

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

MICHELLE JUSTINO GOMES ALVES

**DIVERSIDADE E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS
POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CAPIM PANGOLÃO**

**Recife
2021**

Michelle Justino Gomes Alves
Engenheira Agrônoma

Diversidade e promoção de crescimento de plantas por bactérias associadas ao capim pangolão

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

Orientador: Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior

Coorientador: Dr. Eric Xavier de Carvalho
Coorientador: Dr. Felipe José Cury Fracetto

**Recife
2021**

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.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A474d Alves, Michelle Justino Gomes
 DIVERSIDADE E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO
 CAPIM PANGOLÃO / Michelle Justino Gomes Alves. - 2021.
 134 f.

 Orientador: Mario de Andrade Lira Junior.
 Coorientador: Eric Xavier de Carvalho.
 Inclui referências e apêndice(s).

 Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo,
 Recife, 2021.

 1. Mecanismo de promoção de crescimento. 2. Digitaria. 3. PBPG. 4. Zea mays. I. Junior, Mario de Andrade Lira,
 orient. II. Carvalho, Eric Xavier de, coorient. III. Título

CDD 631.4

MICHELLE JUSTINO GOMES ALVES

Diversidade e promoção de crescimento de plantas por bactérias associadas ao capim pangolão

Tese 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 Doutora em Ciência do Solo.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2021

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Artur Prudêncio de Araújo Pereira
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dra. Erika Valente de Medeiros
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco - UFAPE

Dr. Paulo Ivan Fernandes Junior
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Semi-Árido
(EMBRAPA-CPATSA)

Prof. Dra. Rafaela Simão Abrahão Nóbrega
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Dedico esse trabalho aos meus pais, irmãos e sobrinhos pelo incentivo, amor, carinho e apoio incondicional para que eu chegasse até aqui, em especial a minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS, pelo dom da vida, da aprendizagem, por iluminar todo o meu caminho e por ter proporcionado mais uma conquista na minha vida.

Aos meus pais, Joseano Justino Alves (*in memoriam*) e Maria Rosinaide Gomes Galindo Alves, pelo amor, carinho, confiança, apoio incondicional, ensinamentos e dedicação em todos esses anos da minha vida.

Aos meus irmãos, Joseano Justino Alves Júnior e Michel Justino Gomes Alves, pela amizade e pelos inúmeros momentos de alegrias compartilhados.

Aos meus preciosos sobrinhos, Joseano Neto, João Guilherme e Maria Júlia, pelo simples fato de existirem.

A minha cunhada, Maria Nunes dos Santos, pelo afeto e atenção.

Ao meu namorado, Lucas da Silva Alves, pelo carinho, amor, paciência e apoio no dia-a-dia.

A minha tia Rosimere, por todo incentivo nas minhas buscas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior, pela dedicação, paciência na orientação e ensinamentos transmitidos.

Aos meus coorientadores Dr. Eric Xavier de Carvalho e Dr. Felipe José Cury Fracetto, pelos ensinamentos e esforço para a realização desse trabalho.

A minha estagiária de iniciação científica Gisely Moreira, pela amizade e auxílio na realização da pesquisa.

Ao pesquisador Dr. José de Paula de Oliveira do IPA, pela orientação e esforço para a realização desse trabalho.

Aos colegas Cybelle Souza, Johny Medonça e Adriana Bezerra, pela amizade e apoio a realização do trabalho.

A Petrônio e Elton pelo auxílio no programa de análise genética.

Aos colegas do IPA, Júnior e Dra. Maria Luiza pela amizade e todo auxílio na execução das atividades no Laboratório de Biologia do solo – IPA.

A Maria do Socorro, pelo respeito e dedicação.

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

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento da bolsa e 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), por possibilitar a conquista do título de doutora e pela oportunidade do aperfeiçoamento dos meus conhecimentos.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pelo apoio logístico e técnico para desenvolvimento do trabalho, disponibilizando os Laboratórios de Biologia do Solo, Biotecnologia e Fertilidade do solo.

Aqueles que não foram citados, porém, não menos importantes, deixo aqui a minha gratidão por terem de alguma forma contribuíram para a minha evolução pessoal e profissional.

Muito Obrigada!

“Para todos que já tiveram um momento de fraqueza. Não vai doer para sempre, então não deixe isso afetar o que há de melhor em você”.

J. A. Redmerski

DIVERSIDADE E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE PLANTAS POR BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CAPIM PANGOLÃO

Resumo Geral

Algumas espécies de gramíneas são resilientes sob condições ambientais estressantes, como o capim pangolão (*Digitaria eriantha* cv. Suvernola). Uma das possíveis razões é a presença de bactérias promotoras de crescimento. Assim, o objetivo foi avaliar a diversidade e o potencial de promoção de crescimento da comunidade bacteriana endofítica do capim pangolão, de diferentes ambientes de Pernambuco. Foram isoladas bactérias associadas a folhas, colmo, raiz e solo rizosférico do pangolão das mesorregiões Sertão, Agreste e Zona da Mata em Pernambuco - Brasil. A avaliação da diversidade foi feita inicialmente por caracterização fenotípica, seguida de avaliação genotípica por BOX-PCR, e sequenciamento do gene 16S rRNA. Representantes dos grupos formados pelo BOX-PCR a 90% de similaridade foram escolhidos para avaliação *in vitro* dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal (fixação biológica de nitrogênio - FBN, síntese de AIA, solubilização de fosfato e produção de sideróforos), bem como por experimentos em casa de vegetação em milho destinados a verificar cada mecanismo separadamente. FBN foi avaliado pelo cultivo sob déficit de N, produção de AIA pelo cultivo sob déficit hídrico, solubilização de P e produção de sideróforos pelo fornecimento de P e Fe de baixa solubilidade, respectivamente. O capim pangolão teve alta diversidade com 325 isolados caracterizados fenotipicamente e 244 estirpes a 100% de similaridade pelo BOX-PCR, sendo 132 estirpes enviadas para sequenciamento. 118 estirpes mostraram 96,84 – 99,9 % de similaridade com alguma previamente descrita no BLAST e foram identificados 2 filos, 4 classes, 7 ordens, 13 famílias e 17 gêneros: *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Kosakonia*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Shinella*, *Stenotrophomonas* e *Variovarax*. Na avaliação *in vivo*, as estirpes do estudo foram superiores ao inoculante comercial em todos os experimentos. Estirpes do capim pangolão superaram o inoculante comercial no experimento de baixa disponibilidade de N para todas as variáveis avaliadas, com exceção da eficiência relativa ao sem inoculação e ao N mineral. No experimento sob déficit hídrico, as novas estirpes também mostraram melhores resultados para todas as variáveis avaliadas em relação ao inoculante comercial. No ensaio realizado com fonte de ferro de baixa solubilidade não houve diferença entre a testemunha inoculante comercial e todos os demais tratamentos para diâmetro do colmo, área foliar, massa seca da parte aérea, acúmulo de N e P na parte aérea e as eficiências relativas. No entanto, a estirpe 252A colaborou com uma maior altura e 5227 apresentou o maior valor de massa seca da raiz. No experimento com fornecimento de fósforo de baixa solubilidade não houve diferença entre a testemunha inoculante comercial e os demais tratamentos para massa seca da parte aérea, acúmulo de N na parte aérea e todas as eficiências relativas, enquanto seis estirpes apresentaram maior acúmulo de P. A diversidade de bactérias associadas ao pangolão pode ter promovido a sua resiliência. Embora cada experimento com milho tenha enfatizado um dos mecanismos de promoção de crescimento estudados *in vitro*, seus resultados *in vivo* podem não ter sido obtidos em virtude de apenas um mecanismo, mas sim, pela combinação destes e de outros mecanismos não avaliados.

Palavras-chave: Mecanismo de promoção de crescimento. *Digitaria*. PBPG. *Zea mays*.

DIVERSITY AND PLANT GROWTH PROMOTION BY DIGIT GRASS ASSOCIATED BACTERIA

General Abstract

Some grass species are resilient under stressful environmental conditions, such as pangolão grass (*Digitaria eriantha* cv. Suvernola). One of the possible reasons is the presence of growth-promoting bacteria. Thus, the objective was to evaluate the diversity and the growth promotion potential of the endophytic bacterial community of pangolão grass, from different environments in Pernambuco. Bacteria associated with leaves, stem, root and rhizospheric soil were isolated from the pangolon of the Sertão, Agreste and Zona da Mata mesoregions in Pernambuco - Brazil. The diversity assessment was done initially by phenotypic characterization, followed by genotypic evaluation by BOX-PCR, and sequencing of the 16S rRNA gene. Representatives of the groups formed by the BOX-PCR at 90% similarity were chosen for *in vitro* evaluation of the promotion mechanisms of plant growth (biological nitrogen fixation - FBN, AIA synthesis, phosphate solubilization and production of siderophores), as well as by experiments in a greenhouse on corn intended to verify each mechanism separately. FBN was evaluated by cultivation under deficit of N, production of AIA by cultivation under water deficit, solubilization of P and production of siderophores by the supply of low solubility P and Fe, respectively. Pangolao grass had high diversity with 325 isolates phenotypically characterized and 244 strains at 100% similarity by BOX-PCR, with 132 strains sent for sequencing. 118 strains showed 96.84 - 99.9% similarity with some previously described in BLAST and 2 phyla, 4 classes, 7 orders, 13 families and 17 genera were identified: *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Kosakonia*, *Ochrobacterium*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Shinella*, *Stenotrophomonas* and *Variovarax*. In the *in vivo* evaluation, the strains in the study were superior to the commercial inoculant in all experiments. Strains of pangolão grass outperformed the commercial inoculant in the experiment of low N availability for all evaluated variables, except for the efficiency related to no inoculation and mineral N. In the experiment under water deficit, the new strains also showed better results for all variables evaluated in relation to the commercial inoculant. In the test performed with a low solubility iron source, there was no difference between the commercial inoculating control and all other treatments for stem diameter, leaf area, dry mass of the aerial part, accumulation of N and P in the aerial part and the relative efficiencies. However, strain 252A collaborated with a higher height and 5227 had the highest dry weight of the root. In the experiment with supply of low solubility phosphorus, there was no difference between the commercial inoculant control and the other treatments for aerial part dry mass, N accumulation in the aerial part and all the relative efficiencies, while six strains showed greater accumulation of P. A diversity of bacteria associated with the pangolon may have promoted its resilience. Although each experiment with corn emphasized one of the growth promotion mechanisms studied *in vitro*, its results *in vivo* may not have been obtained due to only one mechanism, but rather by the combination of these and other mechanisms not evaluated.

Key words: Growth promoting mechanisms. *Digitaria*. PGPB. *Zea mays*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Evolução dos trabalhos publicados com “bactérias promotoras de crescimento de plantas”. Fonte: Scopus, 19 de janeiro de 2021, pesquisa de 1990 a 2020.....26
- Figura 2. Localização da região Nordeste com ênfase no estado de Pernambuco, suas respectivas mesorregiões e recorte dos municípios Araripina, Gravatá e Nazaré da Mata, Brasil, 2020..... 54
- Figura 3. Porcentagem de isolados bacterianos por características fenotípicas oriundos de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola.59
- Figura 4. Agrupamento hierárquico pelo coeficiente de Jaccard em forma de dendrograma circular de acordo com a similaridade de ocorrência das características fenotípicas de isolados bacterianos oriundos de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola coletadas em diferentes mesorregiões (Sertão, Agreste e Zona da Mata) em Pernambuco.60
- Figura 5. Diagrama de Venn representando o número total e o compartilhamento de gêneros nos diferentes locais (A) e parte da planta (B). Origem de gêneros bacterianos para cada condição de isolamento (C e D)..... 64
- Figura 6. Árvore filogenética determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro Jukes Cantor e teste de bootstrap com 1000 repetições das sequências do gene 16S rRNA dos isolados do capim pangolão..... 65
- Figura 7. Caracterização funcional e número de bactérias associadas a plantas de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola testados *in vitro* para fixação do nitrogênio através do crescimento em meio NFB (A); síntese de ácido indolacético (B); produção de sideróforos (C); solubilização de fosfato inorgânico (D)..... 94
- Figura 8. Agrupamento das estirpes associadas ao capim pangolão em relação aos mecanismos de promoção de crescimento *in vitro* para: N - fixação biológica de nitrogênio; I - produção de ácido indolilacético; S - produção de sideróforos; P - solubilização de fosfato; (+) resultado positivo ao mecanismo; (-) resultado negativo ao mecanismo.96

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Amostragens em pastagens de Pangolão (*Digitaria eriantha* cv. Suvernola) em três mesorregiões de Pernambuco, Sertão, Agreste e Zona da Mata.55
- Tabela 2. Número de bactérias isoladas de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola com os índices de diversidade calculados por área de estudo e condição de isolamento em Pernambuco.61
- Tabela 3. Número de bactérias e grupos formados no dendrograma de similaridade com base em características genotípicas dos isolados bacterianos associados a *Digitaria eriantha* cv. Suvernola coletadas em diferentes mesorregiões (Sertão, Agreste e Zona da Mata) em Pernambuco.62
- Tabela 4. Classificação taxonômica das bactérias isoladas de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola no Nordeste brasileiro.63
- Tabela 5. Estirpes selecionadas para os experimentos *in vivo* em baixa disponibilidade de nitrogênio (FBN), sob estresse hídrico (AIA), fosfato de baixa solubilidade (P) e ferro de baixa solubilidade (Sideróforo). Linhas grifadas em cinza representam estirpes em comum aos quatro experimentos *in vivo*.89
- Tabela 6. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão no milho crescimento do milho com redução no suprimento de N aos 20 dias após germinação.97
- Tabela 7. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto a síntese de ácido indolacético *in vivo* e crescimento do milho 20 dias após germinação, submetidos ao estresse hídrico.99
- Tabela 8. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto a produção de sideróforo *in vivo* e crescimento do milho 20 dias após germinação.100
- Tabela 9. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vivo* e crescimento do milho 20 dias após germinação.102
- Tabela 10. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto aos mecanismos promotores de crescimento *in vitro* e ligação com resultados obtidos no experimento sob baixa disponibilidade de nitrogênio.103

Tabela 10a. Correlação de Pearson entre características promotoras de crescimento <i>in vitro</i> das estirpes e resultados obtidos no experimento sob baixa disponibilidade de nitrogênio.....	103
Tabela 11. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto aos mecanismos promotores de crescimento <i>in vitro</i> e ligação com resultados obtidos no experimento sob estresse hídrico.	104
Tabela 11a. Correlação de Pearson entre características promotoras de crescimento <i>in vitro</i> das estirpes e resultados obtidos no experimento sob estresse hídrico.....	105
Tabela 12. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto aos mecanismos promotores de crescimento <i>in vitro</i> e ligação com resultados obtidos no experimento sob disponibilidade de ferro de baixa solubilidade.....	106
Tabela 12a. Correlação de Pearson entre características promotoras de crescimento <i>in vitro</i> das estirpes e resultados obtidos no experimento sob disponibilidade de ferro de baixa solubilidade.....	106
Tabela 13. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto aos mecanismos promotores de crescimento <i>in vitro</i> e ligação com resultados obtidos no experimento sob fósforo de baixa solubilidade.....	108
Tabela 13a. Correlação de Pearson entre características promotoras de crescimento <i>in vitro</i> das estirpes e resultados obtidos no experimento sob fósforo de baixa solubilidade.....	108
Tabela Suplementar 1. Descrição das características fenotípicas dos isolados bacterianos associados ao capim Pangolão, Brasil, 2020.....	124
Tabela Suplementar 2. Identidade dos isolados bacterianos provenientes de <i>Digitaria eriantha</i> cv. Suvernola e das diferentes condições de isolamento, com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa Blast no GenBank.	127
Tabela Suplementar 3. Estirpes selecionadas para os testes <i>in vitro</i> de promoção de crescimento: crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio (FBN), síntese de ácido indolacético (AIA), índice de solubilização de fosfato inorgânico (IS) e sideróforo.	131

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	21
1.2 Objetivos	23
1.2.1 Objetivo Geral	23
1.2.2 Objetivos específicos.....	23
2 Revisão Bibliográfica.....	24
2.1 O Capim Pangolão	24
2.2 Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas	25
2.2.1 Mecanismos de Promoção de Crescimento Vegetal	28
2.3 Estudo da Diversidade Bacteriana Endofítica	34
2.4 Referências	36
3 DIVERSIDADE BACTERIANA ASSOCIATIVA EM CAPIM PANGOLÃO (<i>Digitaria eriantha steud. cv. Survenola</i>).....	51
3.1 Introdução	53
3.2 Material e Métodos	54
3.2.1 Isolamento e caracterização fenotípica das bactérias endofíticas	56
3.2.2 Estudo do perfil fenotípico da comunidade bacteriana endofítica	56
3.2.3 Estudo do perfil genotípico da comunidade bacteriana endofítica	56
3.2.4 Sequenciamento dos fragmentos dos 16S rRNA re-amplificados e purificados	57
3.2.5 Análise comparativa das sequências dos 16S rRNA.....	58
3.3 Resultados.....	58
3.3.1 Avaliação da diversidade fenotípica das bactérias endofíticas e rizosféricas	58
3.3.2 Diversidade genotípica pela amplificação dos elementos BOX	61
3.3.3 Amplificação e Sequenciamento do gene 16S rRNA	62
3.3.4 Relações filogenéticas entre isolados bacterianos.....	65
3.4 Discussão.....	66
3.4.1 Avaliação da diversidade fenotípica das bactérias endofíticas	66
3.4.2 Diversidade genotípica e sequenciamento do gene 16S rRNA ribossomal	68
3.5 Conclusão.....	72
3.6 Referências	72
4 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO MILHO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE <i>Digitaria eriantha cv. SUVERNOLA</i>.....	81
4.1 Introdução	83
4.2 Material e Métodos	84

4.2.2 Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento <i>in vitro</i>	84
4.2.3 Eficiência das bactérias promotoras de crescimento associadas ao capim pangolão quanto ao crescimento inicial do milho	86
4.2.4 Análise estatística.....	91
4.3 Resultados.....	92
4.3.1 Características de promoção de crescimento de plantas de isolados endofíticos.....	92
4.3.2 Ligação dos mecanismos promotores de crescimento <i>in vitro</i>	94
4.3.3 Eficiência das bactérias promotoras de crescimento inicial do milho	96
4.3.4 Ligação dos mecanismos promotores de crescimento <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	102
4.4 Discussão.....	108
4.5 Conclusão.....	113
4.6 Referências	114
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
6 APÊNDICES	124

1 INTRODUÇÃO GERAL

O contínuo crescimento populacional mundial provoca a necessidade do aumento da produção de alimentos pela pecuária e agricultura. O principal fator para esse aumento está no adequado fornecimento de nutrientes ao solo, obtido pelo uso de fertilizantes químicos e minerais, acompanhado da expansão de áreas agricultáveis.

Tratando-se da pecuária, pastagens de alta qualidade e bem manejadas são um ponto chave para o sucesso e aumento da produtividade dos rebanhos, além de serem o alimento de menor custo para a produção animal, principalmente em regiões semiáridas.

No entanto, a degradação de pastagens é um dos maiores problemas do setor pecuário, e a sua recuperação uma das principais prioridades do governo brasileiro, uma vez que as estimativas mostram que o Brasil possui em torno de 180 milhões de hectares de pastagens, dos quais 70% apresenta algum estágio de degradação.

Um dos motivos da degradação de pastagens, além da superlotação de animais, é o baixo teor de nutrientes no solo, sobretudo nitrogênio e fósforo, considerados como dois dos nutrientes de maior exigência pelas plantas, ocasionando declínio de produtividade, disponibilidade, vigor e qualidade das forragens. Assim, a recuperação desses ambientes é imprescindível para a sustentabilidade da produção animal e a contribuição para que não ocorra o desmatamento de novas áreas.

A recuperação de áreas degradadas exige o restabelecimento da fertilidade do solo, como a realização de calagem e fertilização química para o crescimento de plantas. Nesse sentido, o uso de inoculantes microbianos com bactérias promotoras de crescimento de plantas pode ajudar neste processo, pelos seus benefícios tão difundidos.

Contudo, algumas espécies de gramínea ainda são pouco pesquisadas, como é o caso de *Digitaria eriantha* cv. Survenola, conhecida popularmente no Brasil como capim pangolão, pangola peluda ou capim faixa-branca. Seu uso é mais restrito à região Nordeste, principalmente Sergipe e Alagoas, apesar de apresentar qualidade e potencial produtivo para ser cultivada nas mais diversas regiões. Essa gramínea apresenta interesse particular pelo seu histórico de adaptação a condições edafoclimáticas desfavoráveis, como tem sido observado durante 30 anos em Araripina, Pernambuco - Brasil, em semiárido tropical, sem calagem nem adubação e com exploração animal. Além das características adaptativas que proporcionam tolerância ao déficit hídrico como a capacidade de absorver o orvalho, pode-se também sugerir a presença de bactérias promotoras de crescimento como mecanismo de extrema importância a sua resistência e sobrevivência a ambientes adversos.

Agroecossistemas complexos como pastagens tem potencial para a atividade e abundância de diversas bactérias, que são moduladas por diversos fatores bióticos e abióticos que influenciam a colonização nas plantas. No entanto, não há relatos quanto a diversidade e presença de bactérias promotoras de crescimento associadas ao capim pangolão.

O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas é uma alternativa sustentável e promissora para aumentar a eficiência de fertilizantes minerais e reduzir o impacto ambiental. Essas bactérias habitam diferentes partes da planta e rizosfera sem provocar prejuízos ao seu hospedeiro, suavizando efeitos de estresses bióticos e abióticos no crescimento e desenvolvimento das plantas, promovendo aumento no crescimento das plantas por diversos mecanismos de atuação: fixação biológica de nitrogênio, síntese e liberação de fitohormônios, quelação e disponibilidade de Fe junto ao controle de fitopatógenos pela síntese e liberação de sideróforos ou a solubilização de fosfato.

Muitos estudos mostram gêneros bacterianos possuindo pelo menos um mecanismo de promoção de crescimento associados a plantas, tais como *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sphingomonas* e que as diferentes espécies vegetais selecionam micro-organismos específicos para colonizarem os seus tecidos e viverem em ambientes circundantes como a rizosfera, em um processo determinado pelo genótipo do hospedeiro e condições ambientais, o que pode estimular a discussão sobre a composição de comunidades microbianas específicas.

Desta forma, o uso da inoculação com bactérias promotoras de crescimento é uma alternativa viável, mais econômica e ecológica para reduzir os impactos causados ao ambiente pela utilização de insumos agrícolas poluentes e onerosos, principalmente os nitrogenados.

Um exemplo de estirpe utilizada refere-se as linhagens Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*, isolada do milho e comercializada como inoculante para milho, trigo, arroz, e braquiária, conferindo aumento de produtividade através de diferentes efeitos. Essa espécie bacteriana também tem sido usada na co-inoculação para feijão e soja juntamente com as estirpes rizobianas recomendadas para cada cultura obtendo resultados satisfatórios.

Diante do exposto, o conhecimento da associação entre o capim pangolão e bactérias promotoras de crescimento, será com certeza primordial para promover o entendimento do papel que esses micro-organismos desempenham no seu hospedeiro, bem como sua possível utilização em outras culturas de importância agrícola.

1.1 Hipóteses

1 - O pangolão apresenta grande diversidade de bactérias endofíticas que podem contribuir para sua resiliência a estresses ambientais

2 - Bactérias associadas ao capim pangolão apresentam diferentes mecanismos com potencial para promoção de crescimento e podem afetar o crescimento do milho sob condições estressantes.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a diversidade e o potencial de promoção de crescimento da comunidade bacteriana (cultivável) endofítica do capim pangolão.

1.2.2 Objetivos específicos

1. Isolar e avaliar a diversidade de bactérias endofíticas e rizosféricas cultiváveis associadas ao capim pangolão a partir de amostras de folha, caule, raiz e solo rizosférico das três mesoregiões de Pernambuco;

2. Avaliar *in vitro* o potencial dos isolados bacterianos obtidos para diferentes mecanismos de promoção de crescimento;

3. Avaliar a eficiência de bactérias obtidas para cada mecanismo de promoção de crescimento no milho em casa de vegetação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Capim Pangolão

O capim pangolão, classificado anteriormente como *Digitaria pentzii* e *Digitaria umfolozii*, foi reclassificado como *Digitaria eriantha* Steud. cv. Suvernola (COOK; SCHULTZE-KRAFT, 2015). É um híbrido resultante do cruzamento entre a *Digitaria setivalva* Stent e a *Digitaria valida* Stent (COOK; SCHULTZE-KRAFT, 2015), distribuída como X 46-2, também identificada como Survenola (NAVARRO et al., 2005). Esta espécie foi lançada em 1982 e difundida nos países da região centro sul-americana, principalmente no Brasil, Suriname, Venezuela, Peru, Porto Rico e México devido a sua resistência ao vírus *Pangola Stunt Virus* (PSV), transmitido pela cigarrinha *Sogata furcifera*, e a seu rendimento de forragem (SCHANK et al., 1990). Devido a essas características o pangolão foi introduzido no Brasil para substituir o capim pangola (*Digitaria decumbens*) e aumentar a produtividade de pastos (ARONOVICH; CASTAGNA; ARONOVICH, 1996).

Conhecida popularmente como pangola peluda ou capim faixa-branca, seu uso no Brasil é mais restrito à região Nordeste, principalmente Sergipe e Alagoas (SOUZA et al., 2016), apesar de apresentar qualidade e potencial produtivo para ser cultivada nas mais diversas regiões (ARONOVICH; CASTAGNA; ARONOVICH, 1996). O motivo para o sucesso nessa região deve-se às características adaptativas que proporcionam tolerância ao déficit hídrico através da capacidade de absorver orvalho, lhe permitindo ter uma certa resistência a regiões com baixa pluviosidade e baixa exigência em fertilidade do solo (NAVARRO et al., 2005).

É uma gramínea C₄ perene e fortemente estolonífera, produzindo colmos de até 120 cm de altura, simples ou ramificados na base, em linha reta ou dobrados nos nós, resistente à seca, ao fogo e ao pastejo, e que se adapta a uma ampla variedade de solos (RATTRAY, 1960), desenvolvendo-se bem em solos arenosos e argilosos, não encharcados, com pH variando entre 4,3 e 6,8 (GARCÍA; PÉREZ, 2005). Por possuir sementes estéreis, sua propagação ocorre vegetativamente por meio de mudas e estolões formando touceiras com raízes rizomatosas (RATTRAY, 1960). A produção de matéria seca varia com a fertilidade, genótipo, condições ambientais e de gestão, mas, normalmente, é de cerca de 10 a 20 t/ha. Quando cultivada em condições ideais, pode alcançar produtividade superior a 30 t/ha (COOK et al., 2005), contribuindo assim com a qualidade das pastagens e de sua produtividade. A espécie apresenta teor de proteína bruta entre 10 e 15% (GUSMÃO FILHO, 2018) e 59% de digestibilidade total de nutrientes (OLIVEIRA et al., 2015), indicando seu potencial para uso em pastagens.

Os poucos trabalhos realizados utilizando o capim pangolão demonstraram superioridade em relação a outras gramíneas para características morfogênicas e preferência alimentar. No estado de Sergipe, Souza et al. (2012), mostraram uma maior taxa de alongamento foliar e relação lâmina foliar/colmo em comparação às espécies *Brachiaria humidicola*, *Urochloa mosambicensis* e *Digitaria decumbens*, enquanto que no Agreste pernambucano, o capim pangolão foi melhor quanto ao número de perfilhos, desejabilidade e cobertura do solo quando comparada às forrageiras *Cenchrus ciliaris* L. e *Panicum maximum* Jacq. (SANTOS, 2012).

Coeficientes médios de digestibilidade *in vitro* da matéria seca acima de 60%, durante o pastejo, foram observados e associados aos menores teores de fibra em detergente neutro, por ter caules finos e alta relação folha/caule, quando comparada a outras gramíneas. Estes resultados são considerados satisfatórios para as condições semiáridas em que as pastagens estavam crescendo (COELHO et al., 2018).

Além destes pontos, outro fator a ser considerado sobre capim pangolão é a sua resiliência observada ao longo de anos em algumas áreas cultivadas em Pernambuco, principalmente em uma área de 80 hectares na Estação Experimental de Araripina do Instituto Agrônomo de Pernambuco, localizada no sertão Pernambucano. Nessa área não foram realizadas nenhuma correção de solo ou adubação durante 30 anos (TAVARES, 2017), e a gramínea continua com baixa degradação, mostrando a possibilidade da presença de bactérias promotoras de crescimento como mecanismo de sustentabilidade da cultura. Agroecossistemas complexos como pastagens tem potencial para elevada diversidade bacteriana nativa, com sua atividade, abundância e composição das populações moduladas por fatores bióticos e abióticos que influenciam a colonização nas plantas (RILLING et al., 2019).

2.2 Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas

Em meados do século XX, o interesse pelos benefícios das bactérias às plantas já despertava em pesquisadores ocidentais, com estudos da então União Soviética sobre bactérias benéficas em raízes de plantas (FREITAS, 2007). No entanto, o difícil acesso aos trabalhos soviéticos, associado à falta de análises estatísticas, atrapalhava a aceitação desses estudos, levando-os a algum descrédito por parte dos ocidentais (BURR; CAESAR, 1985).

Somente em 1978, dados resultantes de experimentação realizada por Kloepper e Schroth (1978) passaram a ser aceitos pela comunidade científica internacional. Esse trabalho

propôs pela primeira vez o termo “*plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR)”, derivando em seguida a denominação mais ampla bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP).

Desde aquela época, as atividades de pesquisa objetivavam compreender como essas bactérias realizam benefícios as plantas, e junto com o aumento no interesse de uma agricultura sustentável e ecológica, levou ao aumento do uso de práticas como a inoculação das culturas com BPCP (GARCÍA et al., 2017). Este interesse pode ser comprovado pelo número de artigos publicados neste tema (Figura 1) e aumentado de forma constante.

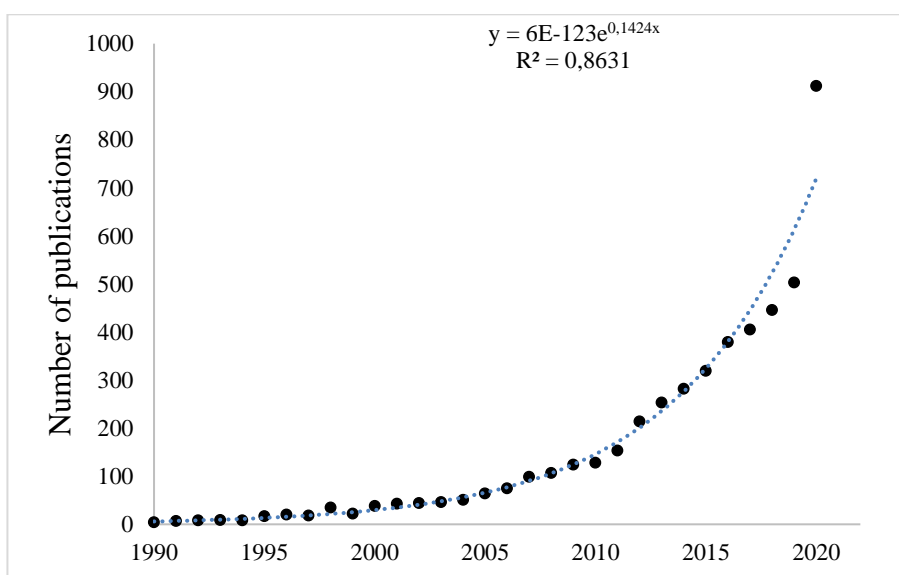


Figura 1. Evolução dos trabalhos publicados com “bactérias promotoras de crescimento de plantas”. Fonte: Scopus, 19 de janeiro de 2021, pesquisa de 1990 a 2020

Estas bactérias têm se destacado por seu potencial de aplicação na produção vegetal, permitindo a redução do uso de fertilizantes e pesticidas por estimularem o crescimento das plantas por diferentes mecanismos (ANDRADE et al., 2019).

As BPCP consistem em um amplo grupo de micro-organismos, habitando qualquer parte da planta (filosfera e tecidos internos) e rizosfera sem provocar prejuízos ao seu hospedeiro, desenvolvendo algum mecanismo que promova melhoras ao crescimento e desenvolvimento ao desempenhar papéis importantes na aptidão das plantas (PIETERSE et al., 2016; BASU et al., 2017). Essas bactérias proporcionam um benefício recíproco com o hospedeiro, pelo qual tem acesso privilegiado a nutrientes, ácidos orgânicos, açúcares, e compostos aromáticos, beneficiando-se dessas fontes de carbono e energia (ROZIER et al., 2019). As BPCP podem também suprimir micro-organismos deletérios ou patogênicos por meio do controle biológico, incluindo secreção de antibióticos, competição por nutrientes,

produção de enzimas líticas e indução de resistência sistêmica em plantas (DUCA et al., 2014; BRINGEL; COUÉE, 2015).

As BPCP podem ser de vida livre, associativa ou endofítica. As bactérias associativas colonizam tanto a superfície radicular (rizoplano) como o interior da planta (bactérias endofíticas) (BALDANI et al., 1986; MICHIELS et al., 1989). Os endófitos vivem principalmente no interior dos tecidos, podendo habitar a rizosfera e o rizoplano em alguma fase do ciclo de vida (DURAND et al., 2018; DUBEY et al., 2020). Além disso, podem habitar qualquer parte da planta sem causar qualquer sintoma visível de sua presença, com redução do estresse ambiental e da competição microbiana, proporcionando um melhor crescimento de plantas hospedeiras (QIN et al., 2011; GARCIA et al., 2015). Esses micro-organismos podem auxiliar no crescimento vegetal, desenvolvimento e induzir resistências contra estresses bióticos e abióticos, seja por fitoestimulação, biofertilização ou biocontrole (BODENHAUSEN et al., 2013; SANTOYO et al., 2016; LIU et al., 2017; AFZAL et al., 2019; RILLINGA et al., 2019). Porém, seu efeito pode ser influenciado pela espécie, cultivar, idade, tipo de tecido da planta e estresse (ANDREOTE et al. 2010; PATEL; ARCHANA, 2017)

A inoculação de BPCP pode não apenas promover a absorção de nutrientes sob condições de limitação nutricional, mas também restringir a absorção e transporte de elementos tóxicos, atenuando assim o estresse causado pela contaminação por metal pesado (MA et al., 2019; SING et al., 2019).

