaram que os *Nocardioides* também produziram sideróforos, mas não foram encontrados relatos na literatura sobre a solubilização de fosfato *in vitro*, embora Mander et al. (2012), tenham encontrado que bactérias da família Nocardiaceae disponibilizaram fósforo em condições semelhante a campo, indicando também a solubilização de fosfato.

A produção de HCN por *Sphingomonas* também não foi encontrada na literatura. Mas resultados de produção de AIA e sideróforos também foram verificados por Xu et al. (2018). Já para *Shinella*, verificou-se relatos que também produziram AIA e fixaram nitrogênio no trabalho de Taulé et al. (2012) e sideróforos no trabalho de Saïdi et al. (2013).

O Grupo 4 agrupou os isolados com índice solubilização de fosfato alto (84%), produção de HCN (7%), FBN (38%) e os isolados que não apresentaram produção média de AIA. Como representantes tiveram: *Stenotrophomonas* (195c1 e 5007), *Pantoea* (294A), *Curtobacterium* (294D), *Rhizobium* (375B), *Microbacterium* (5012B), *Pseudomonas* (5377) e *Nocardioides* (5088).

A *Pantoea* como no trabalho de Rodrigues et al. (2016), produziu ácido indolacético, solubilizou fosfato, fixou nitrogênio e produziu HCN. A *Pseudomonas* tiveram resultado similar ao de Sinha et al. (2019) produziram sideróforos fixaram nitrogênio e produziram AIA. As bactérias solubilizadoras de fosfato. e produção de HCN deste gênero foram parecidos com os observados por Kizhakedathil e Devi (2018).

Nos grupos 2 e 3, prevaleceram os isolados positivos para FBN *in vitro* (86% e 100%), solubilização alta de fosfato (86% e 53%), HCN (5 e 6%) e produção de AIA elevada (53% e 58%) e alta (40% e 41%). Não apresentaram isolados com produção média de AIA no grupo 2. Como representantes tiveram: *Shinella* (5068), *Massilia* (5025), *Pantoea* (416A), *Erwinia* (389B), *Burkholderia* (372b), *Beijerinckia* (344b), *Exiguobacterium* (347b) *Staphylococcus* (188b) *Alcaligenes* (192C) e *Bacillus* (357A).

As *Burkholderia* e *Exiguobacterium* também foram relatadas na literatura com produção de AIA, FBN, solubilização fosfato e produção de sideróforos, PANDEY; BHATT, 2016; VERMA et al., 2016; CHIMWAMUROMBE; GRÖNEMEYER ; REINHOLD-HUREK, 2016; SANTOS et al., 2016; DEFEZ; ANDREOZZI; BIANCO, 2017;. Já o *Staphylococcus* sp. a produção de sideróforos foi semelhante aos resultados encontrado por Marag e Suman, (2018) e AIA aos de Yan et al. (2018). Em relação a *Beijerinckia* a presentaram FBN, produção de AIA igual relatado no trabalho

de Chumpoo et al. (2018) e sideróforos na pesquisa de Niehus et al. (2017). As *Erwinia*, por sua vez, também produziram sideróforos, ácido indolacético e solubilizaram fósforo no Sagar et al. (2018).

Para as *Massilia* também foram encontrados produção de AIA no trabalho de Tani et al. (2011) e sideróforos (CHIMWAMUROMBE; GRÖNEMEYER; REINHOLD-HUREK, 2016). Quanto à FBN não foram encontrados relatos na literatura consultada. A *Alcaligenes* também produziu sideróforos (SAYYED; CHINCHOLKAR, 2009), fixou nitrogênio (BERGMANN et al., 2009), solubilizou de fósforo e produziu AIA (KAKAR et al., 2018).

Por fim, os isolados do grupo 1, não apresentaram produtores de HCN, produção média de AIA e solubilização de fósforo média. Como representantes tiveram: *Enterobacter* (288C) bactéria não cultivada (289A), *Erwinia* (344c), *Rhizobium* (335C), *Kocuria* (406A) e *Shinella* (5388). Já a *Kocuria* também produziram AIA, sideróforos e solubilizaram fósforo igual aconteceu no trabalho de Goswami et al. (2014). Por fim, também foi verificado que as *Curtobacterium* e *Microbacterium* também produziram sideróforos como encontrado no trabalho de Costerousse et al. (2018) e AIA Verma e White, (2018).

#### **4.3.7 Eficiência das bactérias promotoras de crescimento no desenvolvimento do milho.**

Foram encontradas diferenças significativas entre os isolados e os tratamentos controle com 20% de N da solução Hoagland e inoculante comercial com estirpes do *Azospirillum brasilense* (Ab-v5 e ab-v6), pelo teste de Dunnet-hus ( $p \leq 0,10$ ), mas não com o tratamento controle 100% de N da solução Hoagland (Tabela 9). Vinte e dois isolados foram capazes de influenciar positivamente em altura, comprimento radicular, área foliar e massa seca parte aérea na comparação com o controle não inoculado, dos quais dois apresentaram maior número de comparações significativas, com quatro variáveis. O isolado 195 C (*Stenotrophomonas*) apresentou dois mecanismos promoção de crescimento AIA e produção de sideróforos. Enquanto o isolado 5242 (*Stenotrophomonas*), que apresentou três mecanismos de promoção de crescimento de AIA, FBN e sideróforos.



**Tabela 9** – Comparações dos tratamentos com isolados com os controles, pelo teste de Dunnett a 10% de probabilidade em negrito, após 35 dias em sistema hidropônico

(Continua)

Isolados	(cm)	CR (cm)	(mm)	(cm <sup>2</sup> )	(mg)	(mg)	MST (mg)	(%)	ERNI (%)	(%)
<b>Cont. 20% de N da sol. Hoag</b>	15	17	3	177	154	113	246	36	48	61
<b>121A</b>	22	22	5	391	140	260	830	89	166	210
<b>121B1</b>	18	29	<b>6</b>	273	180	<b>400</b>	860	97	171	279
<b>183C1</b>	<b>25</b>	23	5	355	180	300	730	84	143	181
<b>188B</b>	22	19	4	496	210	310			830	120
<b>192C</b>	18	26	5	226	210	210			410	61
<b>193A</b>	<b>50</b>	42	4	<b>749</b>	190	320	1230	180	247	311
<b>195C1</b>	<b>35</b>	30	<b>5</b>	<b>716</b>	150	<b>390</b>	1080	156	214	270
<b>199B</b>	21	28	4	250	180	250	690	100	137	173
<b>199C</b>	22	25	5	352	130	<b>360</b>	800	116	156	196
<b>219B</b>	24	20	<b>5</b>	437	240	<b>350</b>	830	120	163	206
<b>225B</b>	23	28	5	258	120	<b>340</b>	810	117	158	200
<b>252A</b>	<b>30</b>	24	3	494	140	220	720	73	143	181
<b>270B</b>	<b>28</b>	24	4	298	130	290	730	108	144	182
<b>270C</b>	23	21	4	323	150	310	670	60	166	210
<b>273C</b>	22	<b>43</b>	5	<b>735</b>	240	<b>550</b>	1320	193	259	326
<b>288C</b>	<b>33</b>	28	5	<b>648</b>	120	300	830	121	165	208
<b>289A</b>	<b>26</b>	28	5	386	240	310	760	111	150	189
<b>294A</b>	23	18	3	289	130	190	390	57	77	97
<b>294D</b>	<b>37</b>	26	<b>5</b>	390	150	360	970	141	191	241
<b>297A</b>	<b>27</b>	31	4	319	200	360	500	46	99	124
<b>331C</b>	18	26	4	351	200	310	620	90	122	154
<b>334C1</b>	19	19	4	225	70	270	570	82	113	142

**Tabela 9** – Comparações dos tratamentos com isolados com os controles, pelo teste de Dunnett a 10% de probabilidade em **negrito**, após 35 dias em sistema hidropônico (Continua)

Isolados	A (cm)	CR (cm)	D (mm)	Á F (cm <sup>2</sup> )	MSPA (mg)	MSPR (mg)	MST (mg)	ERN (%)	ERNI (%)	ERC (%)
<b>335C</b>	21	21	3	299	90	190	530	77	105	132
<b>338A</b>	23	27	4	411	120	230	600	87	120	151
<b>344B1B</b>	<b>33</b>	32	5	496	150	260	830	120	163	205
<b>347B</b>	25	28	4	436	210	260	600	87	117	148
<b>357A</b>	23	25	5	455	100	<b>410</b>	960	140	189	238
<b>359C</b>	23	30	5	406	60	330	820	90	162	205
<b>361B</b>	21	32	4	549	200	200	0	74	123	155
<b>363A</b>	24	<b>41</b>	5	592	160	<b>400</b>	970	141	192	244
<b>364A</b>	<b>30</b>	29	5	586	130	270	520	75	104	131
<b>365A</b>	23	29	4	383	110	250	620	91	122	154
<b>372B</b>	16	15	3	202	260	170	480	69	94	119
<b>373C</b>	20	17	<b>5</b>	599	220	280	810	115	161	205
<b>374B</b>	27	25	5	361	150	310	820	118	160	202
<b>375B</b>	25	27	4	560	80	350	670	97	133	168
<b>376A</b>	18	21	3	190	100	170	270	39	54	68
<b>377C</b>	<b>26</b>	37	5	323	240	<b>390</b>	990	143	194	245
<b>377D</b>	23	22	4	230	170	200	380	55	74	93
<b>389B</b>	25	22	5	203	110	220	480	69	96	120
<b>400B</b>	<b>28</b>	30	<b>5</b>	606	90	260	670	96	130	164
<b>403B</b>	18	20	3	148	120	140	400	45	106	134
<b>406A</b>	23	28	4	314	90	220	450	37	88	110
<b>416A</b>	23	31	5	306	70	230	610	89	121	153
<b>416B</b>	23	22	4	<b>642</b>	90	350	<b>1040</b>	148	207	260

**Tabela 9** – Comparações dos tratamentos com isolados com os controles, pelo teste de Dunnett a 10% de probabilidade em **negrito**, após 35 dias em sistema hidropônico (Continua)

Isolados	A (cm)	CR (cm)	D (mm)	Á F (cm <sup>2</sup> )	MSPA (mg)	MSPR (mg)	MST (mg)	ERN (%)	ERNI (%)	ERC (%)
<b>331C</b>	18	26	4	351	200	310	620	90	122	154
<b>334C1</b>	19	19	4	225	70	270	570	82	113	142
<b>335C</b>	21	21	3	299	90	190	530	77	105	132
<b>338A</b>	23	27	4	411	120	230	600	87	120	151
<b>344B1B</b>	<b>33</b>	32	5	496	150	260	830	120	163	205
<b>347B</b>	25	28	4	436	210	260	600	87	117	148
<b>357A</b>	23	25	5	455	100	<b>410</b>	960	140	189	238
<b>359C</b>	23	30	5	406	60	330	820	90	162	205
<b>361B</b>	21	32	4	549	200	200	0	74	123	155
<b>363A</b>	24	<b>41</b>	5	592	160	<b>400</b>	970	141	192	244
<b>364A</b>	<b>30</b>	29	5	586	130	270	520	75	104	131
<b>365A</b>	23	29	4	383	110	250	620	91	122	154
<b>372B</b>	16	15	3	202	260	170	480	69	94	119
<b>373C</b>	20	17	<b>5</b>	599	220	280	810	115	161	205
<b>374B</b>	27	25	5	361	150	310	820	118	160	202
<b>375B</b>	25	27	4	560	80	350	670	97	133	168
<b>376A</b>	18	21	3	190	100	170	270	39	54	68
<b>377C</b>	<b>26</b>	37	5	323	240	<b>390</b>	990	143	194	245
<b>377D</b>	23	22	4	230	170	200	380	55	74	93
<b>389B</b>	25	22	5	203	110	220	480	69	96	120
<b>400B</b>	<b>28</b>	30	<b>5</b>	606	90	260	670	96	130	164
<b>403B</b>	18	20	3	148	120	140	400	45	106	134
<b>406A</b>	23	28	4	314	90	220	450	37	88	110
<b>416A</b>	23	31	5	306	70	230	610	89	121	153
<b>416B</b>	23	22	4	<b>642</b>	90	350	<b>1040</b>	148	207	260