Bactérias de vários gêneros foram relatadas nas últimas décadas como tendo associação com plantas e capazes de promover seu crescimento, incluindo *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sphingomonas* que foram isolados de uma ampla gama de plantas (VIDEIRA et al. 2012; SILVEIRA et al., 2016; XING et al., 2016).

Porém, mundialmente, a comercialização e utilização de inoculantes contendo BPCP na agricultura abrange os gêneros *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bulkholderia*, *Pseudomonas* e *Streptomyces*, com potencial fertilizante, controle de doenças vegetais e gerenciamento de pragas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Embora os estudos e o uso de inoculantes venham sendo realizados a mais de um século, somente nos últimos dez anos ganharam uma maior importância. Durante muito tempo, no Brasil, o uso de inoculante referia-se somente àqueles contendo rizóbios, principalmente para a soja, mas em 2009 foi lançado o primeiro inoculante comercial para gramíneas, como milho,

trigo, arroz e braquiária, e co-inoculação de soja e feijão, contendo as cepas Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* (HUNGRIA et al., 2010; SANTOS et al., 2019; SANTOS et al., 2021).

O Brasil teve seus estudos com *Azospirillum* realizado inicialmente pela Dra. Johanna Döbereiner ao isolá-lo da rizosfera de *Digitaria decumbens* (DÖBEREINER; DAY, 1976), e descrever a sua capacidade de realizar FBN quando associado a gramíneas (DÖBEREINER, 1979). *Azospirillum brasilense* é uma espécie bacteriana capaz de colonizar muitas espécies de plantas cultivadas proporcionando melhoras no crescimento, desenvolvimento e produtividade (DAR et al., 2018). Sua utilização mundial como inoculante ocorre por apresentar efeitos benéficos as plantas hospedeiras proporcionando melhoria do estado nutricional das plantas (CRUZ-PÉREZ et al., 2021).

Embora o nitrogênio seja o principal nutriente limitante nos solos tropicais (PURI; PADDA e CHANWAY, 2018), a FBN por *Azospirillum* nas gramíneas nem sempre é capaz de suprir toda a demanda de N e substituir o uso de fertilizantes, exigindo a aplicação de doses complementares para atingir uma maior produtividade (SILVA et al., 2015), mas permite a redução de 25 a 50% (HUNGRIA et al., 2010; FUKAMI et al., 2016).

2.2.1 Mecanismos de Promoção de Crescimento Vegetal

Considera-se que as bactérias promotoras de crescimento têm um efeito benéfico nas plantas hospedeiras, melhorando seu crescimento por diferentes mecanismos (RIBEIRO et al., 2018). Esse benefício pode ocorrer por meio de mecanismos diretos e/ou indiretos como a fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios como ácido indol-3-acético, solubilização de fosfato inorgânico e também por meio da produção de metabólitos antimicrobianos ou sideróforos (HABIBI et al., 2014; JASIM et al., 2015).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é considerada a principal fonte de N em sistemas agrícolas e naturais (HUNGRIA; VARGAS, 2000, VITOUSEK et al., 2013). É efetuada por micro-organismos chamados de diazotróficos que são os únicos capazes de converter N₂ atmosférico em amônia, por possuíram um complexo enzimático conhecido como nitrogenase, capaz de romper a tripla ligação existente entre os dois átomos de N₂ (MASSON-BOIVIN; SACHS, 2018). Esse processo necessita de grande quantidade de energia, frequentemente proveniente da fotossíntese realizada pelas plantas hospedeiras (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011; FIDELIS et al., 2012), e tem enorme importância para os solos das regiões tropicais, tendo em vista o baixo conteúdo de nitrogênio existente (SANTIAGO et al., 2013).

A FBN foi a principal fonte de conversão do nitrogênio atmosférico em uma forma utilizável até que o processo Haber-Bosch foi descoberto no início do século 20. Neste processo, o N₂ atmosférico reage com o H₂ ou metano a pressão (200 atm) e temperatura (450 ° C) muito altas sobre um catalisador de ferro produzindo amônia (ALBERTON et al., 2020). No entanto, devido às preocupações ambientais em relação aos fertilizantes nitrogenados e ao custo adicional do cultivo, a importância do FBN voltou a ganhar foco nos sistemas de produção agrícola (LEITE et al., 2018). Assim, a associação de plantas com BPCP eficientes para a FBN pode ser altamente benéfica, especialmente em condições de baixa fertilidade do solo, contribuindo para a sustentabilidade das culturas e a recuperação de áreas degradadas (MARQUES et al., 2017). A inoculação com bactérias diazotróficas contribui para a redução de uso dos fertilizantes nitrogenados, diminuindo a emissão de milhões de toneladas de dióxido de carbono equivalente (tCO₂eq) e óxido nitroso (WEBB et al., 2014; HUNGRIA et al., 2016; KHATOON et al., 2020).

Como as gramíneas não formam associações simbióticas para a fixação de nitrogênio, sendo menos eficientes no processo do que as leguminosas (SPRENT; SPRENT, 1990). Apesar disto, tem se dado grande importância para a FBN em gramíneas visando diminuir os gastos com adubos nitrogenados que são o insumo mais caro nessas plantas principalmente para culturas como trigo, arroz, cana-de-açúcar, milho, braquiária e sorgo (RANA et al., 2020). Assim, mesmo que apenas parte do N seja fornecido através da associação com micro-organismos diazotróficos, a ideia de permitir que essas plantas obtenham o nitrogênio com menor dependência de insumos externos tem chamado a atenção da comunidade científica nas últimas décadas (SATURNO et al., 2017).

Por exemplo, a inoculação com a mistura de *A. brasilense* Ab-V5 + Ab-V6 em pós-emergência das plântulas apresenta potencial para substituir a adubação nitrogenada de cobertura na cultura do trigo (PERINI et al., 2021) e aumentou a produtividade de grãos de milho em mais de 30% (MARTINS et al., 2018) em um Latossolo com baixa capacidade de fornecimento de N.

Outro mecanismo bastante estudado de promoção de crescimento é a produção de fitohormônios como as auxinas, relacionadas ao desenvolvimento das raízes, consequentemente aumento no seu crescimento pela maior absorção de nutrientes e água do solo (MEKONNEN; KIBRET, 2021). Estas são pequenas moléculas biologicamente ativas envolvidas em vários processos fisiológicos nas plantas, desempenhando um papel importante na modulação do crescimento e desenvolvimento das plantas (SWARNALAKSHMI et al., 2020). A auxina é sintetizada na parte aérea, principalmente no meristema apical do caule e transportada de forma

unidirecional até as raízes, utilizando duas vias, o floema ou via célula, podendo se deslocar em direção à extremidade das raízes, contra a força de gravidade, dependendo de energia para ocorrer (PARK et al., 2017). Além disso, também é sintetizada por grande variedade de bactérias como *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Koccuriae*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Staphylococcus* (AIT-KAKI et al., 2014; PEREIRA; CASTRO, 2014; SCHILLACI et al., 2014; KUZMICHEVA et al., 2017; TABASSUM et al., 2017; VOLPIANO et al., 2018; ARSHAD et al., 2019; JIANG et al., 2019; MANZOOR et al., 2019).

A presença de auxinas é demonstrada em vários ambientes e com função biológica em vários organismos, principalmente em plantas onde atua como um hormônio do crescimento. Entre as auxinas, o ácido indol-3-acético (AIA), auxina natural produzida por plantas e BPCP, foi o primeiro fitohormônio descoberto que favorece o crescimento radicular, formação de órgãos, estimula germinação de sementes, influencia a formação de pigmentos, fotossíntese, biossíntese de diferentes metabólitos e nas respostas das plantas aos estímulos ambientais. (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011; PAQUE; WEIJERS, 2016; PATHANIA et al., 2020). A existência de micro-organismos com a capacidade de catabolizar ou assimilar AIA há muito é reconhecida (LAIRD; FLORES; LEVEAU, 2020). O AIA desempenha um papel fundamental na fisiologia da planta pelo envolvimento na divisão, alongamento e diferenciação celular resultando em maior massa radicular e conseqüentemente, uma maior capacidade de absorção de água e nutrientes pela planta (HUSSAIN et al., 2015; ARSHAD et al., 2016). De acordo com Oleńska et al. (2020), o AIA também é responsável por parte do sistema de comunicação e sinalização entre plantas e bactérias em um contexto ecológico para obter ganhos com o crescimento das plantas.

Os efeitos do AIA são dependentes da dose e a produção de quantidade excessivas pode inibir o crescimento da raiz em vez de promover (RAUT et al., 2017). Assim, para estimular o crescimento das plantas com AIA, esse fitohormônio deve ser cuidadosamente regulado para evitar efeitos inibitórios, então o nível endógeno ideal deve ser estritamente controlado por biossíntese, degradação, conjugação e transporte polar (ABBAS et al., 2018).

Moura et al. (2018) mostraram que o uso de *Azospirillum* na cultura da cana-de-açúcar melhorou o sistema radicular levando a uma melhor absorção de água e nutrientes que, por sua vez, pode influenciar positivamente a produtividade. Mudas de *Picea glauca x engelmannii* inoculadas com bactérias tiveram o comprimento e biomassa de raiz significativamente maior do que as mudas de controle (> 100%), talvez em função de sua capacidade de produzir AIA (PURI et al., 2020).

No milho, *Bacillus* e *Enterobacter* aumentaram significativamente o comprimento da raiz e a área da superfície da raiz, tendo *Enterobacter* sp. exibindo maiores efeitos no comprimento, diâmetro e ramificação da raiz, enquanto *Bacillus* sp. aumentou significativamente a ramificação da raiz do trigo (JOCHUM et al., 2019). Esses pesquisadores sugeriram que as alterações na arquitetura do sistema radicular de mudas de trigo e milho associadas à aplicação de PGPR ocorreram em decorrência da produção de AIA por essas bactérias.

A solubilização de fosfato é outro mecanismo bastante relatado e importante na disposição de fósforo às plantas em solos com limitada disponibilidade de fósforo. O fósforo (P) é o segundo nutriente mais exigido pelas plantas e muitas vezes um fator limitante nos solos tropicais, uma vez que a disponibilidade de P pode ser restrita devido à baixa solubilidade do elemento na solução do solo e à sua fixação aos minerais do solo (ALORI et al., 2017; HEYDARI et al., 2019). Cerca de 20-80% do P do solo encontra-se na forma inorgânicas com cálcio, ferro e alumínio, ou em formas orgânicas derivando-se de organismos em decomposição (LI et al., 2017).

A maioria dos solos tem uma grande reserva de P total, porém, a quantidade de P realmente disponível para o crescimento ideal das plantas é muito pequena, tornando a aplicação contínua de fertilizantes fosfáticos essencial para o aumento da produtividade das culturas (MAHARANA et al., 2020). No entanto, a fabricação de fertilizante P convencional inclui o tratamento químico de minério de fosfato de alto grau com ácido sulfúrico a uma temperatura elevada que é onerosa e pode causar danos ambientais (VASSILEV et al. 2006).

A solubilização de fosfato é uma das características muito importantes para selecionar micro-organismos promotores de crescimento de plantas eficazes para o desenvolvimento de bioformulações a fim de diminuir o uso de fertilizantes fosfáticos (ALAYLAR et al., 2020).

Algumas bactérias solubilizantes de fosfatos foram lançadas como inoculantes comerciais, como QuickRoots[®], da AcceleronSAS nos Estados Unidos (MONSANTO, 2018). No Brasil, o primeiro inoculante comercial, Biomaphos[®], contendo bactérias solubilizadoras de fosfato (*Bacillus subtilis* e *B. megaterium*) foi lançado em 2019, pela Embrapa Milho e Sorgo e a empresa Biomas, pesquisando e selecionando microrganismos solubilizadores de fosfato durante quase 20 anos. Nos estudos feitos em áreas produtoras de milho, a aplicação do Biomaphos[®] resultou em ganho médio de produtividade de milho de 8,9% (OLIVEIRA et al., 2020).

Bacillus é um dos gêneros de BPCP mais versáteis, pela capacidade de formação de endósporos, pela sua adaptação a ambientes adversos de temperaturas, pH ou exposição a

pesticidas, permitindo sua sobrevivência por longos períodos nessas condições, podendo promover o crescimento da planta, aumentar o rendimento, solubilizar potássio e fosfato, e resistência sistêmica induzida (ISR) sob ataques de patógenos (WU et al., 2015; FERREIRA et al., 2019; LEAL et al., 2021).

Essa mobilização está associada principalmente à liberação de ácidos orgânicos e enzimas como as fosfatases e fitases (PRASAD et al., 2019; ZAHEER et al., 2019), convertendo, assim, o fosfato em formas disponíveis para plantas. Outros mecanismos estariam relacionados a extrusão de prótons de H^+ acompanhada de absorção de NH_4^+ ou pelo mecanismo de translocação de H^+ pela enzima H^+ - ATPase no processo de liberação de energia pela hidrólise do ATP (CANELLAS et al., 2006). Recentemente, estudos relatam que exudação de exopolissacarídeos e sideróforos também podem ter efeito na solubilização de fósforo, pela complexação dos cátions ligados ao P, algo que ainda é pouco conhecido (YI et al., 2008; JING et al., 2017). Independente do mecanismo utilizado, deve prevalecer a importância da inoculação com esses micro-organismos solubilizadores, sugerindo-os como forma de diminuir o uso de fertilizantes fosfatados, desenvolvendo uma agricultura sustentável e mais econômica.

Rosa et al. (2020) avaliaram o efeito da inoculação de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* e *Azospirillum brasilense* e cinco doses de P na cana-de-açúcar e relataram que a inoculação pode desempenhar um papel fundamental no cultivo, gerando grandes benefícios à cultura e economizando até 75% do custo com fertilizantes. Esses resultados revelaram que a combinação de *Azospirillum brasilense* e *Bacillus subtilis* aliada ao baixo uso do P_2O_5 foi o melhor manejo de fertilizantes na cana-de-açúcar. *Pantoea* sp. promoveu significativamente o aumento da altura da planta, a biomassa, o crescimento da raiz e a absorção de P em arroz mostrando alta capacidade de solubilização de P para P_i e P_o (CHEN; LIU, 2019). Quatro cepas de actinobactéria mostraram alta eficiência de desempenho na solubilização de rocha fosfatada, melhorando a nutrição em P e crescimento do milho (SOUMARE et al., 2021).

As BPCP também podem produzir moléculas de baixo peso molecular (entre 500 e 1500 dalton), conhecidas com sideróforos, que atuam como agentes quelantes específicos com alta afinidade com o íon Fe^{3+} , permitindo sua solubilização e extração de minerais e compostos orgânicos (KHAN et al., 2018; MILJAKOVIĆ et al., 2020). Existem vários tipos de sideróforos produzidos por micro-organismos, sendo os grupos mais comuns o catecolato, hidroxomato e carboxilato (KHAN et al., 2018). Em trabalhos recentes foi relatado que compostos sintéticos contendo grupos catecolato e hidroxamato são potenciais quelantes de ferro para nutrição de ferro em plantas (MARTINS et al., 2018; FERREIRA et al., 2019).

Em geral, a aquisição de ferro começa com a ligação dos sideróforos excretados com o íon férrico disponível formando um complexo ferro-sideróforo e, em seguida, ligado à proteína receptora específica presente na superfície da célula microbiana (KHAN; SINGH; SRIVASTAVA, 2018).

Bactérias produtoras dessas moléculas podem atuar como agentes de biocontrole (BENEDUZI et al., 2012). Essas bactérias que produzem sideróforos competem com fitopatógenos ao adquirirem o ferro disponível no ambiente (SULOCHANA et al., 2014). Em contrapartida, os sideróforos de bactérias (ou plantas) quelam o ferro e o disponibilizam para as plantas (SINHA; PARLI, 2020).

Estudos têm empregado rizobactérias produtoras de sideróforos como potenciais agentes de biocontrole, uma vez que esses compostos quelantes de ferro têm sido envolvidos na ação antifúngica de patógenos vegetais pela privação deste nutriente (KOUR et al., 2019). Por exemplo, o *Bacillus subtilis* produtor de sideróforo reduziu a incidência de murcha de *Fusarium* e aumentou o crescimento e a produção em guandu (DUKARE; PAUL, 2021). A inoculação com *Sphingobium fuliginis* mostrou efeitos benéficos na soja, principalmente no nível da raiz pela melhora da atividade do quelato férrico (111%), resultando no aumento do teor de Fe da raiz (62%), sugerindo que a inoculação pode ser eficaz em melhorar a absorção e o acúmulo de Fe em solos calcários com deficiência desse elemento (RORIZ et al., 2021).

Os óxidos de ferro do solo são os principais adsorventes de fósforo (P), devido à alta afinidade do P com a superfície ativa dos óxidos de Fe. Portanto, a interação entre as espécies P e a superfície do óxido de Fe normalmente resulta em complexação (RUTTENBERG; SULAK, 2011; LI et al., 2013; FENG et al., 2016). Os sideróforos podem se comportar como outros ácidos orgânicos que podem afetar a maneira como o P foi complexado, ou seja, quebrando as camadas fixadoras do P, induzindo a dissolução (JOHNSON; LOEPPERT, 2006), uma vez que essas moléculas atuam como agentes solubilizantes para o ferro de minerais ou compostos orgânicos.

Além do Fe, os sideróforos também têm a capacidade de se ligar a uma variedade de metais no ambiente, agindo assim como agentes de biorremediação (HOFMANN et al., 2021). Há evidências de que os sideróforos formam compostos estáveis com outros metais potencialmente tóxicos, como Al, Cd, Cu, Pb, Zn e As (SINGH et al., 2020), tornando-se vantajoso para aliviar o estresse das plantas causado por metais potencialmente tóxicos presentes em solos poluídos (AHEMAD; KIBRET, 2014).

Também é relatado que rizobactérias produtoras de sideróforos podem representar uma alternativa promissora aos fertilizantes químicos devido ao combate simultâneo aos efeitos do estresse salino e ao aumento do ferro disponível em solos salinos (FERREIRA et al., 2019).

2.3 Estudo da Diversidade Bacteriana Endofítica

Agroecossistemas complexos como pastagens tem potencial para 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 (RILLING et al., 2019).

As pesquisas com bactérias promotoras de crescimento necessitam como passo inicial realizar os procedimentos de isolamento, caracterização e utilização dessas bactérias (SILVA et al., 2013), para que em seguida sejam identificadas por técnicas moleculares. Alguns trabalhos demonstram a importância da avaliação da diversidade e potencial de promoção de crescimento das comunidades endofíticas por meio de técnicas de isolamento e caracterização, principalmente em diferentes ambientes (DWIVEDI et al., 2015; GRESSHOFF et al., 2015; RODRÍGUEZ-BLANCO et al., 2015; SOUZA et al., 2015; JEZ; LEE; SHERP, 2016; SILVA et al., 2016; SANTOYO et al., 2016). Embora a caracterização fenotípica clássica seja frequentemente utilizada para identificação de micro-organismos, não permite diferenciar entre espécies e estirpes, mas quando realizada juntamente com técnicas moleculares, resultam na identificação microbiana confiável.

O desenvolvimento da biologia molecular foi uma das maiores conquistas da ciência no século XX (VALONES et al., 2009). Por volta da década de 80, o estudo da diversidade e ecologia de micro-organismos em ambientes naturais por meio de técnicas moleculares começou a ser utilizado, tendo como princípio a aplicação de biomarcadores, moléculas com regiões altamente conservadas ou variáveis, consideradas a impressão digital, ou seja, específica de cada organismo (PACE et al., 1986; HEAD; SAUNDERS; PICKUP, 1998).

Com os avanços da biologia molecular, através de técnicas de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA, tem sido possível a identificação de novos micro-organismos bacterianos. O método de PCR foi desenvolvido em 1983 por um químico com doutorado em bioquímica chamado Kary Mullis, baseando-se na duplicação de DNA, na qual tornou-se uma das técnicas mais realizadas em laboratórios de molecular, é um método de síntese enzimática de fragmentos de DNA que inclui as etapas de desnaturação, anelamento e extensão (ou polimerização) (NONOHAY; HEPP, 2017). A PCR é uma técnica

molecular que a partir da extração do DNA, permite a síntese de ácidos através dos quais um segmento de DNA ou RNA pode ser especificamente replicado, possibilitando a amplificação de sequências de interesse utilizando primers ou iniciadores específicos ou ao acaso e primers de regiões conservadas do DNA. Esses primers são pequenas sequências de DNA, construídas artificialmente, complementares e específicas a duas regiões distintas no DNA microbiano de interesse (OLIVEIRA et al., 2007).

A utilização de métodos moleculares tem ajudado na identificação da diversidade de bactérias promotoras de crescimento. Técnicas da biologia molecular que utilizam marcadores como por exemplo BOX-PCR têm permitido estudar a variabilidade genética microbiana em plantas. A técnica de BOX-PCR consiste na análise de perfis de DNA que detecta regiões repetitivas e altamente conservadas localizados no cromossomo bacteriano impossibilitando que estirpes distintas apresentem o mesmo perfil de bandas (EL-BADAWY et al., 2020). Lima et al. (2020) estudando a diversidade genética da comunidade bacteriana promotora de crescimento de plantas em cana-de-açúcar relataram alta diversidade bacteriana e baixa similaridade entre os isolados por BOX-PCR, visualizando bandas entre 100 e 2000 pb. Os dados da BOX-PCR mostraram diversidade intragênica e intraespecífica e puderam discriminar estirpes em bromélias mostrando que a diversidade de bactérias epifíticas e endofíticas foi maior do que a observada na análise morfológica (VIANA et al., 2020). O perfil BOX-PCR de 93 isolados de *Bradyrhizobium* também revelou variabilidade genética em cana de açúcar com alguns genótipos dominantes (até 18 representantes) e menos dominantes (MENEZES JÚNIOR et al., 2019).

Para que possam ser conhecidas a nível de gênero e espécie, a identificação das bactérias é baseada no sequenciamento de genes. A maioria dos estudos de filogenia é fundamentada no RNA ribossomal (rRNA) por representar um bom marcador universal, particularmente o de menor subunidade (16S) pela alta preservação de suas sequências (WOŹNIAK et al., 2018). Esta aplicação está baseada no fato de genes serem altamente conservados e possuírem diferentes domínios, alguns conservados e outros variáveis. As regiões conservadas entre as espécies são utilizadas como molde para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores tornando possível à amplificação da região por PCR enquanto as regiões variáveis permitem a distinção filogenética dos micro-organismos (RONG; HUANG, 2014).

Wu et al. (2021) por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA, encontraram cinco filos bacterianos dominantes entre as comunidades bacterianas endofíticas das duas espécies de gramíneas, *Phragmites australis* e *Chloris virgata*, e incluindo Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e mostraram que a diversidade de *Chloris virgata* era maior do que

Phragmites australis.

Diante do exposto, o uso da inoculação com bactérias promotoras de crescimento tem sido uma alternativa considerada viável, mais econômica e ecológica para reduzir os impactos causados ao ambiente pela utilização de insumos agrícolas poluentes e onerosos, principalmente os nitrogenados.

Embora muitos micro-organismos promotores de crescimento tenham sido detectados em associação com as mais diversas gramíneas, a diversidade dessas bactérias associadas ao capim pangolão ainda permanece desconhecida. Assim, o estudo da diversidade de bactérias associadas com a cultura do pangolão pode fornecer informações valiosas para o conhecimento sobre a interação planta/bactéria, além da possibilidade de ser fonte para a seleção de bactérias cultiváveis com potencial para a inoculação e reconhecer as estratégias que podem beneficiar a produção de outras culturas.

2.4 Referências

- ABBAS, M.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, J.; POLLMANN, S.; SAMODELOV, S. L.; KOLB, M.; FRIML, J.; HAMMES, U. Z.; ZURBRIGGEN, M. D.; BLÁZQUEZ, M. A.; ALABADÍ, D. Auxin methylation is required for differential growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 26, p. 6864 -6869, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1806565115>
- AFZAL, I.; SHINWARI, Z.; SIKANDAR, S.; SHAHZAD, S. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological Research**, v.221, p. 36-49. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>.
- AHEMAD, M.; AND KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. **Journal of King Saud University**, v. 26, p. 1–20, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- AIT-KAKI, A.; KACEM-CHAOUICHE, N.; ONGENA, M; KARA-ALI, M.; DEHIMAT, L.; KAHLAT, K.; THONART, P. *In vitro* and *in vivo* characterization of plant growth promoting *Bacillus* strains isolated from extreme environments of eastern Algeria. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 1735-1746, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0617-0>
- ALAYLAR, B.; EGAMBERDIEVA, D.; GULLUCE, M.; KARADAVI, M.; ARORA, N. K. Integration of molecular tools in microbial phosphate solubilization research in agriculture perspective. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 93, 2020. DOI: <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11274-020-02870-x>

ALBERTON, D.; VALDAMERI, G.; MOURE, V. R.; MONTEIRO, R. A.; PEDROSA, F. O.; MÜLLER-SANTOS, MARCELO, DE SOUZA, E. M. What did we learn from plant growth-promoting rhizobacteria (pgpr)-grass associations studies through proteomic and metabolomic approaches?. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, p. 281, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020>.

ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; BABALOLA, O. O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 971, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>

ANDRADE, A. F.; ZOZ, T.; ZOZ, A.; OLIVEIRA, C. E. S.; WITT, T. W. *Azospirillum brasilense* inoculation methods in corn and sorghum. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, e53027, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4953027>

ANDREOTE, F. D.; ROCHA, U. N.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; OVERBEEK, L.S. Effect of bacterial inoculation, plant genotype and developmental stage on root-associated and endophytic bacterial communities in potato (*Solanum tuberosum*). **Antonie van Leeuwenhoek - Journal of Microbiology**, Seoul, v. 4, p. 389-399, 2010.

ARONOVICH, S.; CASTAGNA, A. A.; ARONOVICH, M. Potencial das gramíneas do gênero *Digitaria* para produção animal na Região Sudeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.11, p.829-834, 1996.

ARSHAD, M.; LEVEAUE, J. H.; ASAD, S.; IMRAN, A.; MIRZA, M. S. Comparison of rhizospheric bacterial populations and growth promotion of avp1 transgenic and non-transgenic cotton by bacterial inoculations. **Journal of Animal & Plant Sciences**, Lahore, v. 26, p. 1284-1290, 2016.

ARSHAD, M.; JAVAID, A.; MANZOOR, M.; HINA, K.; ALI, M. A.; AHMED, I. Isolation and identification of chromium-tolerant bacterial strains and their potential to promote plant growth. **E3S Web of Conferences**, v. 96, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20199601005>

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* ge. nov.; sp. nov.; a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Salamanca, v.36, p.86-93, 1986.

BASU, S.; RABARA, R.; NEGI, S. Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. **Plant Gene**, Netherlands, v. 12, p. 43-49, 2017.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promotion rhizobacteria (PGPR): Their potencial as antagonists and biocontrol agentes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 1044-1051, 2012.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327-1350, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

BODENHAUSEN, N.; HORTON, M. W.; BERGELSON, J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 8, n. 2, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329>

BRINGEL, F.; COUÉE, I. Pivotal roles of phyllosphere microorganisms at the interface between plant functioning and atmospheric trace gas dynamics. **Frontiers in microbiology**, v.6, p. 486, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00486>

BURR, T. J.; CAESAR, A. Beneficial plant bacteria. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 2, n. 1, p. 1-20, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt0388-282>

CANELLAS, L. P.; ZANDONADI, D. B.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. R. Efeitos fisiológicos de substâncias húmicas – o estímulo às H⁺-ATPases. In: FERNANDES, M.S. Nutrição mineral de plantas. Viçosa: SBCS, 2006.

CHEN, Q.; LIU, S. Identification and characterization of the phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea* sp. S32 in reclamation soil in Shanxi, China. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2171, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02171>

COÊLHO, J.; MELLO, A.; SANTOS, M.; DUBEUX JR, J.; CUNHA, M.; LIRA, M. Prediction of the nutritional value of grass species in the semiarid region by repeatability analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 53, n. 3, p. 378-385. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2018000300013>.

COOK, B. G.; PENGELLY, B. C.; BROWN, S. D.; DONNELLY, J. L.; EAGLES, D. A.; FRANCO, M. A.; HANSON, J.; MULLEN, B. F.; PARTRIDGE, I. J.; PETERS, M.; SCHULTZE-KRAFT, R. Tropical forages: an interactive selection tool. Brisbane: CSIRO, DPI&F (Qld), CIAT, ILRI, 2005.

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.

CRUZ-PÉREZ, J. F.; LARA-OUEILHE, R.; MARCOS-JIMÉNEZ, C.; CUATLAYOTL-OLARTE, R.; XIQUI-VÁZQUEZ, M. L.; REYES-CARMONA, S. R.; BACA, B. E.; RAMÍREZ-MATA, A. Expression and function of the *cdgD* gene, which encodes a CHASE-PAS-DGC-EAL domain protein, in *Azospirillum brasilense*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 520, 2021. DOI: <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1038/s41598-020-80125-3>

DAR, Z. M.; MASOOD, A.; MUGHAL, A. H.; ASIF, M.; MALIK, M. A. Review on plant growth promoting rhizobacteria. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 7, n. 3, p. 2802-2804, 2018. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.053>.

DÖBEREINER, I. Fixação de nitrogênio em gramíneas tropicais. **Interciência**, v. 4, p. 200-205, 1979.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION. Pullman: WSU Press, p.518–538, 1976.

DUBEY, A.; MALLA, M. A.; KUMAR, A.; DAYANANDAN, S.; KHAN, M. L. Plants endophytes: unveiling hidden agenda for bioprospecting toward sustainable agriculture, **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 40, n. 8, p. 1210-1231, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1808584>

DUCA, D.; LORV, J.; PATTEN, C. L.; ROSE, D.; GLICK, B. R. Indole-3-acetic acid in Plant–microbe Interactions. **Antonie van Leeuwenhoek - Journal of Microbiology**, Seoul, v. 106, 85-125, 2014.

DUKARE, A.; PAUL, S. Biological control of *Fusarium* wilt and growth promotion in pigeon pea (*Cajanus cajan*) by antagonistic rhizobacteria, displaying multiple modes of pathogen inhibition. **Rhizosphere**, v. 17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100278>.

DURAND, A.; MAILLARD, F.; ALVAREZ-LOPEZ, V.; GUINCHARD, S.; BERTHEAU, C.; VALOT, B.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M. Bacterial diversity associated with poplar trees grown on a Hg-contaminated site: Community characterization and isolation of Hg-resistant plant growth-promoting bacteria. **Science of the Total Environment**, v. 622, p. 1165-1177, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.069>.

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.

EL-BADAWY, M. F.; EL-FAR, S. W.; ALTHOBAITI, S. S.; ABOU-ELAZM, F. I.; SHOHAYEB, M. M. The First Egyptian Report Showing the Co-Existence of *bla*_{NDM-25}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-181}, and *bla*_{GES-1} Among Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae* Clinical Isolates Genotyped by BOX-PCR. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1237—1250, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S244064>

ELMAGZOB, A. A. H.; IBRAHIM, M. M.; ZHANG, G. Seasonal diversity of endophytic bacteria associated with *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. **Diversity**, v. 11, n. 7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/d11070112>

FENG, X.; YAN, Y.; WAN, B.; LI, W.; JAISI, D. P.; ZHENG, L.; ZHANG, J.; LIU, F. Enhanced dissolution and transformation of ZnO nanoparticles: the role of inositol hexakisphosphate. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 5651-5660, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00268>

FERREIRA, C. M. H.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **Science of the Total Environment**, v. 10, n. 682, p. 779-799, 2019a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.225>.

FERREIRA, M. J.; SILVA, H.; AND CUNHA, A. Siderophore-producing rhizobacteria as a promising tool for empowering plants to cope with iron limitation in saline soils: a review. **Pedosphere**, v. 29, p. 409–420, 2019b. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(19\)60810-6](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(19)60810-6)

FIDELIS, R. R.; RODRIGUES, A. M.; SILVA, G. F.; BARROS, H. B.; PINTO, A. C.; AGUIAR, R. W. S. Eficiência do uso de nitrogênio em genótipos de arroz de terras altas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 1, p. 124-128, 2012.

FREITAS, S. S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. Microbiologia do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agrônômico, p. 1-20, 2007.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 3, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>

GARCIA, G.; PÉREZ, G. Uso y manejo de pastizales el la cría intensiva de ovinos y caprinos. In: URDANETA, L.C.D. & MILANO, G.M. Manual de Produccion de Caprinos y Ovinos. INIA. Centro de Investigaciones Agrícolas del Estado Lara. Barquisimeto. Venezuela 2005.

GARCIA, J. E.; MARONICHE, G.; CREUS, C.; SUÁREZ-RODRÍGUEZ, R.; RAMIREZ-TRUJILLO, J. A.; GROPPA, M. D. *In vitro* PGPR properties and osmotic tolerance of different *Azospirillum* native strains and their effects on growth of maize under drought stress. **Microbiological Research**, v. 202, p. 21-29, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.04.007>

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, p. 1-9, 2015.

GRESSHOFF, P. M.; HAYASHI, S.; BISWAS, B.; MIRZAEI, S.; INDRASUMUNAR, A.; REID, D.; SAMUEL, S.; TOLLENAERE, A.; VAN HAMEREN, B.; HASTWELL, A.; SCOTT, P.; FERGUSON, B. J. The value of biodiversity in legume symbiotic nitrogen fixation and nodulation for biofuel and food production. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 172, n. 172, p. 128-136, 2015.