**Tabela 9** – Comparações dos tratamentos com isolados com os controles, pelo teste de Dunnett a 10% de probabilidade em **negrito**, após 35 dias em sistema hidropônico (Continua)

Isolados	A (cm)	CR (cm)	D (mm)	Á F (cm <sup>2</sup> )	MSPA (mg)	MSPR (mg)	MST (mg)	ERN (%)	ERNI (%)	ERC (%)
<b>416D</b>	24	29	5	374	190	<b>360</b>	<b>910</b>	131	176	222
<b>5005</b>	28	33	5	454	170	270	670	120	132	165
<b>5007</b>	20	24	4	310	270	220	460	96	90	114
<b>5010</b>	24	22	3	154	170	220	370	66	74	93
<b>5012B</b>	<b>27</b>	29	5	481	160	320	<b>830</b>	54	162	205
<b>5021</b>	25	30	4	263	160	210	490	72	97	123
<b>5025</b>	19	22	4	175	150	180	380	55	74	93
<b>5057A</b>	26	31	5	482	260	270	600	87	118	150
<b>5068</b>	26	22	4	339	80	280	640	93	127	160
<b>5088</b>	23	19	3	244	120	270	560	82	111	139
<b>5095</b>	16	14	3	136	170	150	300	44	59	74
<b>5098</b>	19	17	3	259	230	350	560	55	77	97
<b>5102</b>	23	22	3	263	310	220	410	77	106	133
<b>5103</b>	30	25	5	397	110	250	740	109	149	187
<b>5112</b>	19	19	4	399	170	190	490	97	133	168
<b>5167</b>	19	33	4	566	210	300	<b>1120</b>	161	218	274
<b>5172b1</b>	24	19	4	359	200	250	710	103	139	176
<b>5175</b>	22	25	4	551	210	300	680	98	134	169
<b>5185</b>	22	20	5	417	130	390	650	93	129	225
<b>5186B</b>	<b>29</b>	26	<b>5</b>	<b>571</b>	170	300	<b>910</b>	132	179	163
<b>5195</b>	23	21	4	278	210	280	500	55	98	160
<b>5197A</b>	16	19	4	172	160	150	330	48	66	84
<b>5200</b>	23	26	4	397	280	290	610	88	121	152

**Tabela 9** – Comparações dos tratamentos com isolados com os controles, pelo teste de Dunnett a 10% de probabilidade em **negrito**, após 35 dias em sistema hidropônico (Continua)

Isolados	A (cm)	CR (cm)	D (mm)	Á F (cm <sup>2</sup> )	MSPA (mg)	MSPR (mg)	MST (mg)	ERN (%)	ERNI (%)	ERC (%)
<b>5207</b>	22	19	4	<b>1338</b>	180	380	<b>1060</b>	154	207	259
<b>5216</b>	22	20	3	348	210	280	740	108	146	185
<b>5242</b>	<b>40</b>	35	5	<b>607</b>	<b>320</b>	<b>470</b>	<b>1240</b>	180	245	309
<b>5255</b>	15	20	3	219	270	220	440	64	87	109
<b>5289</b>	26	25	4	302	210	270	690	98	135	169
<b>5290</b>	<b>33</b>	25	4	545	200	330	820	118	163	206
<b>5294</b>	19	20	4	258	320	220	340	49	66	83
<b>5297</b>	24	19	3	411	150	260	800	95	159	201
<b>5338</b>	25	24	5	360	200	340	520	121	166	209
<b>5377EA</b>	21	19	4	254	200	260	490	74	104	132
<b>5378EB</b>	26	18	5	221	150	290	390	72	98	124
<b>5388</b>	17	26	5	<b>625</b>	160	300	840	56	102	96
<b>5379A</b>	<b>31</b>	19	4	151	100	220	520	74	77	129

**Tabela 9** – Comparações dos tratamentos com isolados com os controles, pelo teste de Dunnett a 10% de probabilidade em **negrito**, após 35 dias em sistema hidropônico (Conclusão)

<b>Cont. Comercial</b>	18	29	4	306	173	247	680	99	134	92
<b>193A</b>	<b>50</b>	42	4	749	189	320	1230	180	247	311
<b>195C1</b>	<b>35</b>	30	<b>5</b>	716	151	391	1081	156	214	270
<b>273C</b>	22	43	5	<b>735</b>	238	546	1325	193	259	326
<b>288C</b>	33	28	5	<b>648</b>	124	303	832	121	165	208
<b>344B1B</b>	<b>33</b>	32	5	496	153	261	826	120	163	205
<b>416B</b>	23	22	4	<b>642</b>	92	347	1039	148	207	260
<b>5186B</b>	29	26	5	<b>571</b>	169	300	908	132	179	163
<b>5207</b>	22	19	4	<b>1338</b>	181	382	1059	154	207	259
<b>5242</b>	<b>40</b>	35	5	<b>607</b>	321	465	1237	180	245	309
<b>5388</b>	17	26	5	<b>625</b>	160	297	838	56	102	96
<b>Cont. 100% de N da sol. Hoag</b>	24	26	3	179	130	190	370	54	73	169
<b>r<sup>2</sup></b>	0,45	0,41	0,37	0,42	0,33	0,36	0,39	0,48	0,42	0,42
<b>CV</b>	9,98	10,13	21,79	11	13	9,84	0,42	0,22	11,47	11,41

Cont 20% de N da sol. Hoag = controle 20% de N da solução de hoagland; Cont. Comercial = controle comercial; Cont.100% de N da sol. Hoag = cont 100% de N da solução de hoagland; A= altura; C=Comprimento radicular; DC= diâmetro do colo; ÀF= área foliar; MSPA= massa seca parte aérea; MST= massa seca total; ERN= eficiência relativa não inoculado; ERI= eficiência relativa com Inoculante comercial; EFC= eficiência relativa com 100% N. Com comparações de acordo com o teste de Dunnett a 10% de probabilidade em **negrito** para comparações entre os tratamentos com isolados e controles.