GUSMÃO FILHO, J. D. *Digitaria eriantha* cv. survenola submetido a alturas de desfloração. 79 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 2018.

HABIBI, S.; DJEDIDI, S.; PRONGJUNTHUEK, K.; MORTUZA, M. F.; OHKAMA-OHTSU, N.; SEKIMOTO, H.; YOKOYOMA, T. Physiological and genetic characterization of rice nitrogen fixer PGPR isolated from rhizosphere soils of different crops. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 379, p. 51-66, 2014.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R.W. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microbial Ecology**, v.35, p. 1-21, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002489900056>

HEYDARI, M. M.; BROOK, R. M.; JONES, D.L. The role of phosphorus sources on root diameter, root length and root dry matter of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, n. 1, p. 1-15, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1509996>

HOFMANN, M.; HEINE, T.; MALIK, L.; HOFMANN, S.; JOFFROY, K.; SENEGES, C.H.R.; BANDOW, J.E.; TISCHLER, D. Screening for microbial metal-chelating siderophores for the removal of metal ions from solutions. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 111, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010111>

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant Soil**, v. 331, p. 413-25, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>

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.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, n.2, p.151-164, 2000.

HUSSAIN, A.; SHAH, S. T.; RAHMAN, H.; IRSHAD, M.; IQBAL, A. Effect of IAA on *in vitro* growth and colonization of Nostoc in plant roots. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 6, p. 1–9, 2015.

JASIM, B.; GEETHU, P. R.; MATHEW, J.; RADHAKRISHNAN, E. K. Effect of endophytic *Bacillus sp.* from selected medicinal plants on growth promotion and diosgenin production in *Trigonella foenum-graecum*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 122, p. 565–572, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0788-1>

JEZ, J. M.; LEE, S. G.; SHERP, A. M. The next green movement: Plant biology for the environment and sustainability. **Science**, New York, v. 353, p. 1241-1244, 2016.

JIANG, H.; QI, P.; WANG, T.; CHI, X.; WANG, M.; CHEN, M.; PAN, L. Role of halotolerant phosphate-solubilising bacteria on growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea*) under saline soil. **Annals of Applied Biology**, v. 174, n. 1, p. 20-30, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/aab.12473>

JING, Z.; CHEN, R.; WEI, S.; FENG, Y.; ZHANG, J.; LIN, X. Response and feedback of C mineralization to P availability driven by soil microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 105, p. 111-120, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.11.014>

JOCHUM, M. D.; MCWILLIAMS, K. L.; BORREGO, E. J.; KOLOMIETS, M. V.; NIU, G.; PIERSON, E. A.; JO, Y. K. Bioprospecting Plant Growth-Promoting Rhizobacteria That Mitigate Drought Stress in Grasses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2106, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02106>

JOHNSON, S. E.; LOEPPERT, R. H. Role of organic acids in phosphate mobilization from iron oxide. **Soil Science Society of America Journal**, v. 70, p. 222-234, 2006. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssaj2005.0012>

KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-siderophore: A review. **Microbiological Research**, p. 212–213, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>

KHATOON, Z.; HUANG, S.; RAFIQUE, M.; FAKHAR, A.; KAMRAN, M. A.; SANTOYO, G. Unlocking the potential of plant growth-promoting rhizobacteria on soil health and the sustainability of agricultural systems. **Journal of Environmental Management**, v. 273, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111118>.

KLOEPPER, J. W.; SHROTH, M. N. In promoting rhizobacteria on radishes. In: International Conference of Plant Pathogenic Bacteria, 6.; 1978, Angers. Proceedings... Angers: [s.n.], p. 879-882, 1978.

KOUR, D.; RANA, K. L.; YADAV, N.; YADAV, A. N.; KUMAR, A.; MEENA, V. S.; SAXENA, A. K. Rhizospheric microbiomes: biodiversity, mechanisms of plant growth promotion, and biotechnological applications for sustainable agriculture. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability*, Springer, Singapore, p. 19-65, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_2

KUZMICHEVA, Y. V.; SHAPOSHNIKOV, A. I.; PETROVA, S. N.; MAKAROVA, N. M.; TYCHINSKAYA, I. L.; PUHALSKY, J. V.; PARAHIN, N. V.; TIKHONOVICH, I. A.; BELIMOV, A. A. Variety specific relationships between effects of rhizobacteria on root exudation, growth and nutrient uptake of soybean, **Plant Soil**, v. 419, p. 83-96, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3320-z>

LAIRD, T. S.; FLORES, N.; LEVEAU, J. H. J. Bacterial catabolism of indole-3-acetic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10938-9>.

LEAL, C.; FONTAINE, F.; AZIZ, A.; EGAS, C.; CLÉMENT, C.; TROTEL-AZIZ, P. Genome sequence analysis of the beneficial *Bacillus subtilis* PTA-271 isolated from a *Vitis vinifera* (cv. Chardonnay) rhizospheric soil: assets for sustainable biocontrol. **Environmental Microbiome**, v. 16, n. 3, 2021. DOI: <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s40793-021-00372-3>

LEITE, R. C.; DOS SANTOS, J. G. D.; SILVA, E. L.; ALVES, C. R. C. R.; HUNGRIA, M.; LEITE, R. C.; DOS SANTOS, A. C. Productivity increase, reduction of nitrogen fertiliser use and drought-stress mitigation by inoculation of Marandu grass (*Urochloa brizantha*) with *Azospirillum brasilense*. **Crop and Pasture Science**, v. 70, p. 61-67, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1071/CP18105>

LI, W.; FENG, X.; YAN, Y.; SPARKS, D. L.; PHILLIPS, B. L. Solid-state NMR spectroscopic study of phosphate sorption mechanisms on aluminum (hydr)oxides. **Environmental Science & Technology**, v. 47, p. 8308-8315, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/es400874s>

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, p. 1-16, 2017.

- LIMA, D. R. M.; SANTOS, I. B.; OLIVEIRA, J. T.C. COSTA, D. P.; QUEIROZ, J. V. J.; ROMAGNOLI, E. M.; ANDREOTE, F. D.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Genetic diversity of N-fixing and plant growth-promoting bacterial community in different sugarcane genotypes, association habitat and phenological phase of the crop. **Archives Microbiology**, 2020. DOI: <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00203-020-02103-7>
- LIU, Y.; WANG, W.; ZHOU, Y.; YAO, S.; DENG, L.; ZENG, K. Isolation, identification and *in vitro* screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit. **Biological Control**, v. 110, p. 18-24, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.002>
- MA, Y.; VOSÁTKA, M.; FREITAS, H. Beneficial microbes alleviate climatic stresses in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 595, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00595>
- MANZOOR, M.; GUL, I.; AHMED, I.; ZEESHAN, M.; HASHMI, I.; AMIN, B. A. Z.; ARSHAD, M. Metal tolerant bacteria enhanced phytoextraction of lead by two accumulator ornamental species. **Chemosphere**, v. 227, p. 561-569, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.093>
- MARQUES, A. C. R.; OLIVEIRA, L. B.; NICOLOSO, F. T.; JACQUES, R. J. S.; GIACOMINI, S. J.; QUADROS, F. L. F. Biological nitrogen fixation in C4 grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. **Applied Soil Ecology**, v.113, p. 54–62, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.01.011>
- MARTINS, M. R.; JANTALIA, C. P.; REIS, V. M.; DÖWICH, I.; POLIDORO, J. C.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Impact of plant growth-promoting bacteria on grain yield, protein content, and urea-15 N recovery by maize in a cerrado oxisol. **Plant Soil**, v. 422, p. 239–250, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3193-1>
- MASSON-BOIVIN, K.; SACHS, J. L.; Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 44, p. 7-15, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.12.001>.
- MEKONNEN, H., KIBRET, M. The roles of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable vegetable production in Ethiopia. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 8, n. 15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-021-00213-y>
- MENEZES JÚNIOR, A. I.; MATOS, G. F.; FREITAS, K. M.; JESUS, E. C.; ROUWS, L. F. M. Occurrence of diverse *Bradyrhizobium* spp. in roots and rhizospheres of two commercial Brazilian sugarcane cultivars. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 759–767, 2019. DOI: <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s42770-019-00090-6>
- MICHIELS, K.; VANDERLEYDEN, J.; VAN GOOL, A. *Azospirillum* - plant root associations: A review. **Biology and Fertility of Soils**, v.8, p.356–368, 1989. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00263169>

MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. **Microorganisms**, v. 8, p. 1037, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>

MOHARANA, P. C.; BISWAS, D. R.; GHOSH, A.; SARKAR, A. Variability of crop residues determines solubilization and availability of phosphorus fractions during composting of rock phosphate enriched compost *vis-à-vis* ordinary compost. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 51, n. 15, p. 2085 - 2101, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103624.2020.1784921>

MONSANTO. Quickroots. Estados Unidos. Disponível em: < <http://www.acceleronsas.com/products/Pages/QuickRoots-Forage.aspx> >. Acesso em: 07 de maio de 2021.

MOURA, R. T. D. A.; GARRIDO, M. D. S.; SOUSA, C. D. S.; MENEZES, R. S. C.; AND SAMPAIO, E. V. D. S. B. Comparison of methods to quantify soil microbial biomass carbon. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 40, p. 39451, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v40i1.39451>

NAVARRO, L.; RODRÍGUEZ, I.; GONZÁLEZ, S.; TORRES, A. Umfolozi o Pangola Peluda: Un pasto que Comienza a ser Cultivado. **Inia Divulga**, v.2, p.29-32, 2005.

NONOHAY, J. S.; HEPP, D. Técnicas e análises de biologia molecular. **Biotechnologia II**, v. 1, p. 1–23, 2017.

OLEŃSKA, E.; MAŁEK, W.; WÓJCIK, M.; SWIECICKA, I.; THIJS, S.; VANGRONSVELD, J. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of The Total Environment**, v. 743, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>.

OLIVEIRA, C. A.; COTA, L. V.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SOUSA, S. M.; LANA, U. G. P.; SANTOS, F. C.; PINTO JUNIOR, A. S.; ALVES, V. M. C. Viabilidade técnica e econômica do Biomaphos® (*Bacillus subtilis* CNPMS B2084 e *Bacillus megaterium* CNPMS B119) nas culturas de milho e soja. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.

OLIVEIRA, V. S.; MORAIS, J. A. S.; FAGUNDES, J. L. SANTANA, J. C. S.; LIMA, I. G. S.; SANTOS, C. B. Produção e composição químico-bromatológica de gramíneas tropicais submetidas a dois níveis de irrigação. **Archives of veterinary science**, v. 20, p.7-36, 2015.

PACE, N. R.; STAHL, D. A.; LANE, D. J.; OLSEN, G. J. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. **Advances in Microbial Ecology**, v. 9, p. 1-55, 1986. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4757-0611-6_1

PAQUE, S.; WEIJERS, D. Auxin: the plant molecule that influences almost anything. **BMC Biology**, v. 14, p. 67, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0291-0>

PARK, S.; ELHITI, M.; WANG, H.; XU, A.; BROWN, D.; WANG, A. Adventitious root formation of *in vitro* peach shoots is regulated by auxin and ethylene. **Scientia Horticulturae**, v. 226, p. 250 – 260, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.053>.

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, p. 99–116, 2017.

PATHANIA, P.; RAJTA, A.; SINGH, P. C.; BHATIA, R. Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 30, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101842>.)

PEREIRA, S. I. A.; CASTRO, P. M. L. Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their potential as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. **Environmental Science & Policy**, v. 24, p. 14110-14123, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3309-6>

PERINI, L. J.; ZEFFA, D. M.; ROESLER, W. R.; ZUCARELI, C.; GONÇALVES, L. S. A. Co-inoculation and inoculation methods of plant growth-promoting bacteria in wheat yield performance. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 42, n. 1, p. 43-56, 2021.

PIETERSE, C. M. J.; DE JONGE, R.; BERENDSEN, R. L. The soil-borne supremacy. **Trends in Plant Science**, Kidlington, Oxford, v. 21, n. 3, p. 171-173, 2016.

PRASAD, M.; SRINIVASAN, R.; CHAUDHARY, M.; CHOUDHARY, M.; JAT, L. K. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture: perspectives and challenges PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture. **Woodhead Publishing**, p. 129-157, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815879-1.00007-0>

PURI, A.; PADDA, K. P.; CHANWAY, C. P. Nitrogen-fixation by endophytic bacteria in agricultural crops: recent advances. KHAN, A.; FAHAD, S. (Eds.), **Nitrogen in Agriculture – Updates**, IntechOpen, London, p. 73-94, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.71988>

PURI, A.; PADDA, K. P.; CHANWAY, C. P. *In vitro* and *in vivo* analyses of plant-growth-promoting potential of bacteria naturally associated with spruce trees growing on nutrient-poor soils. **Applied Soil Ecology**, v. 149, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103538>.

QIN, S.; XING, K.; JIANG, J. H.; XU, L. H.; LI, W. J. 2011. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 89, p. 457-473, 2011.

RANA, K. L.; KOUR, D.; SHEIKH, I.; DHIMAN, A.; YADAV, N.; RASTEGARI, A.; YADAV, A. N.; SINGH, K.; SAXENA, A. Endophytic fungi: biodiversity, ecological significance, and Potential Industrial Applications, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-10480-1_1.

RATTRAY, J. M. A Cobertura De Grama Da África. FAO, Roma, Itália, 1960.

RAUT, V.; SHAIKH, I.; NAPHADE, B.; PRASHAR, K.; ADHAPURE, N. Plant growth promotion using microbial IAA producers in conjunction with azolla: A novel approach. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0083-3>.

REINHOLD-HUREK, B; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, Londres, v. 4, p. 35-43, 2011.

RIBEIRO, V. P.; DE MARRIEL, I. E.; SOUSA, S. M.; LANA, U. G. P.; MATTOS, B. B.; OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 40–46, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>

RILLINGA, J. I.; ACUÑA, J. A.; NANNIPIERID, P.; CASSANE, F.; ARUYAMAC, 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**, New York, v. 51, n. 3, p. 391-402, 2015.

RONG, X.; HUANG, Y. Chapter 11 - Multi-locus Sequence Analysis: Taking Prokaryotic Systematics to the Next Level, Editor(s): Goodfellow, M.; Sutcliffe, I.; Chun, J. Methods in Microbiology, **Academic Press**, v. 41, p. 221 – 251, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.mim.2014.10.001>.

RORIZ, M.; PEREIRA, S. I. A.; CASTRO, P. M. A.; CARVALHO, S. M. A.; VASCONCELOS, M. W. Iron metabolism in soybean grown in calcareous soil is influenced by plant growth-promoting rhizobacteria – A functional analysis. **Rhizosphere**, v. 17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100274>.

ROSA, P. A. L.; MORTINHO, E. S.; JALAL, A.; GALINDO, F. S.; BUZETTI, S.; FERNANDES, G. C.; BARCO NETO, M.; PAVINATO, P. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Inoculation with growth-promoting bacteria associated with the reduction of phosphate fertilization in sugarcane. **Frontiers in Environmental Science**, v. 8, n. 32, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fenvs.2020.00032>

ROZIER, A.; MEDEIROS, F. H. V.; BAIS, H. P. Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions. **Plant Soil**, v. 428, p. 35–55, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3679-5>

RUTTENBERG, K. C.; SULAK, D. J. Sorption and desorption of dissolved organic phosphorus onto iron (oxyhydr)oxides in seawater. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 75, p. 4095-4112, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gca.2010.10.033>

SANTIAGO, W. R.; VASCONCELOS, S. S.; KATO, O. R.; BISPO, C. J. C.; RANGEL-VASCONCELOS, L. G. T.; CASTELLANI, D. C. Nitrogênio mineral e microbiano do solo em sistemas agroflorestais com palma de óleo na Amazônia oriental. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 43, n. 4, p. 395–406, 2013.

SANTOS, A. M. G. Atributos Agronômicos de Gramíneas Forrageiras Exóticas sob pastejo no Agreste Pernambucano. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 57p, 2012.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**. v. 9, p. 205, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, 2021. DOI: <https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20200128>

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>

SATURNO, D. F.; CERZINI, P.; MOREIRA, S.P.; OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, M. C. N.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. Mineral nitrogen impairs the biological nitrogen fixation in soybean of determinate and indeterminate growth types. **Journal of Plant Nutrition**, v. 40, p. 1690–1701, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904167.2017.1310890>.

SCHANK, S.C.; BOYD, F.F.; SMITH, L.; REX, L.; HODGES, E.M.; WEST, S.H.; KRETSCHMER, A.E.; BROLMANN Jr; J.B.; MOORE, J.E. Registration of "Transvala" digitgrass. **Crop Science**, Madison, v.30, p.1368-1369, 1990.

SCHILLACI, M.; GUPTA, S.; WALKER, R.; ROESSNER, U. The role of plant growth-promoting bacteria in the growth of cereals under abiotic stresses. **Root Biology-Growth, Physiology, and Functions**, p. 45-66, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.87083>

SILVA, A. B.; LIRA JUNIOR, M. A.; DUBEUX JUNIOR, J. C. B.; FIGUEIREDO, M. V. B.; VICENTIN, R. P. Estoque de serrapilheira e fertilidade do solo em pastagem degradada de *Brachiaria decumbens* após implantação de leguminosas arbustivas e arbóreas forrageiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 502-511, 2013.

SILVA, A. G.; DUARTE, A. P.; PIEDADE, R. D. C.; COSTA, H. P.; MEIRELES, K. G. C.; BORGES, L. P. Seed inoculation in off-season corn with *Azospirillum* and nitrogen topdressing application. **Revista Brasileira Militar de Ciências**, v. 14, n. 3, p. 358–370, 2015. DOI: <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v14n3p358-370>

SILVA, K.; PERIN, L.; GOMES, M. L.; BARAÚNA, A. C.; PEREIRA, G. M. D.; MOSQUEIRA, C. A.; DA COSTA, I. B.; O'HARA, G.; ZILLI, J. É. Diversidade e capacidade de promoção de crescimento de milho de bactérias isoladas da região Amazônica. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 46, n. 2, p. 111-118, 2016.

SILVEIRA, A. P. D. D.; 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, P.; KHAN, A.; KUMAR, R.; SINGH, V. K.; SRIVASTAVA, A. Recent developments in siderotyping: procedure and application. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 178, 2020. DOI: <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11274-020-02955-7>

SINGH, S.; KUMAR, V.; SIDHU, G. K.; DATTA, S.; DHANJAL, D. S.; KOUL, B.; JANEJA, H. S.; SINGH, J. Plant growth promoting rhizobacteria from heavy metal contaminated soil promote growth attributes of *Pisum sativum* L. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 665 – 671, 2019. ISSN 1878-8181, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.01.035>.

SINHA, A. K.; PARLI, B. V. Siderophore production by bacteria isolated from mangrove sediments: a microcosm study. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 524, p. 151290, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151290>

SOUMARE, A.; BOUBEKRI, K.; LYAMLOULI, K.; HAFIDI, M.; OUHDOUCH, Y.; KOUISNI, L. Efficacy of phosphate solubilizing Actinobacteria to improve rock phosphate agronomic effectiveness and plant growth promotion. **Rhizosphere**, v. 17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100284>.

SOUZA, L. J. N.; SANTOS, D. B. O.; FAGUNDES, J. L.; SOUZA, B. M. L.; BACKES, A. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, L. F. G.; SANTOS, A. D. F.; MOREIRA, A. L. Morfogênese do capim faixa-branca submetido à adubação nitrogenada. **Boletim de Indústria Animal**, v.73, p.281-289, 2016. DOI: <https://doi.org/10.17523/bia.v73n4p281>.

SOUZA, R. A; FONTES, J. G. G; LINO-MELO, Y. C; MOREIRA, J. A. S; GOMES DO SANTOS, I. O; SANZIO, E. C; BARBOSA, L. T.; FAGUNDES, J. L. Características Estruturais de Gramíneas Tropicais na Região dos Tabuleiros Costeiros. **Revista Científica de Produção Animal**, Teresina, v.14, n.1, p.17-20, 2012.

SOUZA, R.; 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.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harb. **Perspect Biology**, v. 3, n. 4, 2011.

SPRENT, J. L.; SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms: pure and Applied aspects. London: Chapman and Hall, 256 p. 1990.

SULOCHANA, M. B.; JAYACHANDRA, S. Y.; KUMAR, S. A. Siderophore as a potential plant growth-promoting agent produced by *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 174, p. 297-308, 2014.

SWARNALAKSHMI, K.; YADAV, V.; TYAGI, D.; DHAR, D. W.; KANNEPALLI, A.; KUMAR, S. Significance of plant growth promoting rhizobacteria in grain legumes: growth promotion and crop production. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1596, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9111596>

TABASSUM, B.; KHAN, A.; TARIQ, M.; RAMZAN, M.; KHAN, M. S. I.; SHAHID, N.; AALIYA, K. Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. **Applied Soil Ecology**, v. 121, p. 102-117, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030>

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

VALONES, M. A. A.; GUIMARÃES, R. L.; BRANDÃO, L. A. C.; SOUZA, P. B. E.; CARVALHO, A. A. T.; CROVELA, S. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 1–11, 2009.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, A. M.; VASSILEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: Potentials and future trends. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 71, p. 137-44, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0380-z>.

VIANA, T. F. C.; CAMPELO, A. P. S.; BALDANI, J. I.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; BALDANI, V. L. D.; SILVA, W. M.; PAGGI, G. M.; BRASIL, M. S. Cultivable bacterial diversity associated with bromeliad roots from ironstone outcrops in central Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 4, p. 872-880, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.224982>

VIDEIRA, S. S.; OLIVEIRA, D. M.; MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 356, p. 51-66, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-011-1082-6>.

VITOUSEK, P. M.; MENGE, D. N. L.; REED, S. C.; CLEVELAND, C. C. Biological nitrogen fixation: rates, patterns, and ecological controls in terrestrial ecosystems. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Archives of Biological sciences*, Belgrado, v. 368, p. 1-9, 2013.

VOLPIANO, C. G.; LISBOA, B. B.; SÃO JOSÉ, J. F. B.; DE OLIVEIRA, A. M. R.; BENEDUZI, A.; PASSAGLIA, L. M. P.; VARGAS, L. K. *Rhizobium* strains in the biological control of the phytopathogenic fungi *Sclerotium* (*Athelia*) *rolfsii* on the common bean. **Plant Soil**, v. 432, n. 1, p. 229-243, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-018-3799-y>

WEBB, J.; THORMAN, R. E.; FERNANDA-ALLER, M.; JACKSON, D. R. Emission factors for ammonia and nitrous oxide emissions following immediate manure incorporation on two contrasting soil types. **Atmospheric Environment**, Oxford, v. 82, p. 280-287, 2014.

WOŹNIAK, E.; SICIŃSKA, P.; MICHAŁOWICZ, J.; WOZNIAK, K.; RESZKA, E.; HURAS, B.; ZAKRZEWSKI, J.; BUKOWSKA, B. The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells-genotoxic risk assesment. **Food and Chemical Toxicology**, 2018. 120. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.035>.

WU, L.; WU, H. J.; QIAO, J.; GAO, X.; BORRIS, R. Novel routes for improving Biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. **Frontiers in Microbiology**, v. 10; n. 6, p. 1395, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01395>.

WU, T.; LI, X.; XU, J.; LIU, L.; REN, L.; DONG, B.; LI, W.; XIE, W.; YAO, Z.; CHEN, Q.; XIA, J. Diversity and functional characteristics of endophytic bacteria from two grass species growing on an oil-contaminated site in the Yellow River Delta, China. **Science of The Total Environment**, v. 767, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144340>.

XING, Y. X.; WEI, C. Y.; MO, Y.; YANG, L. T.; HUANG, S. L.; LI, Y. R. Nitrogen-Fixing and Plant Growth-Promoting Ability of Two Endophytic Bacterial Strains Isolated from Sugarcane Stalks. **Sugar Tech**, New Delhi, v. 18, n. 4, p. 373-379, 2016.

YI, Y.; HUANG, W.; GE, Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1059-1065, 2008.

ZAHEER, A.; MALIK, A.; SHER, A.; QAISRANI, M. M.; MEHMOOD, A.; KHAN, S. U.; RASOOL, M. Isolation, characterization, and effect of phosphate-zinc-solubilizing bacterial strains on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 5, p. 1061-1067, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.04.004>

3 DIVERSIDADE BACTERIANA ASSOCIATIVA EM CAPIM PANGOLÃO (*Digitaria eriantha* steud. CV. SURVENOLA)

Resumo

No Brasil, a pecuária é baseada em pastagens, naturais ou cultivadas. No entanto, algumas espécies forrageiras são pouco pesquisadas, como é o caso do capim pangolão (*Digitaria eriantha* Steud. cv. Survenola). Essa gramínea demonstra resiliência em áreas semiáridas sem fertilização e com baixa degradação. Um possível mecanismo para esta resiliência é a presença de micro-organismos endofíticos e rizosféricos, que ainda não foi avaliada. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade de bactérias associativas nessa gramínea. Foram isoladas e caracterizadas bactérias associadas a raiz, colmo, folhas e solo rizosférico do pangolão em três mesorregiões (Sertão, Agreste e Zona da Mata) de Pernambuco - Brasil. A avaliação inicial da diversidade foi feita fenotipicamente, seguida por avaliação genotípica por BOX-PCR e sequenciamento parcial do gene 16S rRNA. Foram obtidos 325 isolados fenotípicos que agruparam em 244 estirpes ao nível de 100% de similaridade pelo BOX-PCR, das quais 135 foram sequenciadas. A amplificação do gene 16S rRNA mostrou similaridade (de 96,84 a 99,9%) de 118 estirpes com alguma previamente descrita no BLAST, enquanto 17 não obtiveram similaridade suficiente para classificação taxonômica. Foram identificados 2 filos, 4 classes, 7 ordens, 13 famílias e 17 gêneros: *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Kosakonia*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Shinella*, *Stenotrophomonas* e *Variovarax*. A alta diversidade de bactérias endofíticas e rizosféricas geneticamente diferentes pode contribuir para a resiliência do pangolão, visto que muitas delas são descritas na literatura como possuindo algum mecanismo capaz de promover o crescimento de plantas.

Palavras-chave: Poaceae. Endofítico. Rizosfera.

ASSOCIATIVE BACTERIA DIVERSITY IN DIGIT GRASS (*Digitaria eriantha* steud. CV. SURVENOLA)

Abstract

Brazilian cattle raising is mostly based on pastures, natural or cultivated. Even so, some species are not well studied, such as pangolao grass (*Digitaria eriantha* Steud. cv. Survenola). This grass has shown resilience over more than 30 years in semiarid areas without fertilization and with little degradation. A possible mechanism for this resilience is the presence of endophytic and rhizospheric microorganisms, which have not been evaluated in this species. So, this work aimed to evaluate associative bacteria diversity in Pangolao grass in different environments of Pernambuco – Brasil. Bacteria associated to root, colm, leaves and rhizospheric soil of Pangolao grass from three mesoregions of Pernambuco-Brasil grass isolated and characterized. Initially phenotypical diversity was evaluated, followed by genotypical evaluation through BOX-PCR and partial sequencing of the 16S rRNA gene. Pangolao grass presented high associative bacteria diversity with 244 strains isolated, of which 135 were sequenced. The 16S rRNA gene amplification has shown similarities (96,84 to 99,9%) of 118 strains with a previously described on in BLAST, while 17 were not sufficiently similar for taxonomical classification. Bacteria were identified in 2 phyla, 4 classes, 7 orders, 13 families and 17 genera, with species of *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Kosakonia*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Shinella*, *Stenotrophomonas* e *Variovarax*. The great diversity of endophytic and rhizospheric bacteria genetically different might have promoted Pangolao grass resilience, since several of them are described in the literature as having some mechanism apt to promote plant growth.

Keywords: Poaceae. Endophytic. rhizosphere.

3.1 Introdução

A pecuária brasileira é principalmente baseada em pastagens, naturais ou cultivadas (DIAS-FILHO, 2014). No entanto, algumas espécies ainda são pouco pesquisadas, como é o caso de *Digitaria eriantha* Steud. cv. Survenola. Conhecida popularmente no Brasil como capim pangolão, pangola peluda ou capim faixa-branca, seu uso é mais restrito à região Nordeste, principalmente aos estados de Sergipe e Alagoas (SOUZA et al., 2016), apesar de apresentar qualidade e potencial produtivo para ser cultivada nas mais diversas regiões (ARONOVICH et al., 1996) por possuir teor de proteína bruta entre 10 e 15% (Gusmão Filho, 2018) e 59% de nutrientes digestíveis totais (Oliveira et al., 2015). É um híbrido resultante do cruzamento entre a *D. setivalva* Stent e *D. valida* Stent (COOK; SCHULTZE-KRAFT, 2015), com características adaptativas que proporcionam tolerância ao déficit hídrico e capacidade de crescimento em solos com baixa fertilidade (NAVARRO et al., 2005), mecanismos de extrema importância a sua resistência e sobrevivência a ambientes adversos.

Outro possível mecanismo de adaptação dessa cultura a esses ambientes é a presença de micro-organismos endofíticos, já que estes podem desenvolver associações com as plantas, auxiliando no crescimento, desenvolvimento e permitindo-lhes resistências contra estresses bióticos e abióticos, seja por fitoestimulação, biofertilização ou biocontrole (BODENHAUSEN et al., 2013; SANTOYO et al., 2016; LIU et al., 2017; AFZAL et al., 2019; RILLINGA et al., 2019).

Embora muitos endófitos tenham sido detectados em associação com as mais diversas gramíneas e alguns trabalhos demonstrem a importância da avaliação da diversidade das comunidades endofíticas, e a influência do ambiente e do tipo de tecido na diversidade de endófitos (GUO et al., 2020; MOHAMAD et al., 2020; VISHWAKARMA; DUBEY, 2020; LU et al., 2021; MEIKE et al., 2021;), a diversidade das bactérias associadas ao capim Pangolão ainda é desconhecida, como também a possibilidade dessas bactérias poderem beneficiar esta ou outras culturas.

Um exemplo de estirpe heteróloga utilizada na inoculação em diferentes culturas pode ser observado no Brasil. As linhagens Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* foram isoladas no milho e são utilizadas como inoculante para milho, trigo, arroz (FUKAMI et al., 2016; ANDRADE et al., 2019; GALINDO et al., 2020) e braquiária (HUNGRIA et al., 2016), como também coinoculação de leguminosas (PUENTE et al., 2019) como a soja, e junto com *Rhizobium* sp. na cultura do trigo (PERINI et al., 2021), obtendo resultados satisfatórios e se expandindo no Brasil e nos países vizinhos.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi isolar, caracterizar, selecionar e identificar bactérias endofíticas em diferentes partes do capim Pangolão e solo rizosférico, e estudar a diversidade de bactérias endofíticas nessa gramínea em diferentes mesorregiões de Pernambuco - Brasil.

3.2 Material e Métodos

O estudo foi realizado em três mesorregiões do estado de Pernambuco (Figura 2): Sertão (clima semiárido quente e seco); Agreste (zona de transição entre Zona da Mata e Sertão, clima quente sub-úmido seco) e Zona da Mata (clima tropical quente e úmido) (IBGE, 2010; DUBREUIL et al., 2018; MILET-PINHEIRO; SCHLINDWEIN, 2008); respectivamente, nos municípios de Araripina, Gravatá e Nazaré da Mata, em áreas de cultivo do capim Pangolão (Tabela 1).



Figura 2. Localização da região Nordeste com ênfase no estado de Pernambuco, suas respectivas mesorregiões e recorte dos municípios Araripina, Gravatá e Nazaré da Mata, Brasil, 2020

Foram coletadas 20 plantas da gramínea em Araripina, Gravatá e Nazaré da Mata na estação chuvosa, e em Araripina foram realizadas amostragens adicionais na mesma área inicial com e sem a realização de calagem, e também no período seco (Tabela 1). As plantas formaram amostra composta e foram fracionadas em folhas, colmo, raiz e solo rizosférico. Também foi realizado a caracterização química e física do solo das áreas de coleta (Tabela 2).

Tabela 1. Amostragens em pastagens de Pangolão (*Digitaria eriantha* cv. Suvernola) em três mesorregiões de Pernambuco, Sertão, Agreste e Zona da Mata

Local de amostragem	Clima (Köppen-Geiger)	Data da coleta	Estação	Calagem	Coordenadas Geográficas	Tempo de cultivo do Pangolão	pH Água	P mg dm ⁻³	K	Ca	Mg	Na	Al	H+Al	Classificação Textural
									-----cmo _c dm ⁻³ -----						

Araripina	BSh	Dezembro 2016	Seca	Sem	7°27'42" S 40° 25'12" O	> 30 anos	5,3	2	0,18	1,6	0,50	0,05	0,15	3,23	Franco arenoso
		Março 2017	Chuvosa	Com Sem	7° 27'48" S 40° 25'16" O		6,1 5,3	3 2	0,13 0,08	2,20 1,6	0,9 0,50	0,05 0,05	0,00 0,15	2,47 3,23	Franco arenoso
Gravatá	As	Outubro 2017	Chuvosa	Sem	8° 8'6" S 35°22'51"O	~2 anos	5,7	3,5	0,22	0,85	0,8	0,06	0,12	3,42	Franco arenoso
Nazaré da Mata	As	Novembro 2017	Chuvosa	Sem	7°47'7"S 35°14'37"O	>11 anos	5,6	10	0,22	1,50	0,9	0,07	0,10	4,10	Franco arenoso

3.2.1 Isolamento e caracterização fenotípica das bactérias endofíticas

Todas as amostras foram desinfestadas através de uma lavagem inicial em água corrente, seguida de imersão em etanol 70 % por um minuto e hipoclorito de sódio (2,5%) por cinco minutos e quatro lavagens em água autoclavada. Posteriormente triturou-se o material fresco em solução salina autoclavada (DOBEREINER et al., 1995) formando a diluição 10^{-1} , e em seguida foram feitas diluições de 10^{-3} até 10^{-7} também em solução salina autoclavada. Os extratos diluídos foram inoculados em triplicata em frascos tipo penicilina contendo 5 mL dos meios semissólidos livres de N, NFB (DOBEREINER et al., 1995), JNFB (BALDANI et al., 1986) e JMV (BALDANI et al., 1996) e incubados a 28 °C.