Na variável massa seca total dezenove tratamentos com isolados tiveram comparações superiores (80 a 1,32 g) ao controle (0,24 g) com 20% de N da solução Hoagland, pelo teste de Dunnet-hus ( $p \leq 0,10$ ). Já para massa seca radicular onze isolados apresentaram comparações significativas, superiores (0,33 a 0,54 g) ao controle (0,11g). Em relação área foliar sete isolados foram superiores (571 a 1338 cm<sup>2</sup>) ao controle (176 cm<sup>2</sup>). Para o diâmetro do colo foram seis isolados que apresentaram comparações significativa superiores (4,94 a 5,51 mm) ao controle (2,82 mm). Em relação ao comprimento radicular três isolados foram superiores (40 a 42,94 cm) ao controle (14,99 cm). Por último, a variável altura dezoito isolados (50,44 a 25,43 cm) controle (14,00cm). Como pode ser observado, os isolados demonstram que promoveram crescimento no milho (Tabela 9).

Quando os isolados foram comparados com o controle comercial, as variáveis altura – 193A (*Enterobacter*), 195C (*Stenotrophomonas*), 344b1B (*Beijerinckia*), 5242 (*Stenotrophomonas*)– e área foliar – 193A (*Enterobacter*), 195C (*Stenotrophomonas*), 273C (*Rhizobium*), 288C (*Enterobacter*), 416B (não sequenciada), 5186B (não sequenciada), 5186b (não sequenciada), 5242 (*Stenotrophomonas*), 5338 (*Enterobacter*) – apresentaram comparações superiores. Assim, demonstrando que os isolados favoreceram o crescimento das plantas igual ou maior do que o inoculante comercial. Resultado semelhante foi encontrado na bioprospecção feita por Fernandes-Júnior et al. (2015), que os isolados encontrados foram melhores que a estipe Ab-V5 do *A. brasilense* recomendado para cultura do arroz. Também não houve diferenças significativa entre os isolados e os tratamentos controle 100% de N da solução Hoagland. Indicando que os isolados promoveram o crescimento na no milho tanto quanto o controle com 5x mais N. A capacidade desses isolados de aumentar o crescimento do milho na mesma taxa observada para as plantas no tratamento controle que receberam 100% de N da solução Hoagland indica que, neste experimento.

Quando os tratamentos foram comparados pelo teste de Tukey a 10%, as variáveis MSPA, MSPR, diâmetro de colo e ERN tiveram desempenho semelhante. Já as variáveis altura, ERNI e ERC o isolado 193A (*Enterobacter*) foi diferente do tratamento controle 20 % de N da solução de Hoagland. Como também, o isolado 273C (*Rhizobium*) apresentou diferença com o mesmo controle para as variáveis MST, ERNI e ERC. O mesmo aconteceu com o isolado 5242 (*Stenotrophomonas*) para variável altura e MST.

A variável comprimento radicular o tratamento com o isolado 5095 teve desempenho inferior aos outros tratamentos, mesmo apresentando quatro mecanismos de promoção de crescimento *in vitro* AIA, FBN, solubilização de fosfato e produção de sideróforos. Na variável área foliar, o tratamento supracitado juntamente com o tratamento contendo o isolado 403B (*Rhizobium*) apresentaram desempenho inferior em relação aos outros tratamentos. Mesmo o isolado 403B (*Rhizobium*) caracterizado com três mecanismos de promoção de crescimento *in vitro* AIA, FBN e produção de sideróforos.

No geral, os valores *in vitro* de produção de sideróforos e HCN, fixadoras de nitrogênio correlacionaram com as a variáveis altura, comprimento radicular e massa seca da parte radicular (Tabela 10). Os dados *in vitro* de AIA e solubilização de fosfato, apresentaram baixa correlação com as variáveis biométricas. Respectivamente, explicaram 44 e 60% do ganho no sistema radicular.

No geral, a inoculação com as bactérias endofíticas exerceu um aumento substancial nos parâmetros de crescimento das plantas. Resultado similar foi encontrado por Li et al. (2017), cujos isolados produtores de sideróforos, na avaliação *in vitro*, aumentaram significativamente o sistema radicular e parte aérea do milho.

**Tabela 10** – Coeficientes de correlação dos dados *in vitro* de promoção de crescimento com os dados da avaliação biométrica inoculada

<b>IS</b>	p	A	MSPR	EFC	ERN	ERI	MST	MSPA	AF	D	CR
	r <sup>2</sup>	0,22	0,21	0,18	0,18	0,18	0,18	0,14	0,13	0,12	0,06
<b>AIA</b>	p	A	MSPA	EFC	MST	ERI	ERN	CR	MSPR	AF	D
	r <sup>2</sup>	0,05	0,06	0,11	0,11	0,12	0,12	0,21	0,27	0,29	0,60
<b>HCN</b>	p	MSPR	AF	D	EFC	ERI	ERN	MST	MSPA	A	CR
	r <sup>2</sup>	0,10	0,10	0,10	0,10	0,09	0,09	0,09	0,07	0,03	0,02
<b>FBN</b>	p	AF	MSPA	ERI	EFC	ERN	MST	CR	D	A	MSPR
	r <sup>2</sup>	0,40	0,40	0,40	0,40	0,41	0,41	0,44	0,53	0,81	0,85
<b>PS</b>	p	MSPR	MST	ERI	EFC	ERN	AF	MSPA	D	CR	A
	r <sup>2</sup>	0,10	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,07	0,05	0,03	0,01
<b>IS</b>	p	AF	MSPA	ERI	EFC	ERN	MST	CR	D	A	MSPR
	r <sup>2</sup>	0,37	0,42	0,53	0,54	0,54	0,54	0,55	0,64	0,82	0,94
<b>FBN</b>	p	AF	MSPA	ERI	EFC	ERN	MST	CR	D	A	MSPR
	r <sup>2</sup>	0,11	0,10	0,07	0,07	0,07	0,07	0,04	0,03	0,02	0,01
<b>PS</b>	p	MSPR	MST	ERI	EFC	ERN	AF	MSPA	D	CR	A
	r <sup>2</sup>	0,33	0,36	0,53	0,53	0,55	0,55	0,73	0,79	0,83	0,95
<b>PS</b>	p	MSPR	MST	ERI	EFC	ERN	AF	MSPA	D	CR	A
	r <sup>2</sup>	0,15	0,08	0,08	0,08	0,08	0,07	0,04	0,01	0,01	0,01
<b>PS</b>	p	MSPR	MST	ERI	EFC	ERN	AF	MSPA	D	CR	A
	r <sup>2</sup>	0,19	0,47	0,47	0,48	0,48	0,52	0,70	0,90	0,91	0,91

p= probabilidade; Ps= produção de sideróforos; FBN=Fixação biológica de nitrogênio; IS= Índice de solubilização de fosfato; AIA=Produção de ácido indolacético; HCN =Produção de ácido cianídrico; A = altura; C=Comprimento radicular; DC= diâmetro do colo; ÅFT= área foliar total; MSPA= massa seca parte aérea; MST= massa seca total; ERN= eficiência relativa não inoculado; ERI= eficiência relativa com Inoculante comercial; EFC= eficiência relativa com 100% N



Esse fato pode estar relacionado com a grande funcionalidade dos sideróforos produzidos pelas BPCP em solubilizar e quelar ferro a partir de complexos orgânicos ou inorgânicos presentes no sistema (ARORA; VERMA, 2017), disponibilizando-o para as plantas e micro-organismos (McROSE et al., 2017). Como todos os isolados produziram sideróforos, podem ter estimulado o desenvolvimento das plantas de milho. Assim como, disponibilizado ferro para as bactérias fixadoras de nitrogênio poderem reduzir o  $N_2$  e aumentando a taxa de fixação de nitrogênio como descrito por McRose et al. (2017).

A produção de AIA *in vitro* não houve um padrão em relação à resposta *in vivo*. Os isolados 5242 (*Stenotrophomonas*), 5290 (*Pseudomonas*), 5207 (não sequenciada), 195C (*Stenotrophomonas*) e 377C, que promoveram o melhor desenvolvimento do milho tiveram produção de AIA superior a  $22.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  encontrada no trabalho de Li et al. (2017), de isolados na rizosfera do milho. Como também teve bactérias que apresentaram promoção de crescimento no milho com baixa produção de AIA *in vitro* (ARAUJO; GUERREIRO, 2010). Isso está relacionado a função do AIA bacteriano ser dependente dos níveis de AIA endógeno nas plantas, (BACKER et al., 2018).

Desta forma, o crescimento das plantas está relacionado com a expressão de várias características de promoção de crescimento, como foi observado neste trabalho e por Fernandes-Júnior et al. (2015). Esse fato pode ser observado nos isolados 5207 (Não sequenciada) e 195C (*Stenotrophomonas*), além de produzirem concentração de aia elevada, tiveram média e alta solubilização de fosfato, assim como o isolado 273C (*Rhizobium*) que apresentou FBN, produção de AIA, HCN e sideróforos. Desta forma se confirma a importância de selecionar bactérias *in vitro* para múltiplas características de BPCP e avaliá-las sob condições controladas em casa de vegetação (RANA et al., 2011).

#### 4.4 CONCLUSÕES

As bactérias apresentaram vários mecanismos de promoção de crescimento de planta *in vitro*. Os isolados promoveram o desenvolvimento do milho, em relação altura e comprimento radicular, sendo, portanto, promissores para serem utilizadas em novos testes.

## REFERÊNCIAS

ABDELKRIM, S.; JEBARA, S. H.; SAADANI, O.; CHIBOUB, M.; ABID, G.; JEBARA, M. Effect of Pb-resistant plant growth-promoting rhizobacteria inoculation on growth and lead uptake by *Lathyrus sativus*. **Journal of Basic Microbiology**, Hoboken, v. 58, n. 7, p. 579–589, 2018.

ANTUNES, J. E. L.; LYRA, M. C. C. P.; OLLERO, F. J.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, L. M. S.; ARAÚJO, A. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Diversity of plant growth-promoting bacteria associated with sugarcane. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão preto, v. 16, n. 2, 2017.

ARAUJO, F. F. DE; GUERREIRO, R. T. Bioprospecção de isolados de *Bacillus* promotores de crescimento de milho cultivado em solo autoclavado e natural. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 4, p. 837–844, 2010.

ARORA, N. K.; VERMA, M. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. **3 Biotech**, Heidelberg v. 7, n. 6, p. 1–9, 2017.

BACKER, R.; ROKEM, J. S.; ILANGUMARAN, G.; LAMONT, J.; PRASLICKOVA, D.; RICCI, E.; SUBRAMANIAN, S.; SMITH, D. L. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Context, Mechanisms of Action, and Roadmap to Commercialization of Biostimulants for Sustainable Agriculture. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 9, p. 1473, 23 2018.

BAKKER, A. W.; SCHIPPERS, B. MICROBIAL CYANIDE PRODUCTION IN THE RHIZOSPHERE IN RELATION TO POTATO YIELD REDUCTION AND SPP-MEDIATED PLANT GROWTH-STIMULATION. **Soil Biology e Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 4, p. 457, 1987.

BARRETO, M. DO C. S.; FIGUEIREDO, M. DO V. B.; SILVA, M. V. DA; ANDRADE, A. G. DE; OLIVEIRA, J. DE P. DE; ALMEIDA, C. M. A.; ARAÚJO, L. C. A. DE; JUNIOR, O. V. DOS R.; JUNIOR, M. U. F.; COSTA, A. F. DA; LIMA, V. L. DE M. Biotechnological Potential of Endophytic Bacteria to Improve the Micropropagated Seedling of Variety RB92579 Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **Advances in Microbiology**, Califórnia, v. 08, n. 11, p. 859–873, 2018.