Os isolados foram purificados em meio de cultivo YMA (VINCENT, 1970) e caracterizados com base na alteração do pH (ácido, neutro e alcalino), presença de muco (presente ou ausente) e cor (rosa, amarela, branca e creme) das colônias (SILVA et al., 2012).

3.2.2 Estudo do perfil fenotípico da comunidade bacteriana endofítica

Uma matriz binária foi construída a partir das características morfológicas e os isolados agrupados pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group Analysis*), com base no Índice de Jaccard, formando grupos com 100% de similaridade. Dendrogramas foram construídos para cada parte da planta e cada área amostral (separadamente e em conjunto), permitindo a avaliação da diversidade utilizando os índices de diversidade de Shannon-Weaver (SHANNON; WEAVER, 1949), de uniformidade de Pielou (PIELOU, 1959) e de dominância de Simpson (SIMPSON, 1949), riqueza de Margalef, riqueza total de espécies de Chao1, considerando o grupo fenotípico como a espécie e o isolado como o indivíduo, todos utilizando o PAST (HAMMER et al., 2001).

3.2.3 Estudo do perfil genotípico da comunidade bacteriana endofítica

Os isolados foram inoculados em 5,0 mL do meio de cultura Tryptic Soy Broth (TSB) e agitados a 180 rpm por 72 h em 28°C. Em seguida, 2mL de suspensão bacteriana foram centrifugados a 7.500 rpm por 3 min, descartou-se o sobrenadante e o pellet formado foi utilizado para extração do DNA através do kit Kit MiniPrep (Axygen) de acordo com as recomendações do fabricante. A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de

agarose 0,8% por 30 min em tampão TBE 0,5X (Tris Base, Ácido bórico, EDTA) a 100 v, depois de corado com SybrGold. Utilizou-se o 100 pb Plus DNA Ladder (Invitrogen), como padrão molecular. O DNA extraído de cada isolado foi quantificado em NanoDrop 2000c da Thermo científica e sua concentração padronizada em 20-30 ng μL^{-1} . O armazenamento das amostras de DNA genômico foram realizadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os isolados foram caracterizados genotipicamente por BOX-PCR, utilizando-se o iniciador BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (VERSALOVIC et al., 1994). A reação de amplificação foi feita em um volume final de 10 μL contendo: 1 μL de DNA molde (20-30 ng μL^{-1}), 2 pmol do iniciador (BOX A1R), 0,3 mM de dNTP's, 1 μL de tampão 10X, 5mM de MgCl_2 e 1,5 U de Taq polimerase platinum e água Mili-Q para completar a reação. As condições de amplificação foram ajustadas de Freitas et al. (2007): desnaturação inicial a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 9 min, 30 ciclos de desnaturação (1 min, a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$), anelamento (1 min, a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$) e extensão (5 min, a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$), um ciclo de extensão final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Todas as reações foram realizadas em termociclador 2720 da Applied Biosystems. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese, contendo tampão TBE 0,5X a 100 V, durante 180 min em géis de agarose a 1,2 %, corados com SybrGold.

Dendrogramas foram construídos usando o programa Geljv2 empregando o coeficiente de Jaccard e algoritmo UPGMA (HERAS et al., 2015; DELAMUTA et al., 2017) a 100% de similaridade, com os grupos a 100% de similaridade sendo considerados como estirpes distintas.

3.2.4 Sequenciamento dos fragmentos dos 16S rRNA re-amplificados e purificados

O DNA de representantes de cada grupo formado pelo agrupamento do Box-PCR a 90% de similaridade foi amplificado com os iniciadores para os genes rRNA 16S usando os primers universal 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'TACGGTTAACCTTGTTACGACTT-3') (WEISBURG et al., 1991).

A reação de amplificação com um volume final de 50 μL foi: 2 μL de DNA (20-30 ng μL^{-1}), 1,5 μL de MgCl_2 , 5,0 μL tampão 10X para PCR, 1,0 μL 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 ($94\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 45 segundos), anelamento (56°C , por 30 segundos), extensão ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 2 min) e uma extensão final de 72°C , por 7 min. Os produtos amplificados foram avaliados em tampão TBE 0,5X a 100 V durante 90 min em gel de agarose

1% corados com SybrGold e visualizados sob luz UV em fotodocumentador LPIX-HE da Locus do Brasil. As reações foram realizadas no termociclador 2720 da Applied Biosystems. Os produtos da PCR foram enviados para Macrogen, Coréia do Sul, para purificação e sequenciamento.

3.2.5 Análise comparativa das sequências dos 16S rRNA

As sequências obtidas foram comparadas ao banco de dados do NCBI com “type strains”. 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., 1994) pelo programa MEGA7.1. O método de junção de vizinhos Juke-Cantor foi utilizado para determinar o valor de similaridade e a matriz de distância e 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

3.3.1 Avaliação da diversidade fenotípica das bactérias endofíticas e rizosféricas

Foram obtidos 325 isolados dos quais 80,3 % dos isolados acidificaram o meio, 3,7% alcalinizaram e 16% mantiveram-se neutro. Predominaram as cores de colônia creme com amarelo e creme, 45,5% e 32 %, respectivamente, seguido de amarelo (21,2%) e rosa (1,3%). Quanto à borda, forma, opacidade e superfície, 88,9% são inteiras, 92,9% circular, 75,4% opaca, 98,5% lisa. 72,6 % dos isolados produziram muco (Figura 3 e Tabela Suplementar 1).

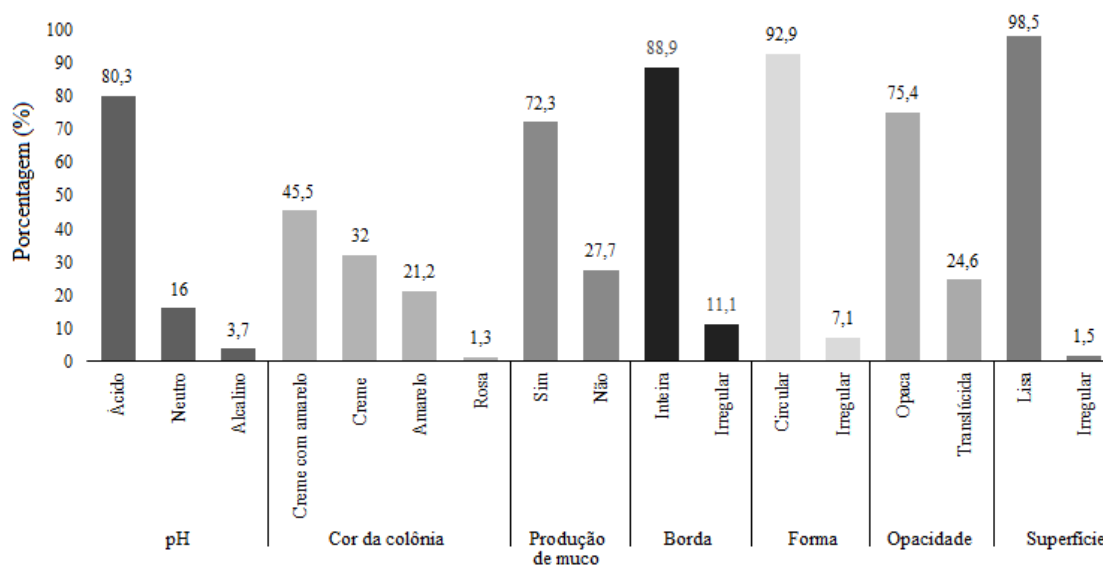


Figura 3. Porcentagem de isolados bacterianos por características fenotípicas oriundos de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola.

O agrupamento a partir das características fenotípicas revelou 63 grupos a 100% de similaridade com isolados de diferentes regiões unidos no mesmo grupo (Figura 4). Obteve-se índice de diversidade de Shannon 5,57, Simpson 0,99, Margaref 10,49, equitabilidade 0,96 e de dominância 0,003 (Tabela 3).

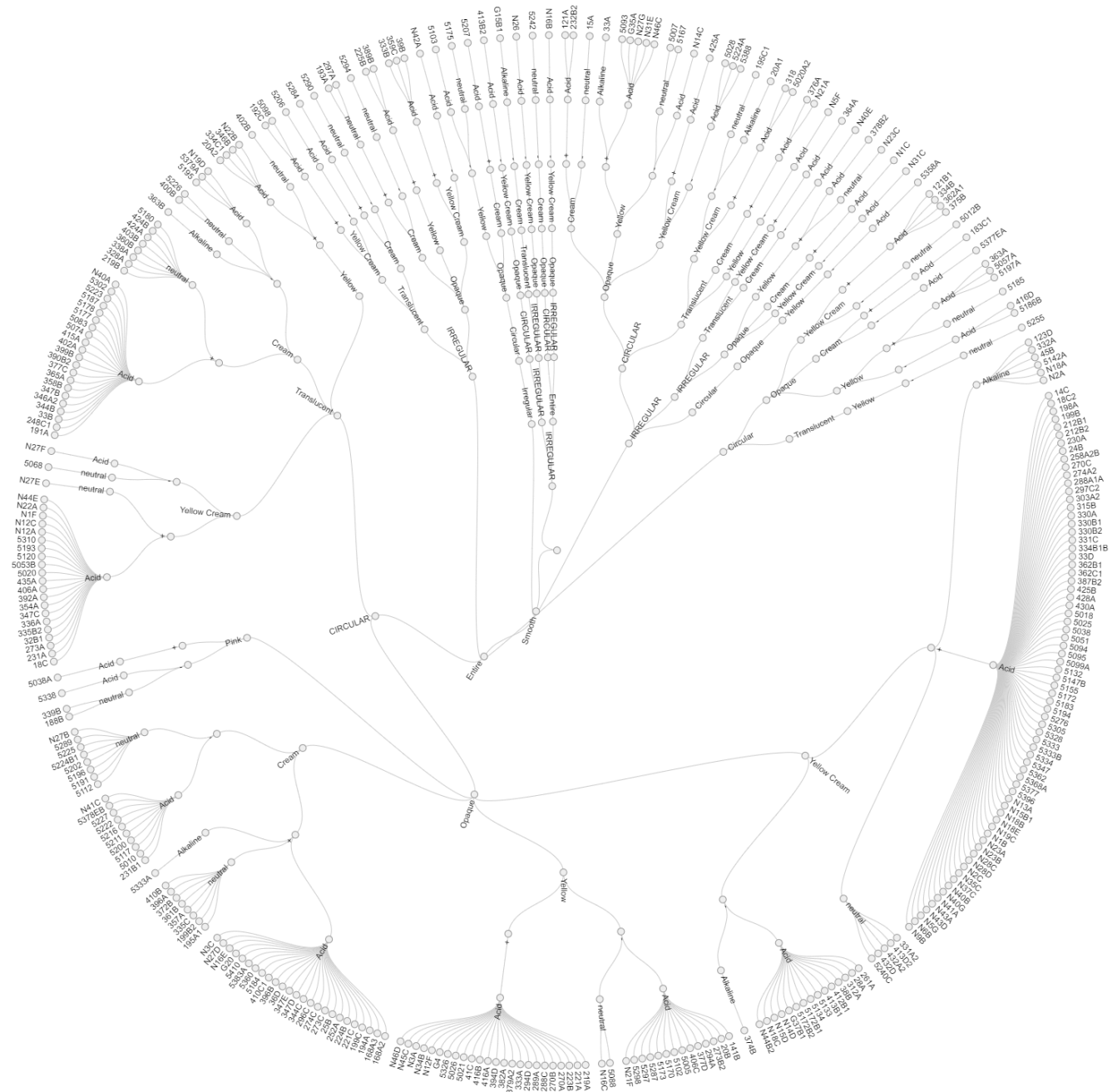


Figura 4. Agrupamento hierárquico pelo coeficiente de Jaccard em forma de dendrograma circular de acordo com a similaridade de ocorrência das características fenotípicas de isolados bacterianos oriundos de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola coletadas em diferentes mesorregiões (Sertão, Agreste e Zona da Mata) em Pernambuco

Avaliando as áreas sem calagem e chuvosa, Zona da mata apresentou 62 isolados distribuídos em 26 grupos (Tabela 2). Também exibiu os maiores índices de diversidade de Shannon (4,03) e Simpson (0,9822). O índice de dominância apresentou valores próximos a

zero (0,01783). Para as Mesorregiões Sertão e Agreste, foram isoladas 63 bactérias com formação de 22 grupos e 24 bactérias em 15 grupos, respectivamente.

Tabela 2. Número de bactérias isoladas de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola com os índices de diversidade calculados por área de estudo e condição de isolamento em Pernambuco

Ambiente de isolamento	Total de Isolados	Dominance D	Simpson 1-D	Shannon H	Margaref	Equitability J	Grupos
Total	325	0,003815	0,9962	5,576	10,49	0,9641	63
Sertão	63	0,02158	0,9784	3,849	2,126	0,9291	22
Agreste	24	0,05256	0,9474	2,948	0,8135	0,9277	15
Zona da Mata	62	0,01783	0,9822	4,03	2,078	0,9764	26
Colmo	104	0,01171	0,9883	4,455	3,459	0,9593	26
Folha	83	0,01465	0,9853	4,23	2,775	0,9573	37
Raiz	66	0,0207	0,9793	3,89	2,226	0,9284	27
Solo rizosférico	72	0,01663	0,9834	4,101	2,413	0,959	19

O isolamento em diferentes tecidos vegetais e solo rizosférico de Pangolão proveniente das áreas sem calagem e chuvosa mostram maior número de isolados originários do colmo, seguido das folhas, do solo e raiz, 104, 83, 72 e 66, respectivamente, a mesma ordem ocorrendo para os índices de diversidade, uniformidade e riqueza de estirpes.

3.3.2 Diversidade genotípica pela amplificação dos elementos BOX

Dentre 316 isolados, 311 amplificaram os elementos BOX, apresentando eficiência na produção de bandas (228 a 1736 pb). O resultado da análise de agrupamento para os três locais, formado pelo dendrograma a 100% de similaridade, demonstrou a formação de 244 estirpes (Tabela 3) dos quais 191 são formados por apenas um isolado.

Tabela 3. Número de bactérias e grupos formados no dendrograma de similaridade com base em características genótípicas dos isolados bacterianos associados a *Digitaria eriantha* cv. Suvernola coletadas em diferentes mesorregiões (Sertão, Agreste e Zona da Mata) em Pernambuco.

Ambiente de isolamento	Total de isolados	Total de grupos	Grupos formados por 1 isolado
Diversidade genética geral			
Total	316	244	191
Mesorregiões			
Sertão	59	52	46
Agreste	24	22	20
Zona da Mata	62	61	60
Partes da planta			
Colmo	99	83	71
Folha	82	66	53
Raiz	63	61	59
Solo rizosférico	72	68	64

Avaliando as mesorregiões separadamente, os dendrogramas exibiram a formação de 52 grupos totais para o Sertão, seguido de Zona da Mata (61 grupos) e Agreste (22 grupos). Sertão, Zona da Mata e Agreste, também formaram 46, 60 e 20 grupos, respectivamente, contendo apenas um isolado.

Para os tecidos vegetais e solo rizosférico, colmo e solo rizosférico apresentaram uma maior diversidade bacteriana, com 83 e 68 grupos genéticos, seguido de folha (66) e raiz (61).

3.3.3 Amplificação e Sequenciamento do gene 16S rRNA

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA mostrou que as estirpes representantes dos 135 grupos formados a 90% de similaridade pelo BOX PCR exibiram similaridade com alguma estirpe previamente descrita no BLAST, levando à classificação de 118 estirpes ao nível de gênero (96,84 – 99,9% de similaridade), enquanto 17 bactérias não obtiveram semelhança suficiente para classificação taxonômica, variando entre 68 e 92,4% de similaridade. Quatro estirpes (5294, N18E, N37C e N40E) não obteve similaridade com nenhuma sequência genética disponível no banco de dados do GenBank.

Os gêneros mais abundantes foram *Rhizobium* (22,03%), *Stenotrophomonas* (19,49%), *Pantoea* (16,1%), *Pseudomonas* (12,71%) e *Enterobacter* (8,47%). Outros gêneros também foram associados com as bactérias desse estudo: *Achromobacter* (3,39%), *Bacillus* (1,69%),

Bulkholderia (2,54%), *Curtobacterium* (0,85%), *Herbaspirillum* (0,85%), *Kosakonia* (0,85%), *Ochrobacterium* (2,54%), *Paenibacillus* (1,69%), *Serratia* (0,85%), *Shinella* (0,85%) e *Variovarax* (3,39%).

Foram identificados 2 filos, 4 classes, 7 ordens, 13 famílias e 17 gêneros diferentes (Tabela 4), de acordo com LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature) (ADNAN et al., 2016; PARTE, 2018). As classes γ -proteobacteria (58,47%) (*Enterobacter*, *Kosakonia*, *Pantoea*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*) e α -proteobacteria (27,97%), (*Shinella*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* e *Ochrobactrum*) apresentaram o maior número de isolados, respectivamente, sendo encontradas nos três locais de coleta e em todas as partes da planta.

Tabela 4. Classificação taxonômica das bactérias isoladas de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola no Nordeste brasileiro

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Total de isolados
Proteobacteria	α - proteobacteria	Rhizobiales		<i>Shinella</i>	1
			Rhizobiaceae	<i>Agrobacterium</i>	3
				<i>Rhizobium</i>	26
			Brucellaceae	<i>Ochroactrum</i>	3
	β - proteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteriaceae	<i>Herbaspirillum</i>	1
			Comamonadaceae	<i>Variovarax</i>	4
			Alcaligenaceae	<i>Achomobacter</i>	3
			Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>	3
	γ - proteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter</i>	10
				<i>Kosakonia</i>	1
				<i>Pantoea</i>	19
			Yersiniaceae	<i>Serratia</i>	1
			Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>
Firmicutes	Bacilli	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	23
		Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	2
			Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i>	2
	Actinomycetales	Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium</i>	1	
Não houve classificação taxonômica				Bactérias	17

Pseudomonas, *Rhizobium* e *Stenotrophomonas* foram isolados em todos os locais e condições de isolamento (Figura 5). *Agrobacterium*, *Pantoea* e *Rhizobium* foram encontrados em todas as partes da planta, porém, só nas áreas de Sertão e Zona da Mata, enquanto que *Enterobacter* surgiu em todas as condições, mas em Sertão e Agreste.

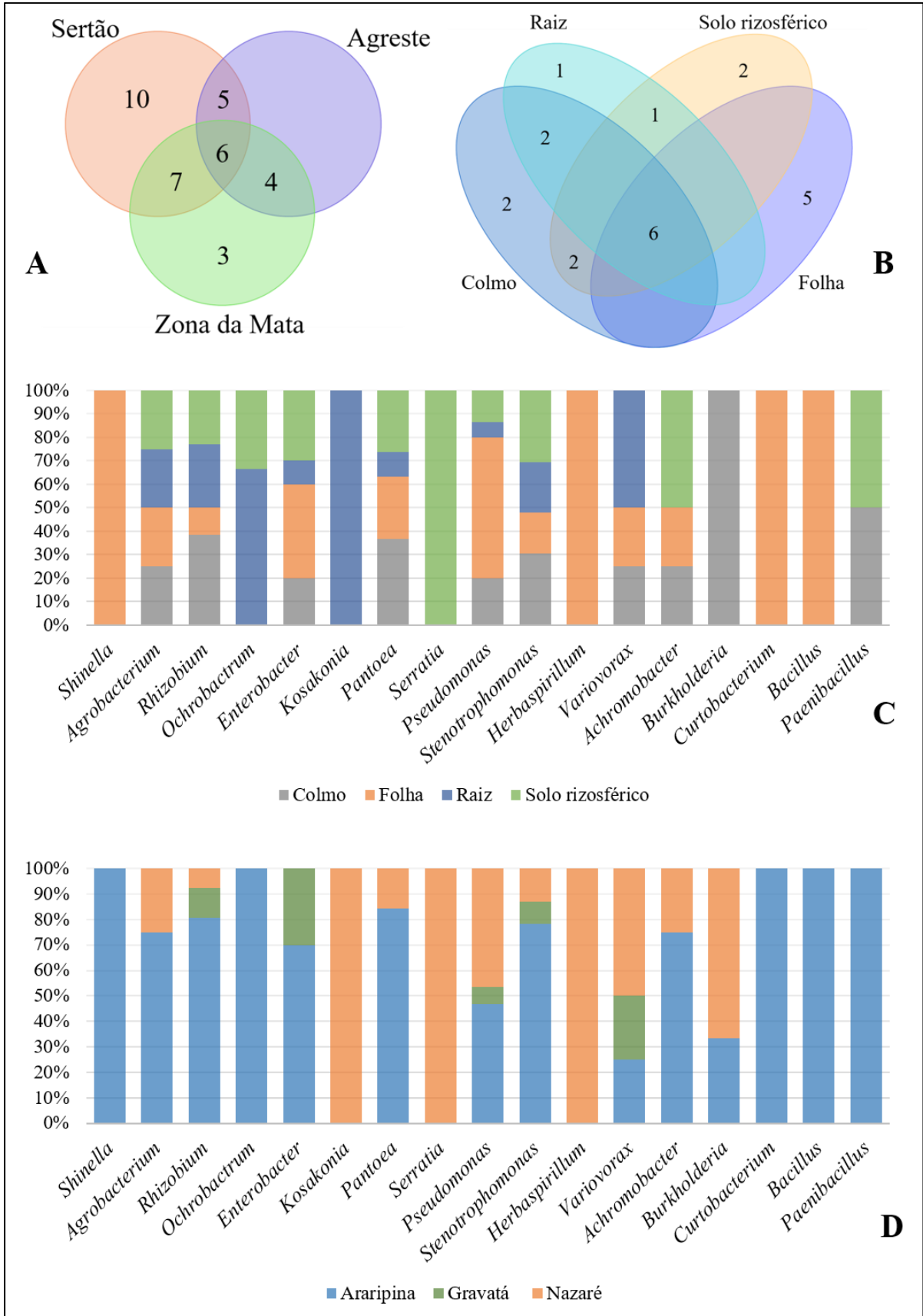


Figura 5. Diagrama de Venn representando o número total e o compartilhamento de gêneros nos diferentes locais (A) e parte da planta (B). Origem de gêneros bacterianos para cada condição de isolamento (C e D)

Tratando-se das diferentes partes da planta, folha (13), colmo (12) e solo rizosférico (12) apresentaram maior número de gêneros que a raiz (8), compartilhando 7 gêneros entre eles (*Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Stenotrophomonas*).

3.3.4 Relações filogenéticas entre isolados bacterianos

A árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA agrupou os 17 gêneros em seis grandes grupos polifiléticos (Figura 6), que apresentaram isolados de Sertão, Agreste e Zona da Mata e todas condições de isolamento, com a maioria das estirpes (68,94%) nos GI, GIII e GVI.

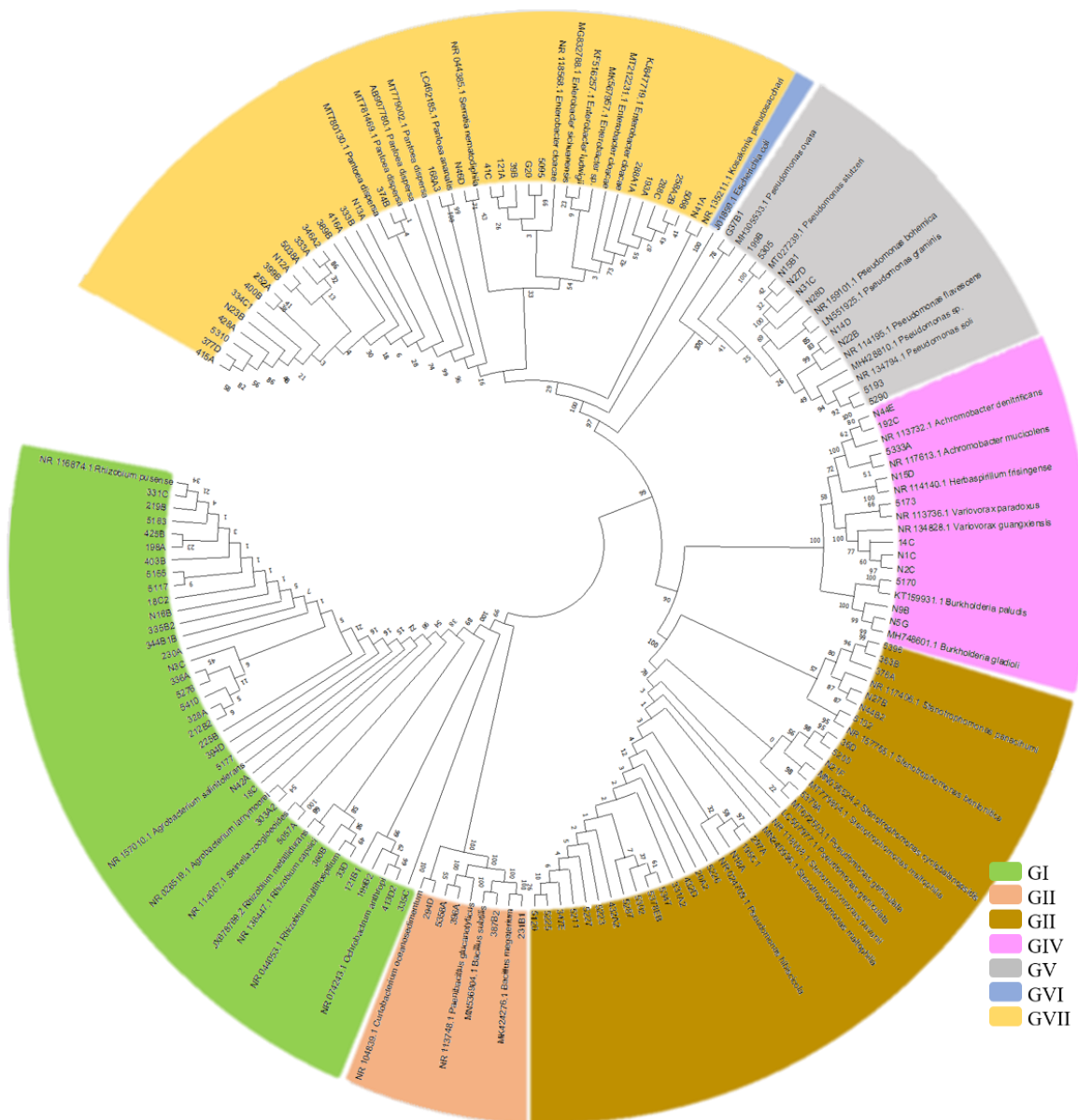


Figura 6. Árvore filogenética determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro Jukes Cantor e teste de bootstrap com 1000 repetições das sequências do gene 16S rRNA dos isolados do capim pangolão

Agrobacterium, 5057A a 100% com *Shinella*, 360B e 33B a *Rhizobium* com 58% de compartilhamento, e 3 estirpes a 99 % com *Ochrobactrum*. O segundo subgrupo formado pela estirpe 335C não se agrupou a nenhum gênero.

No GII a estirpe 294D foi agrupada a *Curtobacterium*, 5358A e 396A a *Paenibacillus*, enquanto que 387B2 e 231B1 foram agrupadas a *Bacillus* (100% de associação pelo teste de bootstrap).

O GIII compreende a organização de 28 estirpes aos gêneros *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas*. O primeiro subgrupo relacionou 22 estirpes a *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas*, porém com compartilhamento de até 70% de nucleotídeos de acordo com o teste de bootstrap. O segundo subgrupo agrupou 6 estirpes com *Stenotrophomonas*, porém, com compartilhamento de até 57% de nucleotídeos.

O GIV agrupou 11 estirpes aos gêneros *Burkholderia*, *Variovorax*, *Herbaspirillum* e *Achromobacter*. O subgrupo I uniu 3 estirpes a *Burkholderia* a 100% de bootstrap. Enquanto que o subgrupo II juntou 4 estirpes a *Variovorax* com 100% de compartilhamento de bases e 4 estirpes a *Achromobacter* e *Herbaspirillum* a 72%.

O GV relacionou 11 estirpes a *Pseudomonas* (100% de associação pelo teste de bootstrap). No entanto, o GVI, conectou 31 estirpes a *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Serratia* e *Pantoea*. O subgrupo I associou a 100% a estirpe N41A ao acesso 135211.1 *Kosakonia*. No subgrupo II, 10 estirpes compartilharam 54% de nucleotídeos com *Enterobacter*, N46D 71% com *Serratia*, enquanto 19 estirpes relacionaram a *Pantoea*.

A análise do teste de bootstrap não revelou compartilhamento entre as estirpes e a espécie *Escherichia coli* constituinte do *outgroup*. Porém, o GIV ficou mais próximo filogeneticamente.

3.4 Discussão

3.4.1 Avaliação da diversidade fenotípica das bactérias endofíticas

A bioprospecção por bactérias associadas ao capim pangolão tem grande importância e potencial tanto para essa cultura como para outras, envolvendo futuros estudos biotecnológicos. Bactérias endofíticas e rizosféricas nesse capim podem ser capazes de promover sua resiliência em semiárido sem manejo de fertilidade, visto que podem possuir algum mecanismo capaz de promover o crescimento de plantas. Bactérias endofíticas podem ser encontradas em praticamente todas as espécies de plantas, onde cada uma pode ser hospedeira de pelo menos

uma espécie de micro-organismo endofítico (KULKARNI; DALAL; BODHANKAR, 2014; CHEBOTAR et al., 2015; RYAN et al., 2008). O presente trabalho obteve 325 isolados, número que poderia ser maior, uma vez que a seleção ocorreu por meio de bactérias capazes em se desenvolver apenas no meio de cultura utilizado. Segundo Cerigioli (2005) tais limitações aplicam-se à maioria dos estudos baseados em métodos de cultivo, porém, esse método fornece indicações da estrutura da população bacteriana. Mesmo assim, a quantidade de isolados foi superior as 84 bactérias cultiváveis encontrados em folha, raiz e solo rizosférico em capim braquiária no Instituto Internacional de Pesquisa Pecuária em Nairóbi, Quênia (MUTAI; NJUGUNA; GHIMIRE, 2017) e aos 117 isolados bacterianos endofíticos e rizosféricos obtidos em abacaxi de regiões semiáridas no leste de Nusa Tenggara, Indonésia Oriental (FITRIANI et al., 2020).

A identificação inicial dos isolados foi feita com base em características morfológicas. As colônias bacterianas endofíticas do estudo apresentam diversificação quanto a morfologia, com cores de colônia creme com amarelo, creme, amarelo e rosa, bordas, forma, opacidade e superfície predominando as inteiras, circulares, opacas e lisas. Características fenotípicas semelhante foram encontradas na planta medicinal *Tinospora cordifolia*, com isolados no formato circular e irregular, cores esbranquiçadas e amareladas e bordas regulares e onduladas (DUHAN; BANSAL; RANI, 2020). Bactérias com colônias circulares, inteiras, creme, rosa e amareladas, opaca e translúcidas, também foram obtidas em rizobactérias halotolerantes em *Triticum turgidum* subsp. *durum* em áreas da região do Mar Morto (ALBDAIWI et al., 2019).

A caracterização fenotípica revelou que 80,3 % dos isolados obtidos acidificou o meio. Essa modificação do pH do meio para ácido pode estar associada com a assimilação ou produção de ácidos orgânicos (SÁNCHEZ LÓPEZ et al., 2012), indicando que os isolados podem usar como um mecanismo de promoção de crescimento como por exemplo para realizar a solubilização de fosfatos (WANG et al., 2020).

Neste estudo, 72,3% dos isolados apresentam produção de muco. O extrato de levedura presente no meio de cultura utilizado para caracterização morfológica é considerada como a fonte de nitrogênio mais adequada para a produção de muco devido ao seu efeito estimulador, rico em proteínas, aminoácidos e vitaminas (POKHREL; OHGA, 2007). Também tem sido verificado que o acúmulo ou formação desta substância tende a aumentar à medida que algum tipo de estresse aumenta no ambiente (CERQUEIRA et al., 2015).

O agrupamento a partir das características fenotípicas revelou que havia isolados de diferentes regiões unidos no mesmo grupo, indicando a possibilidade de serem a mesma estirpe e uma relação entre diversidade de endofíticos e o ambiente.

As plantas coletadas no Sertão e Zona da Mata, apresentaram o maior número de isolados e índices de diversidade em virtude do maior tempo de cultivo dessa pastagem, levando a maior comunidade endofítica. Observações semelhantes foram feitas por Tannenbaum et al. (2020) ao estudarem o perfil bacteriano de brotos (folha e caule) e raiz de *Lolium perene* (Azevém perene), que constataram que plantas maduras eram muito mais diversas quando comparado aos de mudas, sugerindo que as bactérias foram recrutadas do ambiente e incorporadas.

Os resultados de dominância e equabilidade nas três mesorregiões convergem com Uramoto, Walder e Zucchi (2005), que relata que quanto menor a dominância, maior a equabilidade de espécies de uma comunidade, indicando mais estabilidade e maior resistência dessas bactérias em sofrerem impactos ambientais. Ou seja, a maioria das espécies bacterianas são igualmente abundantes (BROWER; ZAR, 1984).