BERGMANN, D.; ZEHFUS, M.; ZIERER, L.; SMITH, B.; GABEL, M. Grass Rhizospheres: Associated Bacterial Communities and Potential for Nitrogen Fixation. **Western North American Naturalist**, v. 69, n. 1, p. 105–114, 2009.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. DE; URQUIAGA, S.; REIS, V. M.; OLIVARES, F. L. DE; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, n. 1–2, p. 195–209, 1995.

CATTELEAN, ALEXANDRE JOSE. **Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal** Embrapa soja. **Anais**.1999

- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A.N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum. Agronomy, Maringá**, v. 32, n. 2, p. 359–366, 2010.
- CHIMWAMUROMBE, P. M.; GRÖNEMEYER, J. L.; REINHOLD-HUREK, B. Isolation and characterization of culturable seed-associated bacterial endophytes from gnotobiotically grown Marama bean seedlings. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 92, n. 6, p. 1–11, 2016.
- CHUMPOO, P.; SHUTSRIRUNG, A.; Screening of N<sub>2</sub>-fixing and IAA producing bacteria and their potential use as biofertilizer for rice **Asia - Pacific Journal of Science and Technology biofertilizer**. Khon Kaen v.23, n.3, p. 1–10, 2018.
- CONAB; COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**: 1. Brasília: 2017.
- COSTEROUSSÉ, B.; SCHÖNHOLZER-MAUCLAIRE, L.; FROSSARD, E.; THONAR, C. Identification of heterotrophic zinc mobilization processes among bacterial strains isolated from wheat rhizosphere (*Triticum aestivum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 84, n. 1, p. 1–16, 2018.
- DEFEZ, R.; ANDREOZZI, A.; BIANCO, C. The Overproduction of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in Endophytes Upregulates Nitrogen Fixation in Both Bacterial Cultures and Inoculated Rice Plants. **Microbial Ecology**, Nova iorque, v. 74, n. 2, p. 441–452, 2017.
- DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bacterias diazotróficas de plantas nao-leguminosas**. Rio de Janeiro: Embrapa: Agrobiologia, 1995. 60 p. (Embrapa- Agrobiologia . Documentos, S/N).
- DÖBEREINER JOHANA. Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia. **Documento Nº110**, p. 38, 1999.
- FIGUEREDO, E. F.; OLIVEIRA, J.T.C.; SANTOS, I. B. ; FREIRE, F, J.; SOBRAL, J K; Biossíntese de ácido indol acético por bactérias diazotróficas associadas à *Brachiaria humidicola* por diferentes vias metabólicas. **Ciência e Tecnologia**, Jaboticabal, v. 8, n.1., p. 1–10, 2016.
- FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; AIDAR, S. T.; MORGANTE, M. V.; GAVA, C. A. T.; ZILLI, J. É.; SOUZA, L. S B.; MARINHO, R. C. N.; NÓBREGA, R. S. A.; BRASIL, M. S.; Seido, S. L.; Martins, I. M. V. The resurrection plant *tripogon spicatus* (poaceae) harbors a diversity of plant growth promoting bacteria in northeastern brazilian caatinga. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 39, n. 4, p. 993–1002, 2015.
- FLURY, P.; PÉCHY-TARR, M.; AELLEN, N.; DENNERT, F.; HOFER, N.; KUPFERSCHMIED, K. P.; KUPFERSCHMIED, P.; METLA, Z.; MA, Z.; SIEGFRIED, S.; WEERT, S.; BLOEMBERG, G.; HÖFTE, M.; KEEL, C. J.; MAURHOFER, M. Antimicrobial and Insecticidal: Cyclic Lipopeptides and Hydrogen Cyanide Produced by Plant-Beneficial *Pseudomonas* Strains CHA0, CMR12a, and PCL1391 Contribute to Insect Killing. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 8, n. 100, p.1-15, 2017.

GLICK, B. R. Introduction to Plant Growth-promoting Bacteria. *In: Beneficial Plant-Bacterial Interactions*. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 1–28.

GOSWAMI, D.; PITHWA, S.; DHANDHUKIA, P.; THAKKER, J. N. Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: A novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. **Journal of Plant Interactions**, Abingdon, v. 9, n. 1, p. 566–576, 2014.

HAMMER, D. A. T.; RYAN, P. D.; HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T. **Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis** *Palaeontologia Electronica*. **Palaeontologia Electronica**, Amherst, v. 4, n. 1: p. 1-9, 2001. [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 221, p. 125–131, 2016.

KAKAR, K. U.; NAWAZ, Z.; CUI, Z.; ALMONEAFY, A. A.; ULLAH, R.; SHU, Q. Y. Rhizosphere-associated *Alcaligenes* and *Bacillus* strains that induce resistance against blast and sheath blight diseases, enhance plant growth and improve mineral content in rice. **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 124, n. 3, p. 779–796, 2018.

KANG, J. P.; HUO, Y.; KIM, Y. J.; AHN, J. C.; HURH, J.; YANG, D. U.; YANG, D. C. *Rhizobium panacihumi* sp. nov., an isolate from ginseng-cultivated soil, as a potential plant growth promoting bacterium. **Archives of Microbiology**, Nova iorque, v. 201, n. 1, p. 99–105, 2018.

KAVAMURA, V. N. Bactérias associadas às cactáceas da Caatinga : promoção de crescimento de plantas sob estresse hídrico. 2012. 244p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” Piracicaba 2012.

KIZHAKEDATHIL, M. P. J.; DEVI C, S. Rhizospheric bacteria isolated from the agricultural fields of Kolathur, Tamilnadu promotes plant growth in mustard plants. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. , p. 293–302, 2018.

KUAN, K. B.; OTHMAN, R.; ABDUL RAHIM, K.; SHAMSUDDIN, Z. H. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. **Plos One**, São francisco, v. 11, n. 3, p. 1-19, 2016.

KUMAR, A.; MAURYA, B. R.; RAGHUWANSHI, R.; MEENA, V. S.; TOFAZZAL ISLAM, M. Co-inoculation with *Enterobacter* and *Rhizobacteria* on Yield and Nutrient Uptake by Wheat (*Triticum aestivum* L.) in the Alluvial Soil Under Indo-Gangetic Plain of India. **Journal of Plant Growth Regulation**, Nova iorque, v. 36, n. 3, p. 608–617, 2017.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M. L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 10, p. 1459–1465, 2007.

LI, Y.; LIU, X.; HAO, T.; CHEN, S.; LI, Y.; LIU, X.; HAO, T.; CHEN, S. Colonization and Maize Growth Promotion Induced by Phosphate Solubilizing Bacterial Isolates. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 7, p. 1253, 29 jun. 2017.

LOACES, I.; FERRANDO, L.; SCAVINO, A. F. Dynamics, Diversity and Function of Endophytic Siderophore-Producing Bacteria in Rice. **Microbial Ecology**, Nova Iorque, v. 61, n. 3, p. 606–618, 2011.

LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL, M. A.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phaseolus vulgaris seed-borne endophytic community with novel bacterial species such as Rhizobium endophyticum sp. nov. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 33, n. 6, p. 322–327, 2010.

MACHADO, R. G.; SÁ, E. L. S.; BRUXEL, M.; GIONGO, A. .; SANTOS, N. D. A. S.; NUNES, A. Indoleacetic acid producing rhizobia promote growth of Tanzania grass (*Panicum maximum*) and Pensacola grass (*Paspalum sauriae*). **International Journal of Agriculture and Biology (Pakistan)**, Faisalabad, v. 15, n. 15, p. 827–834, 2013.

MANDER, C.; WAKELIN, S.; YOUNG, S.; CONDRON, L.; O'CALLAGHAN, M. Incidence and diversity of phosphate-solubilising bacteria are linked to phosphorus status in grassland soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 44, n. 1, p. 93–101, 2012.

MARAG, P. S.; SUMAN, A. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). **Microbiological Research**, Jena, v. 214, n.1, p. 101–113, 2018.

MCROSE, D. L.; BAARS, O.; MOREL, F. M. M.; KRAEPIEL, A. M. L. Siderophore production in *Azotobacter vinelandii* in response to Fe-, Mo- and V-limitation. **Environmental Microbiology**, Hoboken, v. 19, n. 9, p. 3595–3605, 2017.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. DE S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. DE. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235–246, 2006.

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, Oxford, v. 170, n. 1, p. 265–270, 1999.

NIEHUS, R.; PICOT, A.; OLIVEIRA, N. M.; MITRI, S.; FOSTER, K. R. The evolution of siderophore production as a competitive trait. **Evolution**, Hoboken, v. 71, n. 6, p. 1443–1455, 2017.

PANDEY, N.; BHATT, R. Role of soil associated Exiguobacterium in reducing arsenic toxicity and promoting plant growth in *Vigna radiata*. **European Journal of Soil Biology**, Issy-leS-moulineaux, v. 75, p. 142–150, 2016.

PATEL, J. K.; ARCHANA, G. Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from Poaceae plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 417, n. 1–2, p. 99–116, 2017.

PATEL, T.; SARAF, M. Exploration of Novel Plant Growth Promoting Bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* MTP42 Isolated from the Rhizospheric Soil of *Coleus forskohlii*. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tamilnadu, v. 6, n. 11, p. 944–955, 2017.

PÉREZ-CORDERO, A.; CHAMORRO-ANAYA, L.; ZOOTECA, A. D. M. Endophytes bacterial growth promoters isolated to colosoana grass, Department of Sucre, Colombia. **Revista MVZ Cordoba**, Monteria, v. 23, n. 2, p. 6696–6709, 2018.

RANA, A.; SAHARAN, B.; JOSHI, M.; PRASANNA, R.; KUMAR, K.; NAIN, L. Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. **Annals of Microbiology**, Nova iorque, v. 61, n. 4, p. 893–900, 11 2011.

REINHOLD-HUREK, B. Isolation and Screening of Rhizosphere Bacteria from Grasses in East Kavango Region of Namibia for Plant Growth Promoting Characteristics. **Current Microbiology**, Nova iorque, v. 71, n. 5, p. 566–571, 2015.

REIS, V. M.; PITARD, R. M.; DOURADO, F. dos S.; CAMACHO, N. N.; VIDEIRA, S. S.; CAMARGO, A. B.; BOA SORTE, P. F.; VIDAL, M. S.; SCHWAB, S.; BALDANI, J. I. Caracterização morfo-fisiológica e molecular das estirpes diazotróficas do inoculante de cana-de-açúcar Embrapa: *Agrobiologia*, 2011. 36p. (Embrapa-Agrobiologia . Documentos, 280).

RODRÍGUEZ, C.; MITTER, B.; ANTONIELLI, L.; TROGNITZ, F.; COMPANT, S.; SESSITSCH, A. Roots and Panicles of the C4 Model Grasses *Setaria viridis* (L). and *S. pumila* Host Distinct Bacterial Assemblages With Core Taxa Conserved Across Host Genotypes and Sampling Sites. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 9, n.1, p. 2708, 2018.

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

SAGAR, A.; THOMAS, G.; RAI, S.; MISHRA, R. K.; RAMTEKE, P. W. Enhancement of Growth and Yield Parameters of Wheat Variety AAI-W6 by an Organic Farm Isolate of Plant Growth Promoting Erwinia Species (KP226572). **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, Nova Deli, v.11, n.1, p.1-9, 2018.

SAHUR, A.; ALA, A.; PATANJENGI, B.; SYAM'UN, E. Isolation and Characterization of Indigenous Rhizosphere Bacteria Producing Gibberellic Acid and Indole Acetic Acid from Local Soybeans in South Sulawesi. **International Journal of Advances in Agricultural Science and Technology**, Nova déli, v. 4, n. 1, p. 7–15, 2017.