Quando avaliado o isolamento em diferentes tecidos vegetais e solo rizosférico, o ambiente endofítico apresentou a maior diversidade de micro-organismos em comparação ao ambiente rizosférico. Os resultados mostram maior número de isolados, índices de diversidade, uniformidade e riqueza de estirpes originários do colmo, seguido das folhas, do solo e raiz. Um padrão semelhante com menor número de isolados das raízes também foi observado por Pirhadi et al. (2018) na cana de açúcar no Irã. Resultados contraditórios foram encontrados por Mutai, Njuguna e Ghimire (2017) em braquiária, com isolados distribuídos de folhas, raízes e solo rizosférico, respectivamente. Isso mostra a importância da avaliação da população endofítica em diferentes tecidos vegetais, uma vez que apesar da maior quantidade de isolados ter sido encontrada neste trabalho no colmo, existe uma diferença na distribuição de endófitos entre partes da planta.

3.4.2 Diversidade genotípica e sequenciamento do gene 16S rRNA ribossomal

A caracterização fenotípica de micro-organismos em meios de cultura é necessária para uma análise detalhada de seus aspectos fisiológicos, servindo como primeiro passo para o estudo da diversidade microbiana, bem como para garantir a pureza das colônias e seu armazenamento (VIANA et al., 2020). No entanto, os dados de BOX-PCR e do sequenciamento

do 16S rRNA mostraram que a diversidade genotípica das bactérias endofíticas e rizosféricas foi maior do que a diversidade fenotípica, mostrando efeito dos diferentes locais e tecidos.

O resultado da análise de BOX – PCR pelo uso do coeficiente de similaridade de Jaccard evidenciou alta variabilidade genética entre os isolados no pangolão. Rodrigues et al. (2006) afirmaram que o genótipo de planta pode influenciar a diversidade de bactérias. Os três ambientes apresentaram diversidade genética ainda maior do que a apontada no agrupamento morfofisiológico. Para os tecidos vegetais e solo rizosférico, houve uma inversão as respostas fenotípicas, sendo colmo e solo rizosférico mais diversos geneticamente do que folha e raiz. Colmo representa um ambiente menos competitivo para as bactérias, podendo se beneficiar primeiramente dos fotossintatos em comparação com micro-organismos da raiz (KOOMNOK et al., 2007). Segundo Freitas et al. (2007) ainda há a necessidade de se obter mais marcadores genotípicos e que, a união com a caracterização morfofisiológica, produzam dados mais completos.

O sequenciamento genético do gene 16S rRNA mostrou 2 filos, 4 classes, 7 ordens, 13 famílias e 17 gêneros diferentes, revelando uma alta diversidade genética. Teve como gêneros mais abundantes *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Pantoea*, *Pseudomonas* e *Enterobacter*. Outros gêneros encontrados foram: *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Bulkholderia*, *Achromobacter*, *Herbaspirillum*, *Kosakonia*, *Ochrobacterium*, *Paenibacillus*, *Serratia*, *Shinella* e *Variovarax*. Esses gêneros também foram encontrados em estudos avaliando a comunidade endofítica de outras gramíneas, como braquiária, arroz, setaria, milho, cana de açúcar, (MUTAI, NJUGUNA e GHIMIRE, 2017; ESCOBAR RODRÍGUEZ et al., 2018; MASHIANE et al., 2018; LIU et al., 2019; LIMA et al., 2020).

Proteobacteria foi o filo dominante, como também encontrado em sementes de milho (LIU et al, 2020), no trigo (ROBINSON et al., 2016) e bambu (SINGH et al., 2020). As proteobactérias são consideradas como um dos maiores Filos e apresentam características morfológicas, fisiológicas e ecológicas altamente diversificadas, respondendo por mais de 45% de todas as bactérias cultivadas (KERSTERS et al., 2006). Dessa forma, pode-se sugerir que as Proteobactérias são um grupo de endófitos regularmente encontrado nas plantas.

A classe γ -proteobacteria apresentou o maior número de estirpes e gêneros (*Enterobacter*, *Kosakonia*, *Pantoea*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas*) nos três locais de coleta. Conforme García-Salamanca et al. (2013) as γ -proteobacterias respondem a exsudatos liberados pelas plantas e são eficientes na utilização destes produtos, ocorrendo um benefício comum, uma vez que essas bactérias possuem mecanismos capazes de disponibilizar

nutrientes inorgânicos favorecendo o crescimento das plantas. Enquanto os gêneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium* e *Stenotrophomonas* aparecem em Araripina, Gravatá e Nazaré, os gêneros *Pantoea* e *Rhizobium* só em Araripina e Nazaré e *Enterobacter* somente em Araripina e Gravatá, o que pode sugerir a presença de endofíticos sistêmicos e transitórios de acordo com WANI et al. (2015).

As proteobactérias (*Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Rhizobium*, *Stenotrophomonas*) surgiram em todos os tecidos e solo, enquanto que Firmicutes só surgiram em folhas, colmo e solo. Muitas espécies de Firmicutes formam endósporos, assim, folhas e colmos podem ser colonizados a partir da deposição desses endósporos presentes no solo em aberturas naturais como estômatos, hidatódios e ferimentos, por meio de respingos de chuva ou dispersão no ar (ROBINSON et al., 2016). Isso pode indicar uma especificidade de colonização entre a estirpe e o tecido no pangolão, uma vez que também só foi observada a presença de *Variovorax* nas raízes, colmo e folhas.

Além disso, Elmagzob, Ibrahim e Zhang (2019) sugerem que espécies de Proteobacteria e Firmicutes (filos dominantes nesse estudo) são bem expressivos como promotores de crescimento vegetal, por se adaptarem às mais diversas condições ambientais. Também foi possível observar que bactérias promotoras de crescimento estudadas e utilizadas com mais frequência como *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia* e *Bacillus*, não foram encontrados ou apresentaram pouca abundância nesse estudo, sugerindo que as bactérias encontradas em associação ao pangolão podem ser mais eficientes nas condições estudadas e mais eficientes do que os inoculantes comerciais.

Outros trabalhos realizados em regiões semiáridas do Brasil, Índia, Namíbia e China, em plantas como sorgo, algodão, milheto, capim buffel e capim tifton 85, também apresentaram ausência desses gêneros (SILVA et al., 2018; ANTUNES et al., 2019; GROVER et al., 2014; KUMAR et al., 2014; HAIYAMBO et al., 2015; NIU et al., 2018).

A análise filogenética mostrou que o primeiro grupo associou estirpes a *Rhizobium* e *Agrobacterium*. Isso pode ser explicado por esses dois gêneros apresentarem sinonímia entre eles (YOUNG et al., 2008).

O segundo grupo apresentou a maior similaridade genética entre a estirpe 294D e *Curtobacterium*. Algumas espécies de *Curtobacterium* tem sido identificada como endófito, associada ao a indução de resistência sistêmica e interagindo com outras bactérias promotoras de crescimento (XU et al., 2019). Da mesma forma, outras estirpes se aproximaram de *Paenibacillus* e *Bacillus*. Esses dois gêneros são vistos como promotores de crescimento de plantas, por sintetizarem hormônios vegetais, aumentar a absorção de micronutrientes, fixando

nitrogênio atmosférico, solubilização do fósforo do solo, supressão de patógenos e formação de biofilme (GOVINDASAMY et al., 2010; PIETERSE et al., 2014), atraindo atenção considerável para produção de inoculantes.

O GIII apresentou similaridade genética das estirpes com *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas*. *Stenotrophomonas* é relatada como bactéria fixadora de nitrogênio que coloniza com eficiência as raízes de cana de açúcar (RAMOS et al., 2011), enquanto que *Pseudomonas* são colonizadores usuais de folhas, raízes e sementes de diversas plantas (ESPINOSA-URGEL, 2004).

O quarto grupo mostrou maior similaridade dos isolados apresentando analogia com espécies de *Burkholderia*, *Variovorax*, *Herbaspirillum* e *Achromobacter*. Isolados bacterianos *Achromobacter* e *Variovorax* têm sido frequentemente isoladas de raízes de planta e descrita como rizobactérias promotoras de crescimento (CHANDRA et al., 2020), capazes de degradar hexabromociclododecano (HUANG et al., 2020) e serem avaliadas para biorremediação de contaminação ambiental. Os gêneros *Burkholderia* e *Herbaspirillum* inclui diversas espécies bacterianas fixadoras de nitrogênio, encontradas desempenhando um papel significativo na FBN de gramíneas como cana-de-açúcar e milho (PERIN et al., 2006; CURÁ et al., 2017; VAN DEYNZE et al., 2018).

Por fim, é interessante notar que o GVI compreendeu a organização de bactérias associadas principalmente aos gêneros *Enterobacter* e *Pantoea*. Uma provável explicação seria a semelhança do perfil bioquímico desses dois gêneros (MURRAY et al., 1997). No entanto, embora constituam um agrupamento único, não houve expressão de comportamento monofilético entre as bactérias isoladas e espécies identificadas como *Enterobacter*, uma vez que as sequências entre as espécies identificadas e isoladas compartilharam até 54% de nucleotídeos de acordo com o teste de bootstrap.

O sequenciamento do gene 16S rRNA permitiu visualizar afinidades das bactérias do nosso estudo com gêneros bacterianos já classificadas, mas não o suficiente para classificar a nível de espécie, como também identificado por Kumar et al. (2014). Desta forma, faz se necessário utilizar outros genes *housekeeping* para sua identificação a esse nível (DELAMUTA et al., 2017).

3.5 Conclusão

Provamos que a espécie de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola apresenta uma alta diversidade de bactérias associadas e que variam de acordo com as condições ambientais e ao compartimento da planta a qual se encontram.

A diversidade de bactérias endofíticas e rizosféricas geneticamente diversas no capim pangolão pode ter promovido sua resiliência em semiárido sem manejo de fertilidade, visto que muitas das estirpes identificadas possuem algum mecanismo capaz de promover o crescimento de plantas fornecendo como base para estudos mais detalhados.

Estudos futuros que incluem a análise desses micro-organismos quanto a promoção de crescimento podem fornecer mais informações sobre a capacidade de resposta sobre a interação desses micro-organismos com o pangolão.

3.6 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.
- AFZAL, I.; SHINWARI, Z.; SIKANDAR, S.; SHAHZAD, S. Plant Beneficial Endophytic Bacteria: Mechanisms, Diversity, Host Range and Genetic Determinants. **Microbiological Research**, v.221, p. 36-49. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>.
- ALBDAIWI, R. N.; KHYAMI-HORANI, H.; AYAD, J. Y.; ALANANBEH, K. M.; ALSAYAYDEH, R. Isolation and Characterization of Halotolerant Plant Growth Promoting Rhizobacteria From Durum Wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) Cultivated in Saline Areas of the Dead Sea Region. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 1639p, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01639>
- ANDRADE, A. F.; ZOZ, T.; ZOZ, A.; OLIVEIRA, C. E. S.; WITT, T. W. *Azospirillum brasilense* inoculation methods in corn and sorghum. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, e53027, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4953027>
- ANTUNES, G. R.; SANTANA, S. R. A.; ESCOBAR, I. E. C.; BRASIL, M. S.; ARAÚJO, G. G. L.; VOLTOLINI, T. V.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Associative diazotrophic bacteria from forage grasses in the Brazilian semiarid region are effective plant growth promoters. **Crop Pasture Science**, v. 70, p. 899–907, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1071/CP19076>.
- ARONOVICH, S.; CASTAGNA, A. A.; ARONOVICH, M. Potencial das gramíneas do gênero *Digitaria* para produção animal na Região Sudeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.31, n.11, p.829-834, 1996.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* ge. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Salamanca, v.36, p.86-93, 1986.

BALDANI, V.L.D. Efeito da inoculação de *Herbaspirillum* spp. no processo de colonização e infecção de plantas de arroz, e ocorrência e caracterização parcial de uma nova bactéria diazotrófica. Seropédica: UFRRJ, 1996, 238p. Tese de Doutorado.

BODENHAUSEN, N; HORTON, M.; BERGELSON, J. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 8, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056329>

BROWER, J. E.; ZAR, J. H. Field & laboratory methods for general ecology. W.C. Brown Publishers, Boston, 1984.

CERIGIOLI, M. M. Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho (*Zea mays* L.) e potencial para promoção de crescimento. (Tese de Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 132 p., 2005.

CERQUEIRA, F. W.; MORAIS, J. S.; MIRANDA, J. S.; MELLO, I. K. S.; SANTOS, A. F. J. Influência de bactérias do gênero *Bacillus* sobre o crescimento de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Enciclopedia Biosfera**, Goiânia, v. 11, p. 82-93, 2015.

CHANDRA, D.; SRIVASTAVA, R.; GLICK, BR.; SHARMA, A. K. Rhizobacteria producing ACC deaminase mitigate water-stress response in finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.). **3 Biotech**, v. 2, 65p, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2046-4>.

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 York, v. 51, n. 3, p. 271–277, 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.

CURÁ, J. A.; FRANZ, D. R.; FILOSOFÍA, J. E.; BALESTRASSE, K. B.; BURGUEÑO, L. E. Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030041>

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.

DIAS-FILHO, M. B., Diagnóstico das pastagens no Brasil. Documentos 402. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, Brasil. 36 p, 2014. ISSN 1983-0513.

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

DUBREUIL, V.; FANTE, K.; PLANCHON, OLIVIER.; SANTA'ANNA NETO, J. Os tipos de climas anuais no Brasil: uma aplicação da classificação de Köppen de 1961 a 2015. **Confins**, v. 37, n. 37. 2018. DOI: <https://doi.org/10.4000/confins.15738>

DUHAN, P.; BANSAL, P.; RANI, S. Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria from medicinal plant *Tinospora cordifolia*. **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 43 – 49, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.01.047>

ELMAGZOB, A. A. H.; IBRAHIM, M. M.; ZHANG, G. Seasonal Diversity of Endophytic Bacteria Associated with *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. **Diversity**, v. 11, n. 7, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/d11070112>

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**, v. 9, 2708p, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02708>

ESPINOSA-URGEL, M. Plant-associated *Pseudomonas* populations: molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. **Plasmid**, v. 3, p. 139-150, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2004.06.004>. PMID: 15518872.

FITRIANI, R.; PUTRIE, W.; ARYANTHA, I. N.; PRAYOGO, I.; ANTONIUS, S. Diversity of endophytic and rhizosphere bacteria from pineapple (*Ananas comosus*) plant in semi-arid ecosystem. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, 2020. 21. 3084-3093. DOI: <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210728>.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, Heidelberg, v. 6, n. 1, p. 1-13, 2016.

GALINDO, F. S.; BUZETTI, S.; RODRIGUES, W. L.; BOLETA, E. H. M.; SILVA, TAVANTI, R. F. R.; FERNANDES, G. C.; BIAGINI, A. L. C.; ROSA, P. A. L.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Inoculation of *Azospirillum brasilense* associated with silicon as a liming source to improve nitrogen fertilization in wheat crops. **Scientific reports**, v. 10, n. 6160, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63095-4>

GARCÍA-SALAMANCA, A.; MOLINA-HENARES, M. A.; DILLEWIJN, P. VAN; GLAESER, S. P.; KÄMPFER, P. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 4, p. 237-245, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2015.03.007>.

GOVINDASAMY, V.; MURUGEASN, S.; VELLAICHAMY, M.; KUMAR, U.; BOSE, P.; SHARMA, V. *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: potential PGPR for sustainable agriculture. In: Maheshwari D. (eds) Plant Growth and Health Promoting Bacteria. **Microbiology Monographs**, v. 18, p. 333-364, Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-642-13612-2_15 18.

GROVER, M.; MADHUBALA, R.; ALI, S. Z.; YADAV, S. K.; VENKATESWARLU, B. Influence of *Bacillus* spp. strains on seedling growth and physiological parameters of sorghum under moisture stress conditions. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 951-961, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.201300250>

GUO, J.; BOWATTE, S.; HOU, F. Diversity of endophytic bacteria and fungi in seeds of *Elymus nutans* growing in four locations of Qinghai Tibet Plateau, China. **Plant Soil**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04608-y>

GUSMÃO FILHO, J. D. *Digitaria eriantha* cv. survenola submetido a alturas de desfloração. 79 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, BA, 2018.

HAIYAMBO, D. H.; CHIMWAMUROMBE, P. M.; REINHOLD-HUREK, B. Isolation and screening of rhizosphere bacteria from grasses in East Kavango region of Namibia for plant growth promoting characteristics. **Current Microbiology**, v. 71, p. 566–571, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0886-7>.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RIAN, P. D. Past: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. Version. 1.37, 2001.

HERAS, J.; DOMÍNGUEZ, CÉSAR.; MATA, E.; PASCUAL, V.; LOZANO, C.; TORRES, C.; ZARAZAGA, M. GelJ - a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. **BMC bioinformatics**, v. 16, n.270, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>

HUANG, L.; SHAH, S.B.; HU, H. et al. Pollution and biodegradation of hexabromocyclododecanes: A review. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, v. 14, n. 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11783-019-1190-8>

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.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Anuário Estatístico De Pernambuco: Mapa 3.3 - Tipologia Climática, 2010. Acesso em: http://www.anuario.pe.gov.br/wp-content/uploads/downloads/2018/08/Mapa_3.3-Tipologia-clim%C3%A1tica.pdf, 07 de janeiro de 2021.

KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the Proteobacteria. In: Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K-H.; Stackebrandt, E. (eds). *The Prokaryotes*, 3rd edn, vol. 5. Springer: New York, pp 3–37, 2006.

KOOMNOK, C.; TEAUMROONG, N.; RERKASEM, B.; LUMYONG, S. Diazotroph endophytic bacteria in cultivated and wild rice in Thailand. **Science Asia**, v. 33, n. 4, 2007. DOI: <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2007.33.429>.

KULKARNI, N.; DALAL, J.; BODHANKAR, M. Microbial Endophytes: Ecology and Biological Interactions. **International Journal of Research in Agricultural Sciences**, Nova Dheli, v. 1, n. 5, p. 311-319, 2014.

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.

KUMAR, V.; NAIK, B.; GUSAIN, O.; BISHT, G. S. An actinomycete isolate from solitary wasp mud nest having strong antibacterial activity and kills the *Candida* cells due to the shrinkage and the cytosolic loss. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, 446p, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00446>

LI, J.; YE, B. C. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* KT2440 for high-yield production of protocatechuic acid. **Bioresource Technology**, v. 319, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124239>.

LIMA, D. R. M.; SANTOS, I. B.; OLIVEIRA, J. T. C.; COSTA, D. P.; QUEIROZ, J. V. J.; ROMAGNOLI, E. M.; ANDREOTE, F. D.; FREIRE, F. J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J. Genetic diversity of N-fixing and plant growth-promoting bacterial community in different sugarcane genotypes, association habitat and phenological phase of the crop. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 3, p. 1089-1105, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02103-7>

LIU, K.; NEWMAN, M.; MCINROY, J. A.; HU, C. H.; KLOEPPER, J. W. Selection and assessment of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for biological control of multiple plant diseases. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 107, n. 8, p. 928-936, 2017.

LIU, Y.; XU, P.; YANG, F.; LI, M.; YAN, H.; LI, N.; ZHANG, X.; WANG, W. Composition and diversity of endophytic bacterial community in seeds of super hybrid rice ‘Shenliangyou 5814’ (*Oryza sativa* L.) and its parental lines. **Plant Growth Regulation**, v. 87, p. 257–266, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0467-4>

LIU, Y.; YAN, H.; ZHANG, X.; ZHANG, R.; LI, M.; XU, T.; YANG, F.; ZHENG, H.; ZHAO, J. Investigating the endophytic bacterial diversity and community structures in seeds of genetically related maize (*Zea mays* L.) genotypes. **3 Biotech**, v. 10, n. 27, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-2034-8>

LU, C.; HONG, Y.; ODINGA, E. S.; LIU, J.; TSANG, D. C. W.; GAO, Y. Bacterial community and PAH-degrading genes in paddy soil and rice grain from PAH-contaminated área. **Applied Soil Ecology**, v. 158, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103789>.

MASHIANE, R.; ADELEKE, R.; BEZUIDENHOUT, C.; CHIRIMA, G. Community composition and functions of endophytic bacteria of Bt maize. **South African Journal of Science**, v. 114, 2018. DOI: <https://doi.org/10.17159/sajs.2018/20170018>.

MEIKE, A. C.; LATZ, M. H. K.; HELLE, S.; DAVID, B. C.; BIRGIT, J.; JAMES, K. M. BROWN, A. M. M.; HANS, J. L. J. Succession of the fungal endophytic microbiome of wheat is dependent on tissue-specific interactions between host genotype and environment.

Science of The Total Environment, v. 759, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143804>.

MILET-PINHEIRO, P.; SCHLINDWEIN, C. Comunidade de abelhas (*Hymenoptera, Apoidea*) e plantas em uma área do Agreste pernambucano, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, São Paulo, v. 52, n. 4, p. 625-636, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0085-56262008000400014>.

MOHAMAD, O.A.; MA, J. B.; LIU, Y.H.; DAOYUAN, Z.; HUA, S.; BHUTE, S.; HEDLUND, B. P.; LI, W.; LI, L. Beneficial Endophytic Bacterial Populations Associated With Medicinal Plant *Thymus vulgaris* Alleviate Salt Stress and Confer Resistance to *Fusarium oxysporum*. **Frontiers in Plant Science**, v, 11, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00047>

MURRAY, P. R.; BAROW, E. J.; PFALLER, M. A.; TEWOVER, F. C.; YOLKEN, K. H. **Clinical Microbiology**, 7 ed. ASM Press, Washington D. C., 1999.

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.

NAVARRO, D.; RODRÍGUEZ, P.; GONZÁLEZ, C.; TORRES, D. Umfolozi o pangola peluda: un pasto que comienza a ser cultivado. In: RENGIFO, C.; PÉREZ, E. e SANTOS, A. R. (Ed.). Revista de difusión de tecnología agrícola, pecuaria, pesquera y acuícola. Aragua, Venezuela: INIA - Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, 2005.

NIU, X.; SONG, L.; XIAO, Y.; GE, W. Drought-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria associated with foxtail millet in a semi-arid and their potential in alleviating drought stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–11, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02580>.

OLIVEIRA, V. S.; MORAIS, J. A. S.; FAGUNDES, J. L. SANTANA, J. C. S.; LIMA, I. G. S.; SANTOS, C. B. Produção e composição químico-bromatológica de gramíneas tropicais submetidas a dois níveis de irrigação. **Archives of veterinary science**, v. 20, p.7-36, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v20i2.36337>

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.

PERIN, L.; MARTÍNEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZÁLEZ, R.; ESTRADA-DE S. P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H. V.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and Sugarcane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 3103-3110, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.5.3103-3110.2006>

PERINI, L. J.; ZEFFA, D. M.; ROESLER, W. R.; ZUCARELI, C.; GONÇALVES, L. S. A. Co-inoculation and inoculation methods of plant growth-promoting bacteria in wheat yield performance. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 42, n. 1, p. 43-56, 2021.

PIELOU, E. C. The use of point-to-plant distances in the study of the pattern of plant populations. **Journal of Ecology**, v.47, n.3, p.607-613, 1959.

PIETERSE, C. M.; ZAMIOUDIS, C.; BERENDSEN, R. L.; WELLER D. M.; VAN WEES, S. C.; BAKKER, P. A. Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 52, p. 347-375, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>.

PIRHADI, M.; ENAYATIZAMIR, N.; MOTAMEDI, H.; SORKHEH, K. Impact of soil salinity on diversity and community of sugarcane endophytic plant growth promoting bacteria (*Saccharum officinarum* l. Var. Cp48). **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 16, n. 1, p. 725-739, 2018. DOI: http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1601_725739

POKHREL, C.; OHGA, S. Submerged culture conditions for mycelia yield and polysaccharide production by *Lyophllum decastes*. **Food Chemistry**, v. 105, p. 641-646, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.033>.

PUENTE, M. L.; ZAWOZNIK, M.; DE SABANDO, M. L.; PEREZ, G.; GUALPA, J. L.; CARLETTI, S. M.; CASSÁM, F. D. Improvement of soybean grain nutritional quality under foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Az39. **Symbiosis**, v. 77, p. 41-47, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13199-018-0568-x>

RAMOS, P. L.; VAN TRAPPEN, S.; THOMPSON, F. L.; ROCHA, R. C. S.; BARBOSA, H. R.; DE VOS, P.; MOREIRA-FILHO, C. A. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 4, p. 926-931, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.019372-0>.

RILLINGA, J. I.; ACUÑA, J. A.; NANNIPIERID, P.; CASSANE, F.; ARUYAMAC, 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.

ROBINSON, R.; FRAAIJE, B.; CLARK, I.; JACKSON, R.; HIRSCH, P.; MAUCLINE, T. Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. **Plant and Soil**, v. 405, p. 381 – 396, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2495-4>

RODRIGUES, L. S.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. Ivo. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* na cultura do arroz inundado. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.41, n. 2, p.275-284. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2006000200012>.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D.J.; DOWLING, D.N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p. 1-9, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>

SÁNCHEZ LÓPEZ, D. B.; GÓMEZ-VARGAS, R. M.; RUBIANO, F. G.; BUITRAGO, R. R. B. Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo

condiciones de invernadero. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, v. 3, n. 7, p. 1401-1415, 2012. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v3i7.1346>

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. The Mathematical Theory of Communication. Urbana, IL: University of Illinois Press. 1949.

SILVA, J. F.; DA SILVA, T. R.; ESCOBAR, I. E. C.; FRAIZ, A. C. R.; DOS SANTOS, J. W. M.; DO NASCIMENTO, T. R.; DOS SANTOS, J. M. R.; PETERS, S. J. W.; DE MELO, R. F.; SIGNOR, D.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Screening of plant growth promotion ability among bacteria isolated from field-grown sorghum under different managements in Brazilian drylands. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 34, n. 186, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-018-2568-7>

SILVA, M. O.; FREIRE, F. J.; LIRA JR, M. A.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; DA COSTA, D. P.; 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**, v. 36, n. 4, p. 1113-1121, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-06832012000400006>.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, 163: 688, 1949.

SINGH, L.; RUPRELA, N.; DAFALE, N.; THUL, S. T. Variation in endophytic bacterial communities associated with the rhizomes of tropical bamboos. **Journal of Sustainable Forestry**, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/10549811.2020.1745655>

SOUZA, L. J. N.; SANTOS, D. B. O.; FAGUNDES, J. L.; SOUZA, B. M. L.; BACKES, A. A.; OLIVEIRA JÚNIOR, L. F. G.; SANTOS, A. D. F.; MOREIRA, A. L. Morfogênese do capim faixa-branca submetido à adubação nitrogenada. **Boletim de Indústria Animal**, v.73, p.281-289, 2016. DOI: <https://doi.org/10.17523/bia.v73n4p281>.

TANNENBAUM, I.; KAUR, J. MANN, R.; SAWBRIDGE, T.; RODONI, B.; SPANGENBERG, G. Profiling the *Lolium perenne* microbiome: From seed to seed. **Phytobiomes Journal**, v. 4, n. 3, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-03-20-0026-R>.

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

URAMOTO, K.; WALDER, J. M. M.; ZUCCHI, R. A. Análise Quantitativa e Distribuição de Populações de Espécies de *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae) no Campus Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 1, p. 33-39, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2005000100005>

VAN DEYNZE, A.; ZAMORA, P.; DELAUX, P.-M.; HEITMANN, C.; JAYARAMAN, D.; RAJASEKAR, S. GRAHAM, D.; MAEDA, J.; GIBSON, D.; SCHWARTZ, K. D.; BERRY, A. M.; BHATNAGAR, S.; JOSPIN, G.; BENNETT, A. B. Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota. **PLoS Biology**, v. 16, n. 8, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006352>

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**. p. 25-40, 1994. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6369-3_34

VIANA, T. F. C.; CAMPELO, A. P. S.; BALDANI, J. I.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; BALDANI, V. L. D.; SILVA, W. M.; PAGGI, G. M.; BRASIL, M. S. Cultivable bacterial diversity associated with bromeliad roots from ironstone outcrops in central Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 4, p. 872-880, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.224982>

VINCENT, J. M. (1970). *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific.

VISHWAKARMA, P.; DUBEY, S. K. Diversity of endophytic bacterial community inhabiting in tropical aerobic rice under aerobic and flooded condition. **Archives of Microbiology**, v. 1, p. 17-29, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01715-y>.

WANG, X.; XIE, H.; KU, Y.; YANG, X.; CHEN, Y.; YANG, N.; MEI, X.; CAO, C. Chemotaxis of *Bacillus cereus* YL6 and its colonization by Chinese cabbage seedlings. **Plant Soil**, v. 447, p. 413–430, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04344-y>

WANI, Z. A.; ASHRAF, N.; MOHIUDDIN, T.; RIYAZ-UL-HASSAN, S. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 7, p. 2955-2965, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6487-3>.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.

XU, W.; WANG, F.; ZHANG, M.; OU, T.; WANG, R.; STROBEL, G.; XIANG, Z.; ZHOU, Z.; XIE, J. Diversity of cultivable endophytic bacteria in mulberry and their potential for antimicrobial and plant growth-promoting activities. **Microbiological Research**, v. 229, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126328>.

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTINEZ -ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. "A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*". **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 89-103, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89>

4 PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DO MILHO POR BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE *Digitaria eriantha* cv. SUVERNOLA

Resumo

A busca pela agricultura mundial sustentável tem levado ao uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) para diminuir o uso de fertilizantes. No entanto, algumas espécies de plantas, como o capim pangolão (*Digitaria eriantha* cv. Suvernola), ainda não foram estudadas quanto à associação com BPCP, podendo suas bactérias associativas aumentarem a produtividade de outras culturas. Dessa forma, o objetivo foi avaliar o potencial de promoção de crescimento de bactérias associativas do capim pangolão *in vitro* e sua possível relação com a promoção de crescimento no milho. Foram isoladas e caracterizadas bactérias associadas a raiz, colmo, folhas e solo rizosférico do pangolão. 132 representantes dos grupos formados pelo agrupamento a 90% de similaridade do BOX-PCR tiveram o gene 16S rRNA sequenciados e foram escolhidos para avaliação *in vitro* dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal. Cada mecanismo de promoção de crescimento também foi avaliado em experimentos em casa de vegetação no milho. A fixação biológica do N (FBN) foi avaliada por baixa disponibilidade de N, a produção de AIA foi avaliada através de estresse hídrico, solubilização de P e produção de sideróforos pelo uso de fontes com baixa solubilidade de P e Fe, respectivamente. Todas as estirpes sintetizaram AIA usando o triptofano como precursor, 63 estirpes cresceram na ausência de nitrogênio fixado, 114 sintetizaram sideróforos, e 46 solubilizaram fosfato inorgânico. Das 132 estirpes, 19 apresentaram todos os mecanismos avaliados *in vitro*. De maneira geral, as estirpes do estudo foram superiores ao inoculante comercial em todos os experimentos *in vivo*. Estirpes se sobressaíram ao inoculante comercial no experimento de baixa disponibilidade de N para todas as variáveis avaliadas, com exceção da eficiência relativa ao sem inoculação e N mineral. No experimento sob déficit hídrico, estirpes também mostraram melhores resultados para todas as variáveis avaliadas em relação ao inoculante comercial. No ensaio realizado com fonte de ferro de baixa solubilidade não houve diferença entre a testemunha inoculante comercial e todos os demais tratamentos para diâmetro do colmo, área foliar, massa seca da parte aérea, acúmulo de N e P na parte aérea e as eficiências relativas. No entanto, a estirpe 252A colaborou com uma maior altura e 5227 apresentou o maior valor de massa seca da raiz. No experimento com fornecimento de fósforo de baixa solubilidade não houve diferença entre a testemunha inoculante comercial quando comparado a cada um dos demais tratamentos para massa seca da parte aérea, acúmulo de N na parte aérea e todas as eficiências relativas. O acúmulo de P revelou 6 estirpes superiores ao inoculante comercial. As respostas das estirpes *in vitro* e *in vivo* mostrou um desempenho variado indicando uma ampla forma de mecanismos de ação, o que é desejável em termos de aplicação prática, indicando a possibilidade de uso heterólogo destas no milho.

Palavras-chave: FBN. Solubilização de fosfato. AIA. Sideróforos. Crescimento vegetal.

CORN GROWTH PROMOTION BY PLANT GROWTH PROMOTING BACTERIA ISOLATED FROM *Digitaria eriantha* cv. SUVERNOLA

Abstract

The search for sustainable world agriculture has led to the use of plant growth promoting bacteria (PGPB) as an alternative to reduce fertilizer use. However, some plant species, such as pangolão grass (*Digitaria eriantha* cv. Suvernola), have not yet been studied as to the association with PGPB, and their associative bacteria may increase the productivity of other crops. Thus, the objective was to evaluate the potential for promoting the growth of associative bacteria of pangolão grass *in vitro* and their possible relation with corn growth promotion. Bacteria were isolated and characterized from root, colm, leaves and rhizospheric soil of pangolao grass from three mesoregions of Pernambuco – Brazil. 132 representatives of the grouping at 90% similarity by BOX-PCR had the 16S rRNA gene sequenced and were chosen for *in vitro* evaluation of the plant growth promoting characteristics. Each mechanism was also evaluated on a greenhouse experiment on corn. Biological nitrogen fixation (BNF) was evaluated by N deficiency, IAA production by water deficiency, P solubilization and siderophores production by supplying P and Fe as low solubility sources, respectively. All strains synthesized IAA with tryptophan as a precursor, 63 strains grew in the absence of fixed nitrogen, 114 produced siderophores, and 46 solubilized inorganic phosphate. Of the 132 strains, 19 had all mechanisms evaluated *in vitro*. In general, the study strains were superior to the commercial inoculant in all *in vivo* experiments. Strains stood out to the commercial inoculant in the experiment of low availability of N for all evaluated variables, except for the efficiency related to no inoculation and mineral N. In the water deficit experiment, strains also showed better results for all variables evaluated in relation to the commercial inoculant. In the test performed with a low solubility iron source, there was no difference between the commercial inoculating control and all other treatments for stem diameter, leaf area, dry mass of the aerial part, accumulation of N and P in the aerial part and the relative efficiencies. However, strain 252A collaborated with a higher height and 5227 had the highest dry weight of the root. In the experiment with supply of low solubility phosphorus, there was no difference between the commercial inoculating control when compared to each of the other treatments for dry mass of the aerial part, accumulation of N in the aerial part and all the relative efficiencies. The accumulation of P revealed 6 strains superior to the commercial inoculant. The responses of the strains *in vitro* and *in vivo* showed a varied performance indicating a wide form of mechanisms of action, which is desirable in terms of practical application, indicating the possibility of their heterologous use in corn.

Keywords: BNF. Phosphate solubilization. IAA. Siderophores. Plant growth.

4.1 Introdução

O contínuo crescimento populacional mundial provoca a necessidade do aumento da produção de alimentos e conseqüentemente da pecuária e agricultura (MONTIEL-GONZÁLEZ et al., 2021). Este aumento depende do adequado fornecimento de nutrientes ao solo pelo uso de fertilizantes, que eleva os custos de produção e pode contribuir para o agravamento do aquecimento global e eutrofização (BAO et al., 2021; HU et al., 2021; YE et al., 2021).

Assim, a procura pelo aumento da sustentabilidade da agricultura mundial tem levado ao uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) como alternativa para diminuir a dependência de fertilizantes e seu impacto ambiental (ZULUAGA et al., 2021). Essas bactérias habitam qualquer parte da planta e rizosfera sem provocar prejuízos ao seu hospedeiro, e apresentam algum mecanismo que aumente o crescimento das plantas (FARIA et al., 2021).

A literatura indica diversos mecanismos de atuação potencialmente importantes, tais como fixação biológica de nitrogênio, síntese e liberação de fitohormônios como AIA, controle de fitopatógenos pela síntese e liberação de sideróforos ou solubilização de fosfato (BATISTA et al., 2021). No entanto, ainda não se sabe quais desses mecanismos levam à promoção de crescimento ou se a combinação desses mecanismos beneficia o crescimento das plantas (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003).

Estes mecanismos são encontrados em bactérias de vários gêneros relatadas como associadas a diversas espécies vegetais e como *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseomonas*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavimonas*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sphingomonas* que foram isolados de uma ampla gama de plantas, como milho, trigo, arroz, cana de açúcar, soja, sorgo e braquiária (GOVINDASAMY et al., 2017; MUTAI et al., 2017; CARPENTIERI-PIOLO et al., 2019; REZAMAHALLEH; KHODAKARAMIAN; HASSANZADEH, 2019; TAPIA-GARCÍA et al., 2020; ŽIAROVSKÁ et al., 2020; DARAZ et al., 2021; IKHAJIAGBE et al., 2021; LEANDRO et al., 2021).

No entanto, algumas espécies, como o capim pangolão (*Digitaria eriantha* cv. Survenola), ainda não foram estudadas quanto à associação com BPCP. Essa gramínea apresenta interesse particular pelo seu histórico de adaptação a condições estressantes, como exemplificado por sua sobrevivência em região tropical semiárida em Araripina (Pernambuco-Brasil) por pelo menos 30 anos, sem fertilização e com exploração animal não bem controlada (TAVARES, 2017).

Trabalhos vem mostrando que plantas adaptadas a ambientes sob estresse são fontes potenciais de bactérias promotoras de crescimento (CHERIF-SILINI et al., 2019; JOCHUM et al., 2019; DIF et al., 2021; DUBEY et al., 2021). Um exemplo de uso de estirpe isolada em uma cultura na inoculação de outras é o *Azospirillum brasilense*, cujas estirpes Ab-V5 e Ab-V6 foram isoladas do milho e são comercializadas como inoculante para milho, trigo e arroz (BRASIL, 2011). Essa espécie bacteriana também tem sido usada na coinoculação para soja juntamente como *Bradyrhizobium* (HUNGRIA et al., 2016), e junto com *Rhizobium* sp. na cultura do trigo (PERINI et al., 2021), obtendo resultados satisfatórios

Dessa forma, o objetivo foi avaliar o potencial de promoção de crescimento de bactérias associativas do capim pangolão (*Digitaria eriantha* cv. Suvernola) *in vitro* e sua possível relação com a promoção de crescimento no milho.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Amostragem e seleção de bactérias associadas ao Pangolão

A amostragem e seleção das bactérias associadas ao Pangolão, assim como a avaliação genotípica e formação de grupos para sequenciamento estão descritas no capítulo anterior. Representantes dos grupos formados na avaliação genotípica pelo agrupamento do BOX - PCR a 90% de similaridade, tiveram o gene 16S rRNA sequenciados e escolhidos para avaliação *in vitro* dos mecanismos de promoção de crescimento vegetal.

4.2.2 Avaliação dos mecanismos de promoção de crescimento *in vitro*

4.2.2.1 Crescimento em meio de cultura livre de N

Os isolados foram inoculados em frascos tipo penicilina contendo 5 mL do meio semissólido NFB (DOBEREINER et al., 1995) e incubados a 28 °C em estufa bacteriológica por um período de quatro a sete dias para a formação da película aerotóxica em forma de véu. Os isolados que formaram a película aerotóxica por 3 inoculações sucessivas foram classificados como fixadores de nitrogênio.

4.2.2.2 Capacidade de produzir ácido idol-3-acético (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 incubados por

48 horas à 28° C, sob agitação (120 rpm). 1,5 mL da cultura dos isolados foram centrifugados a 5.000 rpm e 4 °C, durante 20 minutos. 1 mL do sobrenadante foi misturado a 1 mL do reagente de Salkowski. O reagente de Salkowski foi preparado utilizando 1 mL de FeCl₃ 0,5 mol L⁻¹ e 35 mL de HClO₄ 35% (SERGEEVA et al., 2002). As amostras foram armazenadas em local escuro por 30min e realizadas as leituras em espectrofotômetro $\lambda = 520$ nm. A concentração de compostos indolacéticos foi estimada com uma curva padrão, previamente preparada com meio de cultura estéril não inoculado e quantidades conhecidas de AIA: 0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo obtida a equação:

$$A = 0,0118C + 0,0069 ; R^2 = 0,9961$$

Onde: A é a leitura da absorbância e C a concentração de IAA em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As estirpes foram classificadas de acordo com Brígido et al. (2017) em: baixa produção (< 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$), média produção (≥ 15 e < 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$), alta produção e (≥ 30 e ≤ 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e elevada produção (> 45 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.2.2.3 Capacidade de produzir sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada utilizando-se a metodologia de Schwyn e Neilands, (1987). Os isolados foram cultivados em meio TSB diluído (TSB foi diluído em água deionizada na proporção 1/10 por 72 h a 32 °C, sob agitação constante. Após esse período, foram adicionados em microtubos 1 mL do sobrenadante das culturas e 1 mL de solução CAS. Após 15 minutos, foi realizada leitura em espectrofotômetro com $\lambda = 630$ nm. A porcentagem da produção de sideróforos foi determinada pela seguinte fórmula (PAYNE, 1994):

$$\text{unidades de sideróforo (\%)} = \left[\frac{(Ar - As)}{Ar} \right] \times 100$$

Onde: Ar: Absorbância de Referência, As: Absorbância da amostra).

4.2.2.4 Capacidade de solubilizar fosfato inorgânico

A capacidade de solubilização de fosfato foi avaliada em meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999). As bactérias foram multiplicadas em meio TSB por 72h a 180 rpm e inoculadas em 3 pontos distintos no meio de cultura NBRIP sólido. Após o período de incubação de 15 dias a

28 °C no escuro, mediu-se o halo de solubilização e da colônia. O cálculo do índice de solubilização (IS) foi realizado da seguinte maneira:

$$IS = \left[\frac{\text{diâmetro do halo (mm)}}{\text{diâmetro da colônia (mm)}} \right] \times 100$$

Os isolados que solubilizaram fosfato foram classificados de acordo com Chagas Júnior et al. (2010) em baixa ($IS < 2$), média ($2 > IS < 4$) e alta ($IS > 4$) solubilização.

4.2.3 Eficiência das bactérias promotoras de crescimento associadas ao capim pangolão quanto ao crescimento inicial do milho

Cada mecanismo de promoção de crescimento foi avaliado em experimentos *in vivo* individual em casa de vegetação, nas dependências da Instituto Agrônomo de Pernambuco.

Os isolados foram testados em função do estresse ambiental (ausência de N, déficit hídrico e fontes de baixa solubilidade de P e Fe na cultivar de milho BR – 5026 (São José), em vasos com capacidade de 5 L contendo areia e vermiculita. O milho BR – 5026 é recomendada como cultivar rústica para regiões semiáridas ou similares e desenvolvida para produção de forragem, espigas verdes ou produção de grãos (MAPA, 2021).

As sementes de milho 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 e inoculadas com 1 mL por semente de uma suspensão contendo 10^9 células com cada respectiva estirpe. O preparo do caldo bacteriano consistiu na retirada de uma pequena quantidade de muco das bactérias crescidas em placas de petri em meio 79 utilizando-se uma alça de platina e inoculadas em 5 mL de meio TSB, mantidas sob agitação orbital a 180 rpm até a obtenção de 10^9 células viáveis mL⁻¹.

O semeio foi feito com três sementes por vaso a 3 cm de profundidade. Realizou-se irrigação com água destilada mantendo a capacidade de vaso de cada vaso 3 vezes na semana (Exceção de AIA). Os experimentos foram conduzidos em delineamento em blocos ao acaso, com três repetições.

A avaliação ocorreu 20 dias após a emergência. Inicialmente foram feitas as leituras da altura da planta, diâmetro do colmo e área foliar. Em seguida, a parte aérea foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada a 60 °C por quatro dias e posteriormente pesadas, para se obter a massa seca da parte

aérea (MSPA) e do sistema radicular (MSSR). Em sequência, toda a parte aérea foi moída para determinação dos teores de N pelo método de colorimetria (EMBRAPA, 2009) e acúmulo desse nutriente (ANPA) (obtido pela multiplicação dos teores adquiridos pela massa seca da parte aérea). A concentração de N foi estimada com uma curva padrão, previamente preparada com quantidades conhecidas de N: 0, 10, 30, 50, 70, 90 e 100 mg L⁻¹, foram preparadas de acordo com a equação:

$$A = 0,1925C + 0,1667; R^2 = 0,9921$$

Onde: A é a leitura da absorbância e C a concentração de N em mg L⁻¹.

O teor de P foi obtido pelo método de colorimetria (EMBRAPA, 2009) e acúmulo desse nutriente (APPA) (obtido pela multiplicação dos teores adquiridos pela massa seca da parte aérea). A concentração de P foi estimada com uma curva padrão, previamente preparada com quantidades conhecidas de P: 0, 0,5, 1, 2, 3 e 4 mg L⁻¹, foram preparadas de acordo com a equação:

$$A = 0,1011C + 0,0805; R^2 = 0,9951$$

Onde: A é a leitura da absorbância e C a concentração de N em mg L⁻¹.

4.2.3.1 FBN

Foram selecionadas 20 estirpes, sendo 7 positivos e 13 negativos para crescimento em meio de cultura sem N, todos sequenciados (Tabela 5). As estirpes foram selecionadas aleatoriamente dentro desta característica, de forma a representar a diversidade genética encontrada pelo BOX - PCR.

Visto que a inoculação com BPCP consegue suprir apenas parcialmente as necessidades das plantas (HUNGRIA, 2011; FUKAMI et al., 2016), fornecemos 30% da dose recomendada de fertilizante nitrogenado na semeadura, equivalente a 20 kg N ha⁻¹ (TABOSA et al., 2008). Além das estirpes, os tratamentos também incluíram um controle com 100% da dose recomendada (20 kg N ha⁻¹), controle não inoculado, da inoculação com produto comercial AzzoFix®, um inoculante líquido para milho contendo as cepas Ab-V5 e Ab-V6 com concentração de 2,0 x 10⁸ UFC ml⁻¹.

Foi aplicada solução nutritiva de Hoagland sem N (HOAGLAND; ARNON, 1950) uma vez por semana.

Foram calculadas as eficiências relativas ao controle não inoculado (ERSI), eficácia ao nitrogênio (ERN) e efetividade à estirpe recomendada (ERIC) conforme as equações I, II e III abaixo:

$$\text{I - ERSI (\%)} = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Controle}} \right) \times 100$$

$$\text{II - ERN (\%)} = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Controle com N}} \right) \times 100$$

$$\text{III - ERIC (\%)} = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Recomendada}} \right) \times 100$$

Tabela 5. Estirpes selecionadas para os experimentos *in vivo* em baixa disponibilidade de nitrogênio (FBN), sob estresse hídrico (AIA), fosfato de baixa solubilidade (P) e ferro de baixa solubilidade (Sideróforo). Linhas grifadas em cinza representam estirpes em comum aos quatro experimentos *in vivo*

Bactérias	Classificação	FBN	AIA	P	Sideróforo
5038		X	X	X	X
5095	<i>Enterobacter</i>	-	X	X	X
5155	<i>Rhizobium</i>	-	X	-	-
5211	<i>Stenotrophomonas</i>	X	X	X	X
5227	<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	X
5276	<i>Rhizobium</i>	-	X	-	-
5287	<i>Stenotrophomonas</i>	-	X	-	X
5289		-	X	-	-
5297	<i>Rhizobium</i>	X	-	-	X
5347	<i>Stenotrophomonas</i>	X	X	X	X
5410	<i>Rhizobium</i>	-	-	-	X
121B1	<i>Ochrobactrum</i>	-	X	-	X
14C	<i>Variovorax</i>	X	-	-	-
192C	<i>Achromobacter</i>	-	X	-	X
212B2	<i>Rhizobium</i>	X	X	-	X
230A	<i>Rhizobium</i>	-	X	-	-
231B1	<i>Priestia</i>	-	-	-	X
252A	<i>Pantoea</i>	X	-	X	X
289A		-	X	-	-
303A2	<i>Agrobacterium</i>	-	X	-	-
331C	<i>Rhizobium</i>	-	-	-	X
333B	<i>Pantoea</i>	X	X	X	X
334C1	<i>Pantoea</i>	-	-	X	-
335C	<i>Rhizobium</i>	-	X	X	X
338A	<i>Rhizobium</i>	X	X	-	X
344B	<i>Rhizobium</i>	-	-	-	X
347B	<i>Stenotrophomonas</i>	-	-	X	-
36D	<i>Stenotrophomonas</i>	X	-	-	-
377D	<i>Pantoea</i>	-	-	X	-
389B	<i>Pantoea</i>	X	-	X	-
394D	<i>Rhizobium</i>	X	-	-	-
396B		X	-	X	X
402B		-	X	-	-
413D2	<i>Ochrobactrum</i>	-	-	X	X
415A	<i>Pantoea</i>	-	X	-	-
41C	<i>Enterobacter</i>	-	-	X	-
425B	<i>Rhizobium</i>	-	X	-	-
432D	<i>Stenotrophomonas</i>	X	X	X	X
5038A	<i>Pantoea</i>	X	X	-	-
5057A	<i>Shinella</i>	X	-	X	X
5358A	<i>Paenibacillus</i>	X	X	-	X
G20	<i>Enterobacter</i>	-	-	X	-
N1C	<i>Variovorax</i>	X	-	-	-
N27D	<i>Pseudomonas</i>	X	-	-	-
N37C		X	-	X	-
N40E		-	-	X	-
N42A	<i>Agrobacterium</i>	-	X	-	-
N5G	<i>Burkholderia</i>	-	-	X	-
N9B	<i>Burkholderia</i>	-	-	X	X

4.2.3.2 AIA

Vinte e quatro estirpes foram selecionadas de forma a representar os percentis 0-5, 5-25, 25-50, 50-75, 75-95 e 95-100 para produção de AIA *in vitro*. Os tratamentos para o experimento de AIA foram: estirpes selecionadas (Tabela 5) e controles: capacidade de vaso sem inoculação, inoculante comercial e sem inoculação. A irrigação após germinação para todos os tratamentos, exceto a capacidade de vaso sem inoculação, foi mantida em 30% da capacidade de vaso, submetendo os tratamentos a estresse hídrico.

Calculou-se as eficiências relativas ao controle não inoculado (ERSI), eficiência a capacidade de vaso (ERC_v) e efetividade à estirpe recomendada (ER) conforme a equações I, II e III abaixo:

$$I - ERSI (\%) = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Controle}} \right) \times 100$$

$$II - ERC_v (\%) = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Controle Capacidade de vaso}} \right) \times 100$$

$$III - ERIC (\%) = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Recomendada}} \right) \times 100$$

4.2.3.3 Sideróforo

Vinte e quatro estirpes foram selecionadas de forma a representar os percentis 0-5, 5-25, 25-50, 50-75, 75-95 e 95-100 para produção de sideróforos *in vitro*.

Os tratamentos desse experimento consistiram em: estirpes selecionadas (Tabela 5) e controles: inoculante comercial, sem inoculação, aplicação de Fe solúvel e sem Fe. A solução nutritiva do experimento de sideróforo foi feita com fonte uma de ferro de baixa solubilidade (Fe(OH)₂).

Foram calculadas as eficiências relativas ao controle não inoculado (ERSI), eficácia a fonte de ferro solúvel (ERFe_{sol}) e efetividade à estirpe recomendada (ERIC) conforme a equações I, II e III abaixo:

$$I - ERSI (\%) = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Controle}} \right) \times 100$$

$$II - ERFe_{sol} (\%) = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Controle Fe solúvel}} \right) \times 100$$

$$\text{III} - \text{ERIC} (\%) = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Recomendada}} \right) \times 100$$

4.2.3.4 Solubilização de fosfato

As bactérias foram selecionadas de forma a representar os percentis 0-75, 75-95 e 95-100 para solubilização de fosfato *in vitro*, destacando que para esta característica foi respeitada a proporcionalidade de isolados não solubilizadores encontrada, usando o mesmo critério de seleção de estirpes representativas já mencionadas no experimento de FBN.

Os tratamentos consistiram em: 21 estirpes selecionadas (Tabela 5) e controles: 60 kg ha⁻¹ de P₂O₅ (superfosfato triplo – ST), dose recomendada para o milho no estado de Pernambuco (TABOSA et al., 2008), inoculante comercial e sem inoculação. A solução nutritiva do experimento de solubilização de fosfato constou de uma fonte de fósforo de baixa solubilidade (Ca₃ (PO₄)₂ - fosfato de cálcio tribásico).

As eficiências relativas ao controle não inoculado (ERSI), eficácia a fonte de fósforo solúvel (ERP_{sol}), eficácia ao superfosfato triplo (ERP_{2O5}) e efetividade à estirpe recomendada (ERIC) foram calculadas conforme a equações I, II, III e IV abaixo:

$$\text{I} - \text{ERSI} (\%) = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Controle}} \right) \times 100$$

$$\text{II} - \text{ERP}_{\text{sol}} (\%) = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Controle P solúvel}} \right) \times 100$$

$$\text{III} - \text{ERP}_{2\text{O}5} (\%) = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Controle P}_{2\text{O}5}} \right) \times 100$$

$$\text{IV} - \text{ERIC} (\%) = \left(\frac{\text{MSPA planta inoculada}}{\text{MSPA Recomendada}} \right) \times 100$$

4.2.4 Análise estatística

Os dados de promoção de crescimento *in vitro* foram agrupados a 100% de similaridade pelo modelo Jaccard e algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). Os dados dos experimentos com milho foram submetidos a avaliação de homocedase

e presença de outliers, e quando necessário submetidos a transformação \log_{10} e eliminação de outliers, seguido por análise de variância e quando apropriado teste de Dunnett ao nível de 5% de significância, em relação ao tratamento inoculado com o produto comercial. Em seguida, nova análise foi efetuada considerando somente os tratamentos controle em função de seu agrupamento em percentis para os diferentes fatores de promoção de crescimento, considerando a variação entre isolados para um mesmo agrupamento como sendo efeito do acaso, e o agrupamento como efeito fixo. Também foi realizada análise de correlação linear de Pearson entre os valores de cada estirpe na promoção de crescimento *in vitro* e no milho, para cada experimento individual.

4.3 Resultados

4.3.1 Características de promoção de crescimento de plantas de isolados endofíticos

63 estirpes (47,73%) foram capazes de crescer e formar película em meio de cultura semissólido livre de nitrogênio (Fig. 7A), predominando estirpes oriundas de solo e colmo, 19 e 18 estirpes, seguido de folha e raiz, 15 e 11 estirpes respectivamente. *Rhizobium* apresentou mais representantes entre os fixadores de nitrogênio (14 estirpes, 10,6%), seguido por *Pantoea* (10 estirpes, 7,58%), *Pseudomonas* (9, 6,82%), *Stenotrophomonas* (7 estirpes, 5,3%), *Enterobacter* (5 estirpes, 3,79%) e *Variovorax* (4 estirpes, 3,03%) com os demais 51% distribuídos entre *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Kosakonia*, *Paenibacillus* e *Serratia*, além de 6 não classificadas (Tabela suplementar 3).

Todas as estirpes produziram entre 4,19 $\mu\text{g} / \text{mL}$ a 212,05 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de AIA, sendo que 9,85% apresentaram baixa produção dessa auxina (< 15), 18,18% média (≥ 15 e < 30), 12,88% alta e (≥ 30 e ≤ 45) e 59,09% elevada (> 45) produções (Fig. 7B). As estirpes que produziram AIA em níveis elevados ($> 45 \mu\text{g} / \text{mL}$) pertenciam aos gêneros *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Enterobacter*, *Kosakonia*, *Ochrobactrum*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Shinella* e *Stenotrophomonas* sp. (Tabela Suplementar 3). Já comparando o local de isolamento, colmo e solo apresentaram o maior número de estirpes com produção elevada, 24 e 22 estirpes, seguido de folha e raiz, 17 e 15 estirpes.

86,36% das estirpes avaliadas sintetizaram sideróforos (Fig. 7C). Colmo e folha apresentaram o maior número de estirpes, 34 e 33 produtores de sideróforo, seguido de solo e raiz, 24 e 23. Os produtores de sideróforos corresponderam a 15 estirpes identificadas como *Pantoea* (11,36%), seguido por *Enterobacter* (7, 6,82%), *Rhizobium* (5 estirpes, 3,79%, cada),

Pseudomonas e Stenotrophomonas (3, 2,27%, cada), *Burkholderia* e *Ochrobactrum* (2 estirpes, 1,52%, cada), *Achromobacter* e *Variovorax* (1, 0,75%, cada) e 7 estirpes não classificadas (7, 6,82%) (Tabela Suplementar 3).

Apenas 34,85% das estirpes solubilizaram fosfato inorgânico, com IS variando entre 1,10 - 3,11, incluindo 15 estirpes de *Pantoea* (32,61%), sete de *Enterobacter* e estirpes não identificadas (15,22%), cinco estirpes de *Rhizobium* (10,87%), três *Pseudomonas e Stenotrophomonas* (6,52%), duas *Burkholderia* e *Ochrobactrum* (4,35%), uma *Achromobacter* e *Variovorax* (2,18%). Das estirpes que solubilizaram fosfato 23,49% tiveram baixa (IS < 2) (11 *Pantoea*, 5 estirpes não classificadas, 4 *Enterobacter*, 3 *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas*, 2 *Rhizobium*, 1 *Ochrobactrum*, *Achromobacterium* e *Burkholderia*) e 11,33% média (2 > IS < 4) (2 bactérias não classificadas, 4 *Pantoea*, 3 *Enterobacter* e *Rhizobium*, 1 *Burkholderia*, *Ochrobactrum* e *Variovorax*) solubilização (Fig. 7D e Tabela suplementar 3). Não foram obtidas estirpes com alta solubilização de fosfato, assim como também 8,33% não cresceu no meio de cultura. Também foi possível observar que as estirpes capazes de solubilizar fosfato foram provenientes de colmo, folha, raiz e solo, 17, 11, 10 e 8 estirpes, respectivamente.

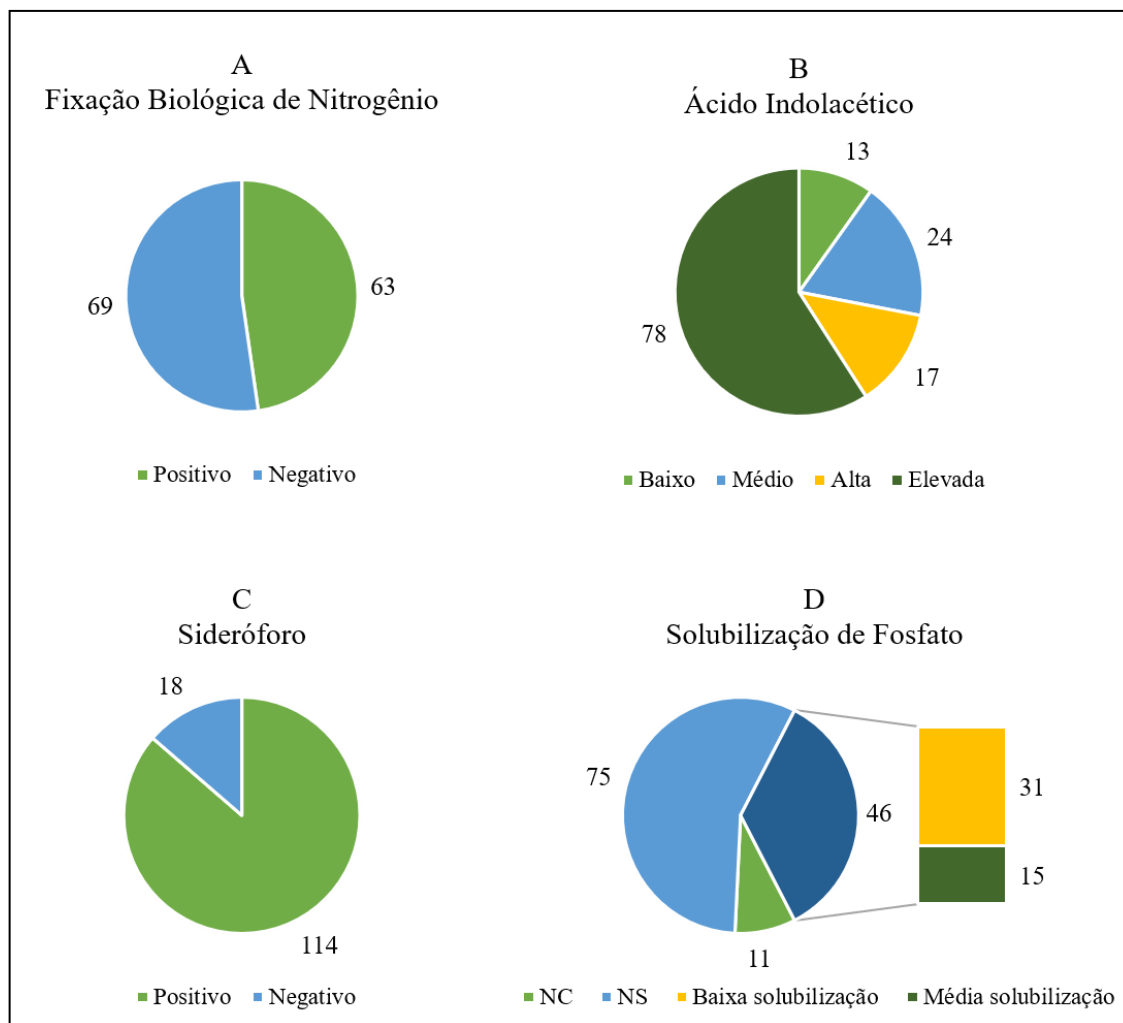


Figura 7. Caracterização funcional e número de bactérias associadas a plantas de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola testados *in vitro* para fixação do nitrogênio através do crescimento em meio NFB (A); síntese de ácido indolacético (B); produção de sideróforos (C); solubilização de fosfato inorgânico (D)

4.3.2 Ligação dos mecanismos promotores de crescimento *in vitro*

As 132 estirpes foram agrupadas pelo conjunto dos mecanismos de promoção de crescimento, formando oito grupos (Figura 8). O primeiro grupo (GI) foi representado por *Rhizobium* (5276) e *Stenotrophomonas* (331A2) provenientes de raiz e solo, respectivamente, com capacidade de sintetizar AIA e fixar nitrogênio.

Dois *Rhizobium* (270C e 335C) demonstraram capacidade para AIA, NFB e Fosfato (GII), ambas isoladas de colmo. No GIII enquadraram-se 1 *Enterobacter* e 3 *Pantoea*, isoladas de colmo, folha e raiz, com capacidade de sintetizar AIA e solubilizar fosfato. É interessante notar que 10 estirpes possuíram somente a capacidade de sintetizar AIA (GIV), entre essas, 4

Stenotrophomonas, 3 *Rhizobium* e 1 *Ochrobactrum*. Estas estirpes foram procedentes de colmo (5), solo rizosférico (4) e raiz (1).

No GV, 19 estirpes apresentaram todos os mecanismos avaliados, sendo a maioria oriundas de solo rizosférico (3 *Pantoea*, 2 *Enterobacter* e 1 estirpe não classificadas) e colmo (4 *Pantoea* e 1 *Stenotrophomonas*).

No GVI, 40 estirpes apresentaram os mecanismos AIA, sideróforo e FBN, sendo 2 bactérias não identificadas, 11 *Rhizobium*, 7 *Pseudomonas*, 5 *Stenotrophomonas*, 3 *Variovorax*, 2 *Achromobacter*, 2 *Enterobacter* e uma *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Kosakonia*, *Paenibacillus* e *Serratia*. Dentre estas, 12 foram originárias de solo rizosférico, 11 de colmo e 11 de folha.

No GVII foram agrupadas 34 estirpes sintetizadoras de AIA e sideróforo. Nesse grupo se enquadraram 9 *Stenotrophomonas*, 6 *Rhizobium*, 5 *Pseudomonas*, 2 *Agrobacterium* e 1 *Bacillus*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Priestia*, *Shinella* e 5 não identificadas. A maior parte proveniente de folha (13), colmo (9) e raiz (8). Vinte e uma estirpes (GVIII) apresentaram capacidade para AIA, sideróforo e fosfato. Neste grupo incluíram-se 4 bactérias não identificadas, 4 *Pantoea*, 3 *Enterobacter*, 3 *Rhizobium*, 2 *Stenotrophomonas*, 2 *Ochrobactrum*, 2 *Burkholderia*, 1 *Pseudomonas* e *Achromobacter* e 3 não identificadas. 8 estirpes foram oriundas de colmo, 6 de folha, 5 de raiz e apenas 2 de solo rizosférico.



Figura 8. Agrupamento das estirpes associadas ao capim pangolão em relação aos mecanismos de promoção de crescimento *in vitro* para: N - fixação biológica de nitrogênio; I - produção de ácido indolilacético; S - produção de sideróforos; P - solubilização de fosfato; (+) resultado positivo ao mecanismo; (-) resultado negativo ao mecanismo

4.3.3 Eficiência das bactérias promotoras de crescimento inicial do milho

De modo geral, estirpes se sobressaíram ao tratamento inoculante comercial no experimento de baixa disponibilidade de N (Tabela 6) para todas as variáveis avaliadas, com exceção da eficiência relativa ao sem inoculação e N mineral. Observou-se que 15 estirpes, N mineral e sem inoculação diferiram do tratamento inoculante comercial para altura de planta na faixa de 65 – 73 cm. A estirpe 396B (5,9 mm) e N mineral (6,7 mm) foram superiores em diâmetro do colmo. Para área foliar 11 estirpes e o controle sem inoculação diferiram do inoculante comercial. Observou-se que as bactérias inoculadas não tiveram efeito sobre a massa

seca da parte aérea, conseqüentemente, o mesmo ocorreu para eficiência relativa. Apenas sem inoculação e N mineral promoveram efeito a MSPA. 15 estirpes foram superiores para massa seca da raiz. O acúmulo de N mostrou que apenas o tratamento N mineral (158 mg planta⁻¹) foi superior ao inoculante comercial. Enquanto que o acúmulo de P, apenas a estirpe 5347 (11 mg planta⁻¹) e o sem inoculação (11 mg planta⁻¹) foram eficientes ao IC. 7 estirpes, N mineral e sem inoculação apresentaram o mesmo comportamento, com melhor eficiência relativa à estirpe recomendada.