SAÏDI, S.; CHEBIL, S.; GTARI, M.; MHAMDI, R. Characterization of root-nodule bacteria isolated from *Vicia faba* and selection of plant growth promoting isolates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Nova iorque, v. 29, n. 6, p. 1099–1106, 2013.

SANTOS, P.; ROJAS-ROJAS, F. U.; TAPIA-GARCÍA, E. Y.; VÁSQUEZ-MURRIETA, M. S.; HIRSCH, A. M. To split or not to split: an opinion on dividing the genus *Burkholderia*. **Annals of Microbiology**, Nova iorque, v. 66, n. 3, p. 1303–1314, 2016.

SARKAR, A.; GHOSH, P. K.; PRAMANIK, K.; MITRA, S.; SOREN, T.; PANDEY, S.; MONDAL, M. H.; MAITI, T. K. A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. **Research in microbiology**, Amsterdam, v. 169, n. 1, p. 20–32, 2018.

SAYYED, R. Z.; CHINCHOLKAR, S. B. Siderophore-Producing *Alcaligenes faecalis* Exhibited More Biocontrol Potential Vis-à-Vis Chemical Fungicide. **Current Microbiology**, Nova iorque, v. 58, n. 1, p. 47–51, 2009.

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical biochemistry**, San diego, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987.

SHUKLA, P. K.; RAMTEKE, P. W.; DHUSIA, K.; SAGAR, A.; DHUSIYA, K.; SHUKLA, P. K.; SINGH, A.; LAWRENCE, R. Comparative analysis of Production of Hydrogen Cyanide with Production of Siderophore and Phosphate Solubilization activity in Plant Growth Promoting Bacteria Comparative analysis of Production of Hydrogen Cyan. **Vegetos: An International Journal of Plant Research & Biotechnology**, Londres, v. 31, n. 2, p.130-135, 2018.

SINGH, R. K.; SINGH, V.; VIVEKANANDA, M.; KRISHI, P.; SANSTHAN, A.; MEENA, R. K. Can we use Maize ( *Zea mays* ) Rhizobacteria as Plant Growth Promoter ? **International journal of plant research**, Chicago, v. 28, n.1, p. 86-99, 2018.

SINHA, A. K.; PARLI VENKATESWARAN, B.; TRIPATHY, S. C.; SARKAR, A.; PRABHAKARAN, S. Effects of growth conditions on siderophore producing bacteria and siderophore production from Indian Ocean sector of Southern Ocean. **Journal of Basic Microbiology**, Hoboken, v. s/v, n.s/n, p.1-13, 2019.

TANI, A.; AKITA, M.; MURASE, H.; KIMBARA, K. Culturable bacteria in hydroponic cultures of moss *Racomitrium japonicum* and their potential as biofertilizers for moss production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 112, n. 1, p. 32–39, 2011.

TAULÉ, C.; MAREQUE, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 356, n. 1–2, p. 35–49, 2012.

TAVARES, J. E. **Histórico de uso da pastagem de capim pangolão da Estação Experimental de Araripina do IPA**. LIRA JUNIOR, M. A. Araripina: IPA 2017

VALENTE, J. P. S.; PADILHA, P. M.; SILVA, A. M. M. DA. Contribuição da cidade de Botucatu - SP com nutrientes (fósforo e nitrogênio) na eutrofização da represa de Barra Bonita. **Eclética Química Journal**, Araraquara, v. 22, n. 1, 2018.

VERMA, J. P.; YADAV, J.; TIWARI, K. N.; KUMAR, A. Effect of indigenous Mesorhizobium spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 51, p. 282–286, 2013.

VERMA, P.; YADAV, A. N.; KHANNAM, K. S.; MISHRA, S.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K.; SUMAN, A. Appraisal of diversity and functional attributes of thermotolerant wheat associated bacteria from the peninsular zone of India. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Amsterdam, v. s/v, n. s/n, p. 1-14 2016.

VERMA, S. K.; WHITE, J. F. Indigenous endophytic seed bacteria promote seedling development and defend against fungal disease in browntop millet (*Urochloa ramosa* L.). **Journal of Applied Microbiology**, Hoboken, v. 124, n. 3, p. 764–778, 2018.

XU, J.; KLOEPPER, J. W.; HUANG, P.; MCINROY, J. A.; HU, C. H. Isolation and characterization of N<sub>2</sub>-fixing bacteria from giant reed and switchgrass for plant growth promotion and nutrient uptake. **Journal of Basic Microbiology**, Hoboken, v. 58, n. 5, p. 459–471, 2018.

YAN, X.; WANG, Z.; MEI, Y.; WANG, L.; WANG, X.; XU, Q.; PENG, S.; ZHOU, Y.; WEI, C. Isolation, diversity, and growth-promoting activities of endophytic bacteria from tea cultivars of Zijuan and Yunkang-10. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018.

ZAPPELINI, C.; ALVAREZ-LOPEZ, V.; CAPELLI, N.; GUYEUX, C.; CHALOT, M. Streptomyces dominate the soil under betula trees that have naturally colonized a red gypsum landfill. **Frontiers in Microbiology**, Lausana, v. 9, n.1, p. 1–13, 2018.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu a identificação e a avaliação da diversidade presente na cultura do capim pangolão, sendo encontrados representantes de 20 gêneros em uma amostra de 80 das 67 estirpes utilizadas, confirmando que plantas podem ser consideradas um microecossistema complexo onde diferentes nichos são explorados por uma extensa variedade de bactérias.

É provável que essa biodiversidade possa conferir ao seu hospedeiro maior resistência a condições de estresse, alterações nas condições fisiológicas, proteção contra organismos patogênicos e herbívoros, promoção de crescimento vegetal, além da produção de antibióticos e enzimas de interesse biotecnológico.

Os resultados para fatores de promoção de crescimento *in vitro* e *in vivo* indicam, embora ainda não conclusivamente, este potencial, já que x das 80 estirpes selecionadas aleatoriamente apresentaram desempenho comparável ao das hoje recomendadas para produção de inoculante de milho.