Tabela 6. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão no milho crescimento do milho com redução no suprimento de N aos 20 dias após germinação

Tratamento	Altura (cm)	DC (mm)	AF (cm ²)	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERSI	ERN
				(mg)	mg planta ⁻¹			%		
0	70*	5NS	99*	1261*	867NS	108NS	10*	242*	97*	69*
14C	73*	4,8NS	82*	1029NS	788NS	87NS	8NS	198*	79NS	56NS
212B2	65*	5,3NS	77*	1113NS	655*	89NS	8NS	218*	86NS	61NS
252A	65*	5NS	94NS	895NS	506*	90NS	9NS	172NS	69NS	49NS
333B	61NS	4,8NS	82*	759NS	528*	56NS	8NS	181NS	58NS	41NS
338A	60NS	4NS	87*	861NS	436NS	87NS	9NS	166NS	66NS	47NS
36D	67*	5,1NS	91*	817NS	566*	94NS	7NS	157NS	63NS	44NS
389B	65*	5,7NS	98*	661NS	583*	61NS	5NS	127NS	51NS	36NS
394D	72*	5,5NS	91*	994NS	668*	85NS	8NS	191*	76NS	54NS
396B	71*	5,9*	116NS	968NS	563NS	85NS	7NS	186*	75NS	53NS
432D	71*	5,4NS	97*	1078NS	759NS	99NS	7NS	207*	83NS	59NS
5038	68*	5NS	70NS	890NS	694*	79NS	7NS	171NS	69NS	48NS
5038A	64NS	4,8NS	103NS	856NS	745*	68NS	9NS	166NS	66NS	47NS
5057A	66*	5,4NS	98NS	911NS	524*	65NS	8NS	175NS	70NS	50NS
5211	69*	5,7NS	107NS	1101NS	766NS	107NS	8NS	212*	85NS	60NS
5297	67*	5,3NS	108NS	838NS	706*	73NS	7NS	161NS	64NS	46NS
5347	72*	5,8NS	123NS	1073NS	501*	100NS	11*	206*	83NS	58NS
5358A	68*	5,3NS	91*	939NS	667*	86NS	7NS	181NS	72NS	51NS
N1C	65*	4,6NS	92NS	894NS	674*	87NS	8NS	172NS	69NS	49NS
N27D	63NS	5,1NS	85*	874NS	568*	78NS	7NS	168NS	67NS	48NS
N37C	62NS	4,5NS	79*	668NS	543*	88NS	3NS	124NS	51NS	36NS
N mineral	73*	6,7*	128NS	1786*	1543NS	158*	19NS	274*	137*	97*
IC	53NS	4,5NS	48NS	498NS	225NS	61NS	5NS	93NS	38NS	27NS
CV	1,7	5,9	3	3,5	3,9	4,8	14,5	3,9	5,6	6,1

100% N = Aplicação de 100% da dose recomendada; IC = Inoculante comercial; SI = Sem inoculação; DC= diâmetro do colmo; AF= área foliar; MSPA= massa seca parte aérea; MSR= massa seca do sistema radicular; ANPA = acúmulo de N na parte aérea; APPA = acúmulo de P na parte aérea; ERIC= eficiência relativa com Inoculante comercial; ERSI= eficiência relativa não inoculado; EFN= eficiência relativa com 100% N. Dados de MSPA, MSR, ANPA, APPA, ERIC, ERSI e ERN foram transformados por log10. Médias seguidas por um asterisco diferem significativamente da inoculação com o inoculante comercial a 0,05 de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

No experimento sob déficit hídrico (Tabela 7), as estirpes 335C (71 cm), 5289 (67 cm) e 5358A (68 cm), classificadas como *Rhizobium* sp., não classificada e *Paenibacillus* sp., respectivamente, ocasionaram maior altura de planta, enquanto que 335C e 402B (não classificada) apresentaram os maiores diâmetros de colmo, 5,4 e 5,2 mm. Não houve diferença estatística entre as estirpes, sem inoculação e capacidade de vaso quando comparados ao inoculante comercial em relação a área foliar. 5038A (*Pantoea* sp.) e 5358A mostraram os melhores resultados de massa seca da parte aérea, 1140 e 821 mg. 19 estirpes foram inferiores e 5 estirpes (338A, 402B, 425B, 5095 e 5358A) junto com sem inoculação tiveram efeito na massa seca da raiz. 335C, 338A, 425B, 5358A, N42A (*Agrobacterium* sp.) e capacidade de campo proporcionaram maior acúmulo de N, em relação à testemunha inoculante comercial, acontecendo o mesmo para 121B1 (*Ochrobactrum* sp.), 303A2 (*Agrobacterium* sp.), 338A, 402B, 5155 (*Rhizobium* sp.) e capacidade de campo para acúmulo de fósforo. 5038A, 5276 (*Rhizobium* sp.), 5289 e 5358A exibiram maiores eficiências relativas.

Tabela 7. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto a síntese de ácido indolacético *in vivo* e crescimento do milho 20 dias após germinação, submetidos ao estresse hídrico

Tratamento	Altura (cm)	DC (mm)	AF (cm ²)	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERSI	ERCv
				(mg)		mg planta ⁻¹		%		
0	56NS	4,7NS	74NS	505NS	1149*	46NS	4NS	72NS	75NS	76NS
121B1	58NS	4,5NS	66NS	556NS	891<	37NS	6*	97NS	101NS	102NS
192C	60NS	4,1NS	73NS	564NS	664NS	46NS	5NS	100NS	104NS	106NS
212B2	59NS	4,3NS	76NS	560NS	866<	36NS	4NS	99NS	104NS	105NS
230A	65NS	4,3NS	74NS	718NS	595NS	35NS	3NS	127NS	133NS	134NS
289A	60NS	4,4NS	75NS	465NS	579NS	37NS	4NS	83NS	86NS	87NS
303A2	59NS	4,6NS	74NS	626NS	813<	46NS	6*	109NS	114NS	115NS
333B	65NS	4,9NS	85NS	702NS	613NS	38NS	4NS	125NS	130NS	131NS
335C	71*	5,4*	74NS	642NS	803<	59*	6NS	114NS	119NS	120NS
338A	60NS	6,5NS	106NS	727NS	939*	86*	5*	108NS	113NS	114NS
402B	60NS	5,2*	72NS	700NS	1066*	123NS	7*	124NS	130NS	131NS
415A	56NS	4,9NS	53NS	614NS	798<	41NS	4NS	109NS	114NS	115NS
425B	51NS	4,4NS	64NS	496NS	993*	57*	3NS	88NS	92NS	93NS
432D	60NS	4,2NS	76NS	585NS	657NS	33NS	2NS	104NS	108NS	109NS
5038	61NS	5NS	100NS	688NS	898<	34NS	3NS	122NS	127NS	129NS
5038A	64NS	4,6NS	104NS	1140*	1450NS	43NS	4NS	202*	211*	213*
5095	56NS	4,1NS	49NS	455NS	911*	32NS	4NS	78NS	81NS	82NS
5155	58NS	3,5NS	70NS	499NS	784<	43NS	5*	92NS	96NS	97NS
5211	63NS	4,2NS	76NS	572NS	766NS	40NS	3NS	101NS	106NS	107NS
5276	60NS	4,5NS	81NS	659NS	803<	43NS	4NS	145*	151*	153*
5287	65NS	4,6NS	58NS	633NS	750NS	36NS	4NS	112NS	117NS	119NS
5289	67*	4,9NS	72NS	804NS	859<	44NS	4NS	140*	146*	148*
5347	63NS	5,1NS	78NS	661NS	907NS	49NS	5NS	117NS	122NS	124NS
5358A	68*	4,9NS	81NS	821*	1010*	77*	8NS	146*	152*	154*
Cv	54NS	4,6NS	55NS	470NS	261NS	77*	6*	80NS	84NS	85NS
N42A	60NS	4,2NS	77NS	579NS	670NS	61*	3NS	103NS	107NS	108NS
IC	55NS	4NS	74NS	432NS	384NS	28NS	3NS	75NS	79NS	79NS
CV	1,7	6,2	4,1	3,4	3,8	6,2	14,4	4	4	4

SI = Sem inoculação; IC = Inoculante comercial; Cv = capacidade do vaso; DC= diâmetro do colmo; AF= área foliar; MSPA= massa seca parte aérea; MSR= massa seca do sistema radicular; ANPA = acúmulo de N na parte aérea; APPA = acúmulo de P na parte aérea. Dados de altura, AF, MSPA, MSR, ANPA, APPA foram transformados por log₁₀. Médias seguidas por um asterisco diferem significativamente da testemunha inoculante comercial a 0,05 de probabilidade, pelo teste de Dunnet.

No ensaio realizado com fonte de ferro de baixa solubilidade (Tabela 8) não houve diferença entre a testemunha inoculante comercial e todos os demais tratamentos para diâmetro do colmo, área foliar, massa seca da parte aérea, acúmulo de N e P na parte aérea e as eficiências relativas. A estirpe 252A (85 cm) (*Pantoea* sp.) colaborou com uma maior altura de plantas e a

5227 (*Pseudomonas* sp.) apresentou o maior valor (1512,0 g) de massa seca da raiz, quando comparadas ao inoculante comercial.

Tabela 8. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto a produção de sideróforo *in vivo* e crescimento do milho 20 dias após germinação

Tratamento	Altura (cm)	DC (mm)	AF (cm ²)	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERSI	ERFesol
				(mg)	mg planta ⁻¹			%		
0	70NS	6,2NS	112NS	1208NS	683NS	115NS	8NS	82NS	94NS	111NS
121B1	71NS	5,7NS	90NS	922NS	751NS	93NS	10NS	63NS	72NS	85NS
192C	74NS	5,5NS	94NS	1380NS	851NS	88NS	6NS	94NS	107NS	127NS
212B2	74NS	6,2NS	101NS	1404NS	799NS	91NS	7NS	95NS	109NS	129NS
231B1	69NS	6,5NS	84NS	1263NS	927NS	82NS	9NS	86NS	98NS	116NS
252A	85*	6,8NS	115NS	1703NS	1322NS	131NS	11NS	116NS	132NS	157NS
331C	77NS	6,6NS	115NS	1538NS	1217NS	121NS	10NS	105NS	119NS	142NS
333B	76NS	6,2NS	113NS	1463NS	1080NS	109NS	14NS	99NS	113NS	135NS
335C	74NS	6NS	126NS	1350NS	817NS	101NS	8NS	92NS	105NS	124NS
338A	56<	5,1NS	127NS	802NS	308<	69NS	7NS	55NS	62NS	74NS
344B	76NS	6,2NS	116NS	1300NS	864NS	115NS	8NS	88NS	101NS	120NS
396B	76NS	5,5NS	99NS	1066NS	567NS	87NS	13NS	72NS	83NS	98NS
413D2	79NS	6,3NS	137NS	1719NS	878NS	117NS	12NS	117NS	133NS	158NS
432D	78NS	5,6NS	110NS	1462NS	1067NS	129NS	9NS	99NS	113NS	135NS
5038	71NS	5,8NS	102NS	1198NS	760NS	103NS	7NS	81NS	93NS	110NS
5057A	70NS	6,2NS	121NS	1228NS	696NS	98NS	8NS	83NS	95NS	113NS
5095	78NS	6,5NS	107NS	1420NS	790NS	81NS	8NS	97NS	110NS	131NS
5211	78NS	5,9NS	115NS	1130NS	728NS	103NS	8NS	77NS	88NS	104NS
5227	78NS	6,4NS	119NS	1442NS	1512*	82NS	8NS	98NS	112NS	133NS
5287	68NS	5,4NS	109NS	1310NS	985NS	107NS	10NS	89NS	102NS	121NS
5297	72NS	5,3NS	94NS	1152NS	865NS	103NS	7NS	78NS	89NS	106NS
5347	68NS	6,7NS	120NS	1314NS	689NS	86NS	9NS	89NS	102NS	121NS
5358A	71NS	5,8NS	104NS	1080NS	840NS	86NS	7NS	73NS	84NS	100NS
5410	69NS	5,9NS	110NS	1336NS	900NS	81NS	6NS	91NS	104NS	123NS
Fe SOL	56<	5,3NS	93NS	1221NS	729NS	70NS	6NS	83NS	95NS	113NS
N9B	72NS	5,7NS	104NS	1113NS	775NS	95NS	7NS	76NS	86NS	103NS
IC	69NS	6,4NS	112NS	1133NS	738NS	89NS	8NS	77NS	88NS	104NS
CV	1,5	6,2	2,4	2,3	3,4	5,9	11,5	3,7	3,6	3,5

SI = Sem inoculação; IC = Inoculante comercial; Fesol = ferro solúvel na solução de Hoagland; DC= diâmetro do colmo; AF= área foliar; MSPA= massa seca parte aérea; MSR= massa seca do sistema radicular; ANPA = acúmulo de N na parte aérea; APPA = acúmulo de P na parte aérea. Todos os dados foram transformados por log10. Médias seguidas por um asterisco diferem significativamente da testemunha inoculante comercial 0,05 de probabilidade, pelo teste de Dunnet.

No geral, no experimento com fornecimento de fósforo de baixa solubilidade não houve diferença entre a testemunha inoculante comercial quando comparado a cada um dos demais

tratamentos para massa seca da parte aérea, acúmulo de N na parte aérea e todas as eficiências relativas (Tabela 9). Porém, as estirpes 333B (*Pantoea* sp.), 396B e 5057A (*Achromobacter* sp.) foram superiores para altura, correspondendo a 86, 90 e 96cm, respectivamente, em relação ao inoculante comercial. O mesmo foi obtido para diâmetro de colmo, tendo as estirpes 335C (7,4 mm; *Rhizobium* sp.) e N37C (7 mm; não classificada) as melhores respostas. 333B e N37C também apresentaram os melhores resultados de área foliar. A massa seca de raiz revelou superioridade de 7 estirpes (7,76 – 19,95 mg planta⁻¹) e o ST (7,59 mg planta⁻¹), enquanto que o acúmulo de P revelou 6 estirpes (7,76 – 19,95 mg planta⁻¹) superiores ao inoculante comercial.

Tabela 9. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vivo* e crescimento do milho 20 dias após germinação

Tratamento	Altura (cm)	DC (mm)	AF (cm ²)	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERSI	EFP2O5	EFPSol
				(mg)	mg planta ⁻¹			%			
0	79NS	5,6NS	114NS	943NS	911NS	81NS	8NS	100NS	100NS	105NS	72NS
252A	76NS	5,6NS	120NS	1318NS	932NS	61NS	9NS	140NS	140NS	146NS	100NS
333B	86*	5,6NS	157*	1315NS	1177NS	95NS	9NS	140NS	139NS	146NS	100NS
334C1	81NS	6,1NS	134NS	1558NS	1339NS	125NS	13NS	165NS	165NS	173NS	92NS
335C	74NS	7,4*	123NS	1565NS	1441*	138NS	9NS	166NS	166NS	174NS	119NS
347B	71NS	5,2NS	104NS	1002NS	1220NS	107NS	13*	106NS	106NS	111NS	76NS
377D	79NS	6,6NS	147NS	1655NS	2791NS	87NS	7NS	176NS	175NS	184NS	126NS
389B	55NS	5,3NS	106NS	538NS	642NS	119NS	15*	109NS	109NS	114NS	78NS
396B	90*	6,1NS	118NS	1448NS	1026NS	71NS	6NS	154NS	153NS	161NS	110NS
413D2	77NS	5,8NS	100NS	1370NS	2131*	97NS	8NS	145NS	145NS	152NS	104NS
41C	79NS	5,7NS	121NS	1300NS	1265NS	90NS	10NS	138NS	138NS	144NS	99NS
432D	79NS	5,4NS	101NS	1298NS	933NS	116NS	8NS	138NS	138NS	144NS	99NS
5038	74NS	6,2NS	121NS	1275NS	593NS	100NS	8NS	135NS	135NS	142NS	97NS
5057A	96*	6,5NS	139NS	1966NS	1631*	106NS	15*	209NS	208NS	218NS	150NS
5095	72NS	5,4NS	106NS	1031NS	1029NS	82NS	7NS	109NS	109NS	115NS	78NS
5211	79NS	5,5NS	117NS	1123NS	1117NS	67NS	7NS	119NS	119NS	125NS	85NS
5347	73NS	5,1NS	107NS	1173NS	812NS	111NS	8NS	128NS	128NS	134NS	92NS
G20	74NS	5,7NS	102NS	1384NS	1413*	119NS	16*	147NS	147NS	154NS	105NS
N37C	75NS	7*	168*	1359NS	1564*	122NS	15*	144NS	144NS	151NS	103NS
N40E	71NS	5,6NS	88NS	1227NS	1595*	112NS	9NS	130NS	130NS	136NS	93NS
N5G	87NS	7,3NS	126NS	1714NS	1510*	163NS	15*	182NS	182NS	190NS	130NS
N9B	76NS	6,2NS	122NS	1305NS	1016NS	88NS	9NS	139NS	138NS	145NS	99NS
P SOL	66NS	6,4NS	99NS	1217NS	1095NS	83NS	9NS	129NS	129NS	135NS	93NS
P2O5	66NS	5,2NS	82NS	876NS	2016*	69NS	6NS	93NS	93NS	97NS	67NS
IC	66NS	5NS	95NS	931NS	614NS	87NS	5NS	99NS	99NS	103NS	71NS
CV	2	6,6	3,6	5,4	4,4	8,4	14,5	6,3	6,3	6,3	6,6

SI = Sem inoculação; IC = Inoculante comercial; ST = dose recomendada de P₂O₅ fornecida pelo superfosfato triplo; Psol = fósforo solúvel na solução de Hoagland; DC= diâmetro do colmo; AF= área foliar; MSPA= massa seca parte aérea; MSR= massa seca do sistema radicular; ANPA = acúmulo de N na parte aérea; APPA = acúmulo de P na parte aérea. Todos os dados foram transformados por log₁₀. Médias seguidas por um asterisco diferem significativamente da testemunha inoculante comercial a 0,05 de probabilidade, pelo teste de Dunnet.

4.3.4 Ligação dos mecanismos promotores de crescimento *in vitro* e *in vivo*

No experimento com redução na disponibilidade de N, observou-se que as plantas inoculadas com bactérias que não se desenvolveram em meio sem N, com maior síntese de AIA e menor IS apresentaram maior DC, sem efeito para as demais características (Tabela 10), enquanto o maior APPA foi observado para as bactérias com menor IS, não ocorrendo efeito significativo em relação a sideróforos neste experimento.

Já considerando a correlação entre as características de promoção de crescimento *in vitro* e na planta (Tabela 10a), foram encontradas correlações significativas negativas, mas relativamente baixas entre IS e MSPA, APPA, ERC0 e EFN, variando entre -0,30 e -0,36, bem como entre presença e ausência de crescimento em meio sem N e AF.

Tabela 10. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto aos mecanismos promotores de crescimento *in vitro* e ligação com resultados obtidos no experimento sob baixa disponibilidade de nitrogênio.

	Altura	DC	AF	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERC0	EFN
NFB										
+	66a	5b	86b	871a	628a	80a	7a	172a	67a	47a
-	67a	5a	97a	919a	607a	83a	8a	177a	71a	50a
IS										
0-75	68a	5a	94a	928a	631a	83a	8a	179a	71a	50a
75-95	63a	5ab	88a	824a	517a	71a	8ab	177a	63a	45a
95-100	62a	4b	80a	668a	541a	88a	3b	124a	51a	36a
AIA										
5-25	66a	5b	90a	919a	643a	81a	8a	177a	71a	50a
25-50	67a	5a	99a	899a	613a	87a	7a	172a	69a	49a
50-75	66a	5ab	90a	850a	582a	75a	7a	170a	65a	46a
75-90	69a	5a	84a	1054a	661a	87a	8a	204a	81a	57a
Sideróforo										
0-5	64a	5a	89a	839a	498a	90a	8a	161a	65a	46a
5-25	66a	5a	91a	908a	584a	76a	7a	175a	70a	49a
25-50	66a	5a	92a	808a	590a	83a	6a	154a	62a	44a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna, a 0,05 de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 10a. Correlação de Pearson entre características promotoras de crescimento *in vitro* das estirpes e resultados obtidos no experimento sob baixa disponibilidade de nitrogênio.

	Altura	DC	AF	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERC0	EFN
IS	-0,242	-0,125	-0,093	-0,358	-0,173	-0,214	-0,297	-0,218	-0,358	-0,358
AIA	-0,015	0,169	-0,154	-0,096	-0,110	-0,172	-0,091	-0,058	-0,096	-0,096
Sideróforo	0,182	0,228	0,143	0,078	0,100	-0,133	0,040	0,113	0,078	0,078
NFB	-0,091	-0,204	-0,303	-0,095	-0,048	-0,069	-0,155	0,024	-0,095	-0,095

Todos os dados foram transformados por log10.

O experimento sob estresse hídrico (Tabela 11), mostrou que estirpes com menor produção de AIA apresentaram maior DC, MSR, ANPA, APPA, ERIC, ERC0 e ERCv, enquanto que maiores produções desse fitohormônio promoveu melhor altura e MSPA. Também houve melhores respostas ao ANPA e APPA para estirpes que não cresceram em meio de cultura livre de nitrogênio e baixa produção de sideróforo. Ocorreu efeito significativo em relação a estirpes com menor IS para MSPA, ERIC, ERC0 e ERCv neste experimento.

Correlacionando as características de promoção de crescimento *in vitro* e *in vivo* (Tabela 11a), foram encontradas correlações significativas positivas, porém baixas entre FBN e todas as características avaliadas, bem como entre IS e as variáveis DC e APPA.

Tabela 11. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto aos mecanismos promotores de crescimento *in vitro* e ligação com resultados obtidos no experimento sob estresse hídrico.

	Altura	DC	AF	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERC0	ERCv
NFB										
+	60a	5a	75a	614a	832a	43b	4b	108a	112a	113a
-	63a	5a	73a	664a	795a	53a	5a	122a	127a	128a
IS										
0-75	61a	5a	76a	662a	846a	47a	4a	118a	123a	124a
75-95	59a	4a	74a	550ab	696a	44a	4a	98b	102b	103b
95-100	63a	5a	60a	534b	857a	43a	5a	94ab	98b	99b
AIA										
5-25	63ab	5a	90a	831ab	1101a	79a	6a	141a	147a	149a
25-50	64a	5ab	76a	611ab	778b	44bc	4b	109ab	114ab	115ab
50-75	59ab	5ab	68a	605a	796ab	36c	4b	107ab	111ab	112ab
75-90	62ab	4bc	70r a	630ab	749b	38bc	4b	112ab	116ab	118ab
Sideróforo										
0-5	63a	5a	80ab	630a	876a	57ab	6a	106a	111a	119a
5-25	62a	5b	73ab	683a	880a	59a	6a	126a	132a	108a
25-50	58a	4c	67ab	580a	754a	41b	4b	103a	108a	97a
50-75	61a	4c	76ab	570a	763a	45ab	3b	101a	106a	85a
75-95	63a	5ab	85a	717a	844b	41b	4b	127a	132a	103a
95-100	58a	4c	60b	505a	779a	38b	4ab	88a	92a	88a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna, a 0,05 de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 11a. Correlação de Pearson entre características promotoras de crescimento *in vitro* das estirpes e resultados obtidos no experimento sob estresse hídrico.

	Altura	DC	AF	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERC0	ERCv
IS	-0,134	0,012	-0,128	-0,090	-0,132	0,018	-0,100	-0,105	-0,105	-0,105
AIA	-0,136	-0,180	-0,072	-0,115	-0,076	-0,013	-0,049	-0,115	-0,115	-0,115
Sideróforo	-0,086	-0,205	-0,134	-0,104	-0,115	-0,155	-0,169	-0,139	-0,139	-0,139
NFB	0,068	0,053	0,043	0,059	0,037	0,102	0,061	0,064	0,064	0,064

Todos os dados foram transformados por log10.

As avaliações das plantas de milho realizadas no ensaio sob disponibilidade de ferro de baixa solubilidade e as respostas das estirpes obtidos *in vitro* (Tabela 12), nota-se efeitos positivos ao crescimento do milho pela inoculação de estirpes que apresentaram níveis médios de produção de sideróforo para altura, AF, MSPA, MRS, ANPA, ERIC, ERC0 e ERFe_{sol}. Efeitos significativos foram obtidos pelas estirpes com maior capacidade de produzir AIA para MSPA, ERIC, ERC0 e Fe_{sol}. Já produção média de AIA colaborou para altura e área foliar. Estirpes com médio IS contribuíram para maior altura, MSPA e MSR, enquanto que maior IS promoveu maior AF. Não houve diferença significativa entre estirpes capazes ou não de crescer em meio livre de N neste experimento.

Analisando a correlação entre as características de promoção de crescimento *in vitro* e plantas, observou-se correlação significativa positiva entre IS e AIA (Tabela 12a) nesse experimento para todas as características avaliadas variando entre 0,10 – 0,25. Sideróforo e FBN também mostraram correlação positiva para a maioria das características, porém relativamente baixa.

Tabela 12. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto aos mecanismos promotores de crescimento *in vitro* e ligação com resultados obtidos no experimento sob disponibilidade de ferro de baixa solubilidade.

	Altura	DC	AF	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERC0	ERF _{esol}
NFB										
+	73a	6a	108a	1273a	827a	98a	8a	87a	99a	117a
-	72a	6a	113a	1299a	903a	94a	8a	88a	101a	120a
IS										
0-75	71b	6a	107b	1211b	807b	94a	8a	82b	94b	112b
75-95	78a	6a	109ab	1458a	1012a	110a	10a	99a	113a	134a
95-100	76a	6a	118a	1384ab	814ab	98a	8a	94ab	107ab	128ab
AIA										
5-25	68b	6a	106ab	1097b	693a	88a	8a	75b	85b	101b
25-50	75a	6a	115a	1287ab	849a	97a	9a	87ab	100ab	119ab
50-75	75a	6a	108ab	1348a	896a	103a	9a	92a	105a	124a
75-90	72ab	6a	114ab	1433a	888a	98a	8a	97a	111a	132a
Sideróforo										
0-5	69b	6a	113ab	1111b	692b	94a	9ab	76b	86b	102b
5-25	72b	6a	113ab	1258ab	966a	93a	8a	86ab	98ab	116ab
25-50	80a	6a	119a	1540a	1017a	123a	10a	105a	119a	142a
50-75	72b	6a	102b	1277ab	835ab	89a	7b	87ab	99ab	118ab
75-95	72b	6a	108ab	1253ab	752ab	96a	10a	85ab	97ab	116ab
95-100	74ab	6a	99b	1259ab	819ab	91a	7b	86ab	98ab	116ab

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna, a 0,05 de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Tabela 12a. Correlação de Pearson entre características promotoras de crescimento *in vitro* das estirpes e resultados obtidos no experimento sob disponibilidade de ferro de baixa solubilidade.

	Altura	DC	AF	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERC0	ERF _{esol}
IS	0,259	0,073	0,134	0,201	0,010	0,028	0,104	0,201	0,201	0,201
AIA	0,160	0,081	0,122	0,216	0,094	0,027	0,130	0,216	0,216	0,216
Sideróforo	0,145	-0,045	-0,132	0,058	-0,003	-0,051	-0,149	0,058	0,058	0,058
NFB	-0,008	-0,019	0,073	0,002	0,062	-0,043	0,033	0,002	0,002	0,002

Todos os dados foram transformados por log₁₀.

No ensaio com aplicação de solução nutritiva contendo fósforo de baixa solubilidade observou-se que as plantas inoculadas com estirpes com maior IS promoveu maior massa seca da raiz, assim como estirpes que se desenvolveram em meio sem N, com alta síntese de AIA e

níveis baixos a médios de produção de sideróforo. Não ocorreu efeito significativo para nenhum mecanismo avaliado e as demais características avaliadas neste experimento.

Foi possível notar correlação positiva entre IS (Tabela 15a) e seu efeito na promoção de crescimento do milho para MSR (0,30), DC, ANPA e APPA, mas relativamente baixa para as três últimas características citadas. As demais características mostraram correlação negativa. Correlações negativas também foram observadas entre AIA e Sideróforo e todas as características, enquanto que ocorreu correlação positiva para FBN variando de 0,006 – 0,13.

Tabela 13. Avaliação das estirpes associadas ao capim pangolão quanto aos mecanismos promotores de crescimento *in vitro* e ligação com resultados obtidos no experimento sob fósforo de baixa solubilidade

	Altura	DC	AF	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERC0	EFPSol	EFP2O5
NFB											
+	77a	6a	117a	1267a	1145a	97a	9a	141a	140a	99a	147a
-	76a	6a	124a	1354a	1401b	111a	11a	144a	143a	103a	150a
IS											
0-75	77a	6a	115a	1183a	916b	96a	9a	138a	138a	99a	144a
75-95	80a	6a	129a	1389a	1378ab	100a	11a	148a	147a	102a	154a
95-100	74a	6a	113a	1311a	1414a	107a	10a	139a	139a	100a	146a
AIA											
5-25	81a	7a	124a	1496a	1239ab	120a	12a	159a	158a	114a	
25-50	75a	6a	122a	1209a	1170b	101a	9a	139a	139a	100a	146a
50-75	78a	6a	120a	1307a	1151b	95a	10a	139a	139a	97a	145a
75-90	75a	6a	101a	1377a	1735a	107a	11a	146a	146a	105a	153a
Sideróforo											
0-5	74a	7a	123a	1565a	1441a	138a	9a	166a	166a	119a	174a
5-25	81a	6a	130a	1501a	1651a	105a	12a	159a	159a	108a	167a
25-50	73a	6a	117a	1143a	1151a	98a	10a	135a	134a	97a	141a
50-75	79a	5a	117a	1123a	1117a	67a	7a	119a	119a	85a	125a
75-95	79a	6a	115a	1348a	1102b	107a	10a	144a	143a	103a	150a
95-100	74a	6a	113a	1160a	1022b	85a	8a	123a	123a	88a	129a

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúscula na coluna, a 0,05 de probabilidade, pelo teste de Tukey

Tabela 13a. Correlação de Pearson entre características promotoras de crescimento *in vitro* das estirpes e resultados obtidos no experimento sob fósforo de baixa solubilidade

	Altura	DC	AF	MSPA	MSR	ANPA	APPA	ERIC	ERC0	EFPSol	EFP2O5
IS	-0,167	0,096	-0,073	-0,009	0,309	0,029	0,072	-0,047	-0,047	-0,052	-0,047
AIA	-0,083	-0,165	-0,212	-0,015	0,068	-0,014	0,094	-0,075	-0,075	-0,084	-0,075
Sideróforo	-0,121	-0,221	-0,159	-0,126	-0,229	-0,080	-0,028	-0,167	-0,167	-0,147	-0,167
NFB	-0,084	0,119	0,029	0,055	0,139	0,126	0,136	0,007	0,007	0,035	0,007

Todos os dados foram transformados por log10.

4.4 Discussão

As estirpes endofíticas e da rizosfera de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola foram testadas quanto às suas características potenciais de promoção do crescimento das plantas. Até o presente não existe na literatura nenhum dado relacionado sobre esse assunto ligado a essa

espécie e conseqüentemente, como possibilidade dessas estirpes poderem beneficiar outras culturas. Sabemos que os mecanismos realizados por micro-organismos benéficos, possibilitam as plantas tolerarem com mais eficiência estresses bióticos e abióticos, aumento da absorção e utilização de nutrientes e aumento da atividade fotossintética, o que resulta em maior rendimento (VAN OOSTEN et al., 2017). No nosso estudo, a análise *in vitro* de 132 estirpes bacterianas isoladas de folha, colmo, raiz e solo rizosférico de pangolão revelou propriedades frequentemente associadas e consideradas importantes à promoção do crescimento de plantas por bactérias (WU et al., 2019).

Foi possível observar 63 estirpes com indicação de serem fixadoras de N. Esse mecanismo é muito discutido na literatura e visto com um dos mais importantes para o desenvolvimento das plantas. Em função disto é parte fundamental da ciclagem do nitrogênio pelo seu suprimento em ecossistemas terrestres não fertilizados (LANGENHOVE et al., 2021). Esta fixação é de enorme importância para os solos das regiões tropicais, tendo em vista o baixo conteúdo de nitrogênio existente (SANTIAGO et al., 2013). Além disso, BPCP que apresentem esse mecanismo pode ser estudados pra uso como inoculante ao melhorar o crescimento e rendimento de outras culturas (DI SALVO et al., 2018).

Todos os isolados demonstraram produzir AIA, que é frequentemente observada em BPCP (FUKAMI et al., 2017) por afetar a arquitetura do sistema radicular pelo enraizamento lateral, conseqüentemente aumento da área radicular, levado a maior absorção de água e nutrientes (FARIA et al., 2021). Também é importante mencionar que o AIA proporciona vantagens ao seu hospedeiro, atuando de forma dependente da concentração, ou seja, a produção excessiva pode inibir o crescimento da raiz em vez de promover (RAUT et al., 2017).

Cerca de 86% demonstraram a capacidade de sintetizar sideróforos que são importantes para a disponibilidade de ferro (Fe) pela sua alta afinidade com esse micronutriente e auxiliam na antibiose contra micro-organismos fitopatogênicos (KOUR et al., 2019; SINHA; PARLI, 2020). Resultados semelhantes foi encontrado por Ribeiro et al. 2020, onde ao avaliar bactérias endofíticas de *Brachiaria* quanto a produção de sideróforos descobriram que 84,04% produziam essa molécula. Além de fornecer ferro quelatado à planta, os sideróforos produzidos por BPCP podem servir a um propósito duplo na proteção contra doenças de plantas - (i) induzindo resistência sistêmica na planta hospedeira (CHEN et al., 2020); e (ii) eliminação e sequestro de ferro de fitopatógenos que precisam de ferro para crescer e se estabelecer (MEENA et al., 2020).

Observamos que 34,85% foram capazes de solubilizar fosfato tricálcico, principal forma de fósforo inorgânico insolúvel. A presença de bactérias capazes de realizar essa solubilização

pode levar ao aumento da disponibilidade de P, levando a absorção de P pela planta (PANDE et al., 2017). A conversão de fosfato em P disponível tem grande importância nas condições limitantes de P comumente observadas em solos tropicais e pela preocupante aplicação contínua de fertilizantes fosfáticos, considerada onerosa e poluente (WANG et al., 2021).

De forma geral, nosso estudo mostrou que os isolados que apresentaram algum mecanismo de promoção de crescimento vegetal foram predominantemente provenientes de colmo, folha e solo rizosférico, respectivamente. De acordo com Lareen et al. (2016), a principal fonte de bactérias endofíticas é a rizosfera, um ambiente dinâmico que muda com o desenvolvimento do sistema radicular da planta e liberação de exsudatos favorecendo o desenvolvimento de certos grupos de micro-organismos. As bactérias rizosféricas podem penetrar na planta, se locomover através dos vasos do xilema e colonizar um tecido específico (TAULÉ; VAZ-JAURI; BATTISTONI, 2021). Isso mostra a presença de espécies bacterianas promotoras de crescimento semelhantes no solo rizosférico e no ambiente endofítico. Outro fato, está relacionado a muitos micro-organismos formarem endósporos, assim, folhas e colmos podem ser colonizados a partir da deposição desses endósporos por aberturas naturais como estômatos, hidatódios e ferimentos, por meio de respingos de chuva ou dispersão no ar (ROBINSON et al., 2016), podendo indicar bactérias vindas de áreas próximas que colonizaram os tecidos.

A avaliação dos dados *in vitro* mostrou que as estirpes associadas ao pangolão apresentaram pelo menos uma das características de promoção de crescimento de planta. Esses quatro mecanismos (fixação biológica de N, síntese de ácido indolacético, solubilização de fosfato e produção de sideróforo) são comumente usados para caracterização de qualquer micro-organismo quanto a capacidade de promover crescimento vegetal estando associados ao crescimento e desenvolvimento da planta (KARMAKAR et al., 2021). Em geral, acredita-se que as bactérias promotoras de crescimento beneficiam o crescimento das plantas pela combinação de todos ou alguns desses mecanismos (DOBBELAERE et al., 2003).

De maneira geral, os experimentos *in vivo* realizados em casa de vegetação estabelecidos para quantificar a promoção do crescimento das plantas pelas estirpes associadas ao pangolão em diferentes condições nutricionais revelaram resultados semelhantes, com algumas estirpes superiores ao inoculante comercial.

Foi possível observar que no experimento com redução na disponibilidade de nitrogênio, estirpes e N mineral promoveram melhores efeitos as plantas de milho, sendo superiores ao tratamento inoculante comercial para todas as variáveis analisadas. No entanto, as estirpes não foram eficientes a eficiência relativa sem inoculação e nitrogênio mineral.

Schultz et al. (2017) em seu estudo de inoculação em variedades de cana-de-açúcar também apresentou resultados semelhantes, embora tenham concluído que a promoção do crescimento foi devido ao impacto ambiental positivo do biofertilizante.

A quantidade de nitrogênio absorvido pelo milho varia em função da quantidade de raízes e do estágio fenológico (MENGEL; BARBER, 1974). No nosso estudo, a colheita ocorreu na fase de desenvolvimento inicial do milho. Dessa forma, os 30% de N fornecido podem ter sido suficientes para o desenvolvimento inicial das plântulas de milho, visto que as maiores médias foram obtidas entre a controle com 100% de N, estirpes e o controle sem inoculação.

A dose recomendada de adubação na semeadura é calculada para suprir a planta até a aplicação da etapa de cobertura e como forma de minimizar as perdas. No nosso estudo, a aplicação de apenas 30% da dose inicial leva a planta a requerer nitrogênio antes da aplicação de cobertura, favorecendo a fixação biológica de N. Na presença de algum estresse nutricional, as plantas podem fazer uma sinalização receptora aos micro-organismos, por meio de secreções, que facilitam a colonização de grupos específicos de bactérias (GARCIA et al., 2016), neste caso, induzindo a fixação biológica de N. As respostas da inoculação das estirpes na planta, tratamento com aplicação de 100% da dose recomendada e o sem inoculação serem superiores ao inoculante comercial, supõe que melhores efeitos de superioridade das estirpes poderiam ser obtidos com o avanço do desenvolvimento fenológico da cultura.

O principal efeito do AIA é promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas (PARK et al., 2017). Isso foi observado no nosso estudo, ocorrendo superioridade de estirpes em relação as variáveis avaliadas quando comparado ao controle inoculante comercial, indicando a síntese de AIA pelas estirpes. Também foi possível observar que em nosso trabalho que cinco estirpes e o controle sem inoculação apresentaram melhores respostas para a massa seca da raiz. A sensibilidade das células à essa auxina varia nas diferentes partes da planta, onde o caule é menos sensível a concentrações altas de AIA que a raiz, ou seja, a dose ótima para o crescimento do caule é inibitória para o crescimento da raiz (PARK et al., 2017; ABBAS et al., 2018).

É interessante observar que as únicas estirpes superiores quanto ao acúmulo de nitrogênio no experimento de AIA pertencem aos gêneros *Rhizobium*, *Paenibacillus* e *Agrobacterium* sp. vistas na literatura como fixadoras de nitrogênio (PÉREZ-CORDERO et al., 2018; HATA; FUTAMURA, 2021; LI et al., 2021). O baixo conteúdo de água provocado pelo estresse hídrico pode ter reduzido a assimilação de nutrientes da solução nutritiva, induzindo essas estirpes a fixarem nitrogênio, visto que o tratamento de capacidade de campo

também foi superior ao inoculante comercial para acúmulo de N e P. *Rhizobium* sp. foi visto como eficientes no aumento do teor de nitrogênio das plantas de soja (LI et al., 2018) e a presença do gene *nifH* e fixação de nitrogênio em grão de bico (GOPALAKRISHNAN et al., 2018). *Agrobacterium* e *Paenibacillus* têm sido isolados de uma grande variedade de fontes incluindo, solo, rizosfera de plantas e materiais vegetais, sendo capazes de sintetizar hormônios vegetais como a auxina (DAANE et al., 2002; CANBOLAT et al., 2006; RAZA et al., 2008).

No ensaio de sideróforos não houve diferença entre as estirpes e o controle inoculante comercial para diâmetro do colmo, área foliar, massa seca da parte aérea e acúmulo de N e P na parte aérea e as eficiências relativas. Os sideróforos são conhecidos por atuarem como agentes quelantes específicos em função da baixa disponibilidade de ferro e com alta afinidade com o íon Fe^{3+} , permitindo sua solubilização (KHAN et al., 2018; MILJAKOVIC et al., 2020). O Fe é um micronutriente essencial necessário para vários processos biológicos como um cofator enzimático, necessário para fotossíntese, respiração, síntese de clorofila (RORIZ et al., 2021), sendo assim, a superioridade apresentada pela estirpe 252A para altura das plantas é um indicativo da sua eficiência na produção de moléculas de sideróforo.

As plantas do estudo foram submetidas a estresse nutricional pela aplicação de fonte de fósforo de baixa solubilidade. No entanto, não houve diferença entre inoculante comercial quando comparado a cada um dos demais tratamentos para massa seca da parte aérea, acúmulo de N na parte aérea e todas as eficiências relativas. Essa semelhança pode ter ocorrido em decorrência do N presente na solução nutritiva. A avaliação em um estágio inicial de desenvolvimento do milho pode não ter promovido tempo suficiente para completa solubilização do fósforo, já que os pequenos efeitos exercidos pelas bactérias solubilizadoras de fosfato também foram relacionados à colheita em um estágio inicial de desenvolvimento do trigo (RASUL et al., 2021). No entanto, mesmo com a menor tempo de cultivo, estirpes foram superiores ao inoculante comercial para altura, diâmetro do colmo, área foliar, massa seca da raiz e acúmulo de P na parte aérea.

As respostas das estirpes *in vitro* quando comparado aos ensaios em planta mostrou um desempenho variado das estirpes indicando uma ampla forma de mecanismos de ação, o que é desejável em termos de aplicação prática.

A correlação no ensaio de baixa disponibilidade de nitrogênio exhibe a importância de se avaliar a eficiência das estirpes na ausência desse macronutriente *in vivo*, e a não necessidade de estirpes terem gasto de energia ao realizarem outros mecanismos quando se há presença de fósforo, ferro e baixo estresse como foi submetido as plantas.

Outro dado interessante refere-se as respostas obtidas no ensaio de disponibilidade de ferro de baixa solubilidade e as respostas bioquímicas obtidas *in vitro*, mostrado através da correlação positiva e significativa a importância da solubilização de fosfato como possível mecanismo para auxiliar na solubilização do ferro e a importância do sideróforo na quelação e transporte para planta. A correlação com níveis de AIA também apresenta a importância de transporte e aumento do sistema radicular como forma de busca do micronutriente sob estresse nutricional. Além disso, a falta de correlação entre estirpes capazes ou não de crescer em meio livre de N está relacionado a presença desse nutriente na solução nutritiva aplicada.

Ainda que a variação de resposta das estirpes em milho possa ser vista como indesejável, a possibilidade de manejo de estirpes em conjunto num futuro possível inoculante, torna-se mais interessante do que utilizar apenas um micro-organismo que atue somente em uma única condição, ou seja, capaz de realizar somente um mecanismo de promoção. Além disso, a promoção de crescimento pelas estirpes associadas ao pangolão pode ser importante nas condições encontradas no semiárido, uma vez que estes micro-organismos podem melhorar a produtividade de culturas de grão e o valor nutritivo das forrageiras, assim esta associação poderá, contribuir para o desenvolvimento socioeconômico através da diminuição dos custos de produção.

4.5 Conclusão

A avaliação dos dados *in vitro* mostrou que as estirpes associadas ao pangolão apresentaram pelo menos uma das características de promoção de crescimento de planta, predominando estirpes oriundas de colmo, folha e solo rizosférico, respectivamente e os gêneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Pantoea*, *Stenotrophomonas*, *Rhizobium* e *Enterobacter*.

Diferentes isolados associados ao capim pangolão neste estudo promoveu o crescimento inicial do milho de diferentes maneiras. Nosso estudo mostrou a possibilidade de os resultados em cada experimento não terem sido obtidos em virtude de apenas um mecanismo, mas sim, pela combinação.

As plantas de milho inoculadas com estirpes de BPCP isoladas de capim pangolão apresentaram resultados positivos às condições de estresse que foram submetidas, indicando a possibilidade de uso heterólogo destas no milho.

4.6 Referências

- ABBAS, M.; HERNÁNDEZ-GARCÍA, J.; POLLMANN, S.; SAMODELOV, S. L.; KOLB, M.; FRIML, J.; HAMMES, U. Z.; ZURBRIGGEN, M. D.; BLÁZQUEZ, M. A.; ALABADÍ, D. Auxin methylation is required for differential growth in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 26, p. 6864 -6869, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1806565115>
- BAO, K.; ZHANG, Y.; ZACCONE, C.; MEADOWS, M. E. Human impact on C/N/P accumulation in lake sediments from northeast China during the last 150 years. **Environmental Pollution**, v. 271, 2021. ISSN 0269-7491, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116345>.
- BATISTA, B. D.; BONATELLI, M. L.; QUECINE, M. C. Fast screening of bacteria for plant growth promoting traits. In: Carvalhais LC, Dennis PG (eds) The Plant Microbiome. **Methods in Molecular Biology**, v. 2232, Humana, New York, NY, 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1040-4_7
- BRASIL, S. D. D. A.-M. D. A. P. E. A. Instrução Normativa Nº13, de 24 de março de 2011. Diário Oficial da União - Seção 1. Brasília: Imprensa Nacional. 58, 25 de março de 2011: 3-7 p. 2011.
- BRÍGIDO, C.; GLICK, B.; OLIVEIRA, S. Survey of plant growth-promoting mechanisms in native portuguese chickpea *Mesorhizobium* isolates. **Microbial Ecology**, v. 73, p. 900-915, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0891-9>.
- CANBOLAT M. Y., BARIK K., CAKMAKCI R., SAHIN F. Effects of mineral and biofertilizers on barley growth on compacted soil. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science**, v. 56, n. 4, p. 324-332, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1080/09064710600591067>
- CARPENTIERI-PIPOLO, V.; DE ALMEIDA LOPES, K. B.; DEGRASSI, G. Phenotypic and genotypic characterization of endophytic bacteria associated with transgenic and non-transgenic soybean plants. **Archives of Microbiology**, v. 201, p. 1029–1045, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01672-6>
- 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.
- CHEN, L.; WANG, X.; MA, Q.; BIAN, L.; LIU, X.; XU, Y.; ZHANG, H.; SHAO, J.; LIU, Y. *Bacillus velezensis* CLA178-Induced Systemic Resistance of *Rosa multiflora* Against Crown Gall Disease. **Front Microbiology**, v. 22, n.11: 587667, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.587667>.
- CHERIF-SILINI, H.; THISSERA, B.; BOUKET, A. C.; SAADAoui, N.; SILINI, A.; EHELLI, M.; ALENEZI, F. N.; VALLAT, A.; LUPTAKOVA, L.; YAHIAOUI, B.; CHERRAD, S.; VACHER, S.; RATEB, M. E.; BELBAHRI, L. Durum wheat stress tolerance induced by endophyte *Pantoea agglomerans* with genes contributing to plant functions and

secondary metabolite arsenal. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20163989>

DAANE, L.L., HARJONO, I., BARNS, S.M., LAUNEN, L.A., PALLERONI, N.J., HAGGBLOM, M.M. 2002. PAH. Degradation by *Paenibacillus* spp. and description of *Paenibacillus naphthalenovorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from the rhizosphere of salt marsh plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 131–139, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1099/00207713-52-1-131>

DARAZ, U.; LI, Y.; SUN, Q.; ZHANG, M.; AHMAD, I. Inoculation of *Bacillus* spp. modulate the soil bacterial communities and available nutrients in the rhizosphere of vetiver plant irrigated with acid mine drainage. **Chemosphere**, v. 263:128345, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128345>.

DI SALVO, L. P.; CELLUCCI, G. C.; CARLINO, M. E.; GARCÍA DE SALAMONE, I. E. Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation and nitrogen fertilization increase maize (*Zea mays* L.) grain yield and modified rhizosphere microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 126, p. 113-120, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.02.010>

DIF, G.; BELAOUNI, H.A.; GOUDJAL, Y.; YEKKOUR, A.; DJEMOUAI, N.; ZITOUNI, A. Potential for plant growth promotion of *Kocuria arsenatis* Strain ST19 on tomato under salt stress conditions. **South African Journal of Botany**, v. 138, p. 94 – 104, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.12.014>.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J. OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, p. 107-149, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1080/713610853>.

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

DUBEY, A.; SAIYAM, D.; KUMAR, A.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F.; KHAN, M. L. Bacterial root endophytes: characterization of their competence and plant growth promotion in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Under drought stress. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n.3, 931p., 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18030931>

DUBEY, A.; SAIYAM, D.; KUMAR, A.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F.; KHAN, M. L. Bacterial Root Endophytes: Characterization of Their Competence and Plant Growth Promotion in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) under Drought Stress. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 931, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph18030931>

EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 2.ed. Brasília, Informação Tecnológica, 628p., 2009.

- FARIA, P. S. A.; MARQUES, V. O.; SELARI, P. J. R. G.; MARTINS, P. F.; SILVA, F. G.; SALES, J. F. Multifunctional potential of endophytic bacteria from *Anacardium othonianum* Rizzini in promoting *in vitro* and *ex vitro* plant growth. **Microbiological Research**, v. 242, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126600>.
- FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, p. 1-13, 2016.
- FUKAMI, J.; OLLERO, F. J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v. 7, n. 153, p. 1-13, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>
- 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, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657001262013>
- GOPALAKRISHNAN, S.; SRINIVAS, V.; VEMULA, A.; SAMINENI, S.; RATHORE, A. Influence of diazotrophic bacteria on nodulation, nitrogen fixation, growth promotion and yield traits in five cultivars of chickpea. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 35 – 42, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.006>.
- GOVINDASAMY, V.; RAINA, S. K.; GEORGE, P.; KUMAR, M.; RANE, J.; MINHAS, P. S.; VITTAL, K. P. R. Functional and phylogenetic diversity of cultivable rhizobacterial endophytes of sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 110, p. 925–943, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0864-0>
- HAQUE, M.; KHALED, M.; KHATUN, M.; HAQUE, A.; BISWAS, S.; ISLAM, S.; ISLAM, M.; BARI, S. H.; MIAH, M. U.; MOLLA, A. H.; ALI, S. M. Biofilm producing rhizobacteria with multiple plant growth-promoting traits promote growth of tomato under water-deficit stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2954p., 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.542053>
- HATA, N.; FUTAMURA, H. Production of soybean plants for hydroponic cultivation from seedling cuttings in a medium containing *Rhizobium* inoculum depending on various concentrations of nutrient solution and different nitrogen sources. **Journal of Horticultural Research**, v. 28, n. 2, p. 71-82. DOI: <https://doi.org/10.2478/johr-2020-0015>
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 347p., 1950.
- HU, N.; LIU, C.; CHEN, Q.; ZHU, L. Life cycle environmental impact assessment of rice-crayfish integrated system: A case study. **Journal of Cleaner Production**, v. 280, p. 2, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124440>.
- HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36p.
- 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.

IKHAJIAGBE, B.; OGWU, M. C.; FAWEHINMI, F. O.; ADEKUNLE, I. J. Comparative growth responses of *Amaranthus* [L.] species in humus and ferruginous ultisols using plant growth promoting rhizobacteria (*Pseudomonas species*). **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 10-18, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.029>.

JOCHUM, M. D.; MCWILLIAMS, K. L.; BORREGO, E. J.; KOLOMIETS, M. V.; NIU, G.; PIERSON, E. A.; JO, Y. K. Bioprospecting plant growth-promoting rhizobacteria that mitigate drought stress in grasses. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 2106, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02106>

KARMAKAR, J.; GOSWAMI, S.; PRAMANIK, K.; MAITI, T. K.; KAR, R. K.; DEY, N. Growth promoting properties of *Mycobacterium* and *Bacillus* on rice plants under induced drought. **Plant Science**, v. 8, n. 1, p. 49-57, 2021.

KHAN, A.; SINGH, P.; SRIVASTAVA, A. Synthesis, nature and utility of universal iron chelator-siderophore: A review. **Microbiological Research**, p. 212–213, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.10.012>

KOUR, D.; RANA, K. L.; YADAV, N.; YADAV, A. N.; KUMAR, A.; MEENA, V. S.; SAXENA, A. K. Rhizospheric microbiomes: biodiversity, mechanisms of plant growth promotion, and biotechnological applications for sustainable agriculture. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Agricultural Sustainability**, Springer, Singapore, p. 19-65, 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-13-7553-8_2

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 Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1459-1465, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001000013>.

LANGENHOVE, L. V.; DEPAEPE, T.; VERRYCKT, L. T.; FUCHSLUEGER, L.; DONALD, J.; LEROY, C.; MOORTHY, S. M. K.; GARGALLO-GARRIGA, A.; ELLWOOD, M. D. F.; VERBEECK, H.; STRAETEN, D. V. D.; PEÑUELAS, J.; JANSSENS, I. A. Comparable canopy and soil free-living nitrogen fixation rates in a lowland tropical forest. **Science of The Total Environment**, v. 754, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142202>.

LAREEN, A.; BURTON, F.; SCHÄFER, P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, P. 575-87, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0417-8>.

LEANDRO, M. R.; VESPOLI, L. S.; ANDRADE, L. F.; SOARES, F. S.; BOECHAT, A. L.; PIMENTEL, V. R.; MOREIRA, J. R.; PASSAMANI, L. Z.; SILVEIRA, V.; SOUZA FILHO, G. A. DegP protease is essential for tolerance to salt stress in the plant growth-promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Microbiological Research**, v. 243, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126654>

LI, Y.; WANG, M.; CHEN, S. Application of N₂-fixing *Paenibacillus triticisoli* BJ-18 changes the compositions and functions of the bacterial, diazotrophic, and fungal microbiomes in the rhizosphere and root/shoot endosphere of wheat under field conditions. **Biology and Fertility of Soils**, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01528-y>

LI, Y.; YU, X.; CUI, Y.; TU, W.; SHEN, T.; YAN, M.; WEI, Y.; CHEN, X.; WANG, Q.; CHEN, Q.; GU, Y.; ZHAO, K.; XIANG, Q.; ZOU, L.; MA, M. The potential of cadmium ion-immobilized *Rhizobium pusense* KG2 to prevent soybean root from absorbing cadmium in cadmium-contaminated soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, p. 919-930, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14165>

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php. Acesso em 09 de maio de 2021.

MEENA, M.; SWAPNIL, P.; DIVYANSHU, K.; KUMAR, S.; HARISH; TRIPATHI, Y.; ZEHRA, A.; MARWAL, A.; UPADHYAY, R. PGPR-mediated induction of systemic resistance and physiochemical alterations in plants against the pathogens: Current perspectives. **Journal of Basic Microbiology**, 2020. <https://doi-org.ez19.periodicos.capes.gov.br/10.1002/jobm.202000370>

MENGEL, D.B.; BARBER, S.A. Rate of nutrient uptake per unit of corn root under field conditions. **Agronomy Journal**, Madison, v.66, n.3, p.399-402, 1974.

MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S. The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. **Microorganisms**, v. 8, p. 1037, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>

MONTIEL-GONZÁLEZ, C.; MONTIEL, C.; ORTEGA, A.; PACHECO, A.; BAUTISTA, F. Development and validation of climatic hazard indicators for roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) crop in dryland agriculture. **Ecological Indicators**, v. 121, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107140>.

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.

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

PANDE, A.; PANDEY, P.; MEHRA, S.; SINGH, M.; KAUSHIK, S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 379 – 391, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005>.

PANG, Z.; ZHAO, Y.; XU, P.; YU, D. Microbial diversity of upland rice roots and their influence on rice growth and drought tolerance. **Microorganisms**, v.8, n.9, 1329p., 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091329>

PARK, S.; ELHITI, M.; WANG, H.; XU, A.; BROWN, D.; WANG, A. Adventitious root formation of *in vitro* peach shoots is regulated by auxin and ethylene. **Scientia Horticulturae**, v. 226, p. 250 – 260, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.053>.

PAYNE, S. M. Detection, isolation, and characterization of siderophores. **Methods in Enzymology**, v. 235, p. 329 – 344, 1994. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1).

PÉREZ-CORDERO, A.; CHAMORRO-ANAYA, L.; DONCEL-MESTRA, A. Bactérias endofíticas promotoras de crescimento isoladas de capim colosoana, departamento de Sucre, Colômbia. **Revista MVZ**, Córdoba, v. 23, n. 2, p. 6696-6709, 2018. DOI: <https://doi.org/10.21897rmvz>.

PERINI, L. J.; ZEFFA, D. M.; ROESLER, W. R.; ZUCARELI, C.; GONÇALVES, L. S. A. Co-inoculation and inoculation methods of plant growth-promoting bacteria in wheat yield performance. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 42, n. 1, p. 43-56, 2021.

RASUL, M.; YASMIN, S.; YAHYA, M.; BREITKREUZ, C.; TARKKA, M., REITZ, T. The wheat growth-promoting traits of *Ochrobactrum* and *Pantoea* species, responsible for solubilization of different P sources, are ensured by genes encoding enzymes of multiple P-releasing pathways. **Microbiological Research**, v. 246, p. 126703, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126703>.

RAUT, V.; SHAIKH, I.; NAPHADE, B.; PRASHAR, K.; ADHAPURE, N. Plant growth promotion using microbial IAA producers in conjunction with azolla: A novel approach. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0083-3>.

RAZA, W.; YANG, W.; SHEN, Q. R. Paenibacillus polymyxa: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment. **Journal of Plant Pathology**, v. 90, p. 419-430, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v90i3.683>

REZAMAHALLEH, H. M.; KHODAKARAMIAN, G.; HASSANZADEH, N. Diversity of endophytic and epiphytic bacteria from sugarcane in Khuzestan, Iran. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 62, e19180407, 2019.

ROBINSON, R.; FRAAIJE, B.; CLARK, I.; JACKSON, R.; HIRSCH, P.; MAUCLINE, T. Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. **Plant and Soil**, v. 405, p. 381 – 396, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2495-4>

RORIZ, M.; PEREIRA, S. I. A.; CASTRO, P. M. A.; CARVALHO, S. M. A.; VASCONCELOS, M. W. Iron metabolism in soybean grown in calcareous soil is influenced by plant growth-promoting rhizobacteria – A functional analysis. **Rhizosphere**, v. 17, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100274>

SANTIAGO, W. R.; VASCONCELOS, S. S.; KATO, O. R.; BISPO, C. J. C.; RANGEL-VASCONCELOS, L. G. T.; CASTELLANI, D. C. Nitrogênio mineral e microbiano do solo em sistemas agroflorestais com palma de óleo na Amazônia oriental. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 43, n. 4, p. 395–406, 2013.

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; SILVA, P. A.; BALDANI, J. I.; BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Yield of sugarcane varieties and their sugar quality grown in different soil types and inoculated with a diazotrophic bacteria consortium. **Plant Production Science**, v. 20, n. 4, p. 366-374, 2017.

DOI: <https://doi.org/10.1080/1343943X.2017.1374869>

SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987. DOI: DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

SERGEEVA, M.; STROKIN, M.; WANG, H.; UBL, J. J.; REISER, G. Arachidonic acid and docosahexaenoic acid suppress thrombin-evoked Ca^{2+} response in rat astrocytes by endogenous arachidonic acid liberation. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, p. 1252–1261, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01052.x>

SINHA, A. K.; PARLI, B. V. Siderophore production by bacteria isolated from mangrove sediments: a microcosm study. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 524, p. 151290, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2019.151290>

TABOSA, J. N.; TAVARES FILHO, J. J.; SANTOS, D. C.; SIMPLÍCIO, J. B.; NASCIMENTO, M. M. A.; BRITO, A. R. M. B.; COUTINHO, G. V.; SILVA, A. B. Milho verde ou para forragem. CAVALCANTI, F. J. A. et al. Recomendação de adubação para o estado de Pernambuco – 2ª aproximação. 3ª edição revisada. Instituto Agrônômico de Pernambuco – IPA, 212p., 2008.

TAPIA-GARCÍA, E. Y.; HERNÁNDEZ-TREJO, V.; GUEVARA-LUNA, J.; ROJAS-ROJAS, F. U.; ARROYO-HERRERA, I.; MEZA-RADILLA, G.; VÁSQUEZ-MURRIETA, M. S.; SANTOS, P. E. Plant growth-promoting bacteria isolated from wild legume nodules and nodules of *Phaseolus vulgaris* L. trap plants in central and southern Mexico. **Microbiological Research**, v. 239, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126522>.

TAULÉ, C.; VAZ-JAURI, P.; BATTISTONI, F. Insights into the early stages of the endophytic plant-bacterial interaction. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 37, n. 13, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02966-4>

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

VAN OOSTEN, M. J.; PEPE, O.; DE PASCALE, S.; SILLETTI, S.; MAGGIO, A. The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, p. 5, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>

WANG, J.; ZHAO, Y. G.; MAQBOOL, F. Capability of *Penicillium oxalicum* y2 to release phosphate from different insoluble phosphorus sources and soil. **Folia Microbiologica**, v. 66, p. 69 – 77, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00822-4>

WU, T.; XU, J.; LIU, J.; GUO, W. H.; LI, X. B.; XIA, J. B.; XIE, W. J.; YAO, Z. G.; ZHANG, Y. M.; WANG, R. Q. Characterization and initial application of *endophytic bacillus safensis* strain zy16 for improving phytoremediation of oil-contaminated saline soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 991, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00991>

YE, Y.; NGO, H. H.; GUO, W.; CHANG, S. W.; NGUYEN, D. D.; VARJANI, S.; DING, A.; BUI, X.; NGUYEN, D. P. Bio-membrane based integrated systems for nitrogen recovery in wastewater treatment: Current applications and future perspectives. **Chemosphere**, v. 265, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129076>.

ŽIAROVSKÁ, J.; MEDO, J.; KYSEL, M.; ZAMIEŠKOVÁ, L.; KAČÁNIOVÁ, M. Endophytic bacterial microbiome diversity in early developmental stage plant tissues of wheat varieties. **Plants**, v. 9, n.2, 266p., 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9020266>

ZULUAGA, M. Y. A.; MILANI, K. M. L.; MIRAS-MORENO, B.; LUCINI, L.; VALENTINUZZI, F.; MIMMO, T.; PII, Y.; CESCO, S.; RODRIGUES, E. P.; OLIVEIRA, A. L. M. Inoculation with plant growth-promoting bacteria alters the rhizosphere functioning of tomato plants. **Applied Soil Ecology**, v. 158, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103784>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu a identificação e a avaliação da diversidade existente na cultura do capim pangolão, sendo encontrados 244 estirpes, confirmando que plantas podem ser consideradas um microecossistema complexo.

É provável que essa biodiversidade tenha proporcionado ao seu hospedeiro maior resiliência a condições de estresse, por apresentar diferentes mecanismos de promoção de crescimento vegetal, fixação biológica de nitrogênio, síntese de ácido indolacético, solubilização de fosfato e produção de sideróforo.

Os resultados para os testes de promoção de crescimento tanto *in vitro* quanto *in vivo* indicam o potencial destas bactérias, já que muitas apresentam mais de um mecanismo de promoção de crescimento *in vitro*, e grande parte não se diferenciou do desempenho de plantas não submetidas a estresses abióticos nos experimentos com o milho.

O desempenho das estirpes isoladas de pangolão no milho confirma a possibilidade de uso de espécies vegetais adaptadas a ambientes menos favoráveis como fonte de bactérias promotoras de crescimento para culturas comerciais.

Embora os testes de promoção de crescimento no milho tenham sido estabelecidos de forma a testar de forma mais intensa um dos fatores de promoção de crescimento, os resultados parecem confirmar a importância da ação conjunta dos diferentes mecanismos.

6 APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabela Suplementar 1. Descrição das características fenotípicas dos isolados bacterianos associados ao capim Pangolão, Brasil, 2020.

Isolado	Descrição	Isolado	Descrição	Isolado	Descrição	Isolado	Descrição
318	a-a-a-b-a-b-a	123D	a-a-a-a-a-a-a	339B	b-b-d-a-a-a-a	5172B2	a-b-a-a-a-a-a
5005	a-b-c-a-a-a-a	14C	a-b-c-a-a-a-a	33A	c-a-c-a-a-b-a	5224A	a-b-a-a-a-a-a
5007	b-b-c-a-a-b-a	15A	a-a-a-a-a-a-a	33B	a-a-b-b-a-a-a	5224B1	a-b-a-a-a-b-a
5010	a-b-b-a-a-a-a	168A2	b-b-b-a-a-b-a	33D	a-a-a-a-a-a-a	5240C	b-b-b-a-a-a-a
5018	a-a-a-a-a-a-a	168A3	a-a-b-a-a-a-a	344B	a-a-b-b-a-a-a	5333A	b-a-a-a-a-a-a
5020	a-a-a-b-a-a-a	183C1	a-a-b-a-a-a-a	344C	a-a-b-a-a-a-a	5333B	c-a-b-a-a-a-a
5021	a-a-c-a-a-a-a	188B	a-a-b-a-a-a-a	346A2	a-a-b-b-a-a-a	5358A	a-a-a-a-a-a-a
5025	a-a-a-a-a-a-a	18C	b-b-d-a-a-a-a	346B	a-a-c-b-a-a-a	5368A	a-b-c-a-a-b-a
5026	a-a-c-a-a-a-a	18C2	a-a-a-b-a-a-a	347B	a-a-b-b-a-a-a	5377EA	a-a-a-a-a-a-a
5028	a-b-a-a-a-b-a	191A	a-a-a-a-a-a-a	347C	a-a-a-b-a-a-a	5378EB	a-b-b-a-a-a-a
5038	a-a-a-a-a-a-a	192C	a-a-b-b-a-a-a	347D	a-a-b-a-a-a-a	5379A	a-b-b-a-a-a-a
5051	a-a-a-a-a-a-a	193A	a-a-a-b-b-a-a	347E	a-a-b-a-a-a-a	5383A	a-b-b-b-a-a-a
5068	b-b-a-b-a-a-a	194A	b-a-b-a-b-a-a	354A	a-a-a-b-a-a-a	G20	a-a-b-a-a-a-a
5074	a-a-b-b-a-a-a	195A1	a-a-b-a-a-a-a	357A	b-a-b-a-a-a-a	G35A	c-b-b-b-b-b-b
5083	a-a-b-b-a-a-a	195C1	b-a-b-a-a-a-a	358B	a-a-b-b-a-a-a	G37B1	a-a-b-a-a-a-a
5088	b-b-c-a-a-a-a	198A	b-b-a-b-a-b-a	359C	a-a-a-a-b-a-a	G4	a-a-c-a-a-b-a
5093	a-a-c-a-a-b-a	199B	a-a-a-a-a-a-a	360B	b-a-b-b-a-a-a	N12A	a-b-a-a-a-a-a
5094	a-a-a-a-a-a-a	199B2	a-a-a-a-a-a-a	361B	b-a-b-a-a-a-a	N12C	a-a-c-a-a-a-a
5095	a-a-a-a-a-a-a	199C	b-a-b-a-a-a-a	362A1	a-a-a-a-a-a-a	N12F	a-a-a-b-a-a-a
5098	a-a-a-b-b-a-a	20A1	a-a-b-a-a-a-a	362B1	a-a-a-a-a-a-a	N13A	a-a-a-b-a-a-a
5102	a-b-c-a-a-a-a	20A2	c-b-a-b-a-b-a	362C1	a-a-a-a-a-a-a	N14C	a-a-c-a-a-a-a
5112	b-b-b-a-a-a-a	20B	a-a-c-b-a-a-a	363B	c-b-b-b-a-a-a	N14D	a-a-a-a-a-a-a
5117	a-b-b-a-a-a-a	212B1	a-b-c-a-a-a-a	364A	a-a-a-b-b-b-a	N15B1	a-b-c-a-a-b-a
5120	a-a-a-b-a-a-a	212B2	a-a-a-a-a-a-a	365A	a-a-b-b-a-a-a	N15D	a-b-a-a-a-a-a
5132	a-a-a-a-a-a-a	219A	a-a-a-a-a-a-a	36D	a-a-b-a-a-a-a	N16C	a-a-a-a-a-a-a
5133	a-b-a-a-a-a-a	219B	a-a-c-a-a-a-a	372B	b-a-b-a-a-a-a	N16E	a-b-a-a-a-a-a
5134	a-b-a-a-a-a-a	221A	b-a-b-b-a-a-a	374B	c-b-a-a-a-a-a	N18A	a-b-a-a-b-a-b

Isolado	Descrição	Isolado	Descrição	Isolado	Descrição	Isolado	Descrição
5155	a-a-a-a-a-a	221C	a-a-c-a-a-a	375B	a-a-a-a-a-a	N18B	b-b-c-a-a-a
5167	b-b-c-a-a-b-a	223B	a-a-b-a-a-a	376A	a-a-b-b-a-b-a	N18C	a-a-b-a-a-a
5170	a-b-c-a-a-a-a	224B	a-a-c-a-a-a	377C	a-a-b-b-a-a-a	N18E	c-a-a-a-a-a
5172	a-a-a-a-a-a	225B	a-a-b-a-a-a	377D	a-b-c-a-a-a-a	N19C	a-a-a-a-a-a
5173	a-b-c-a-a-a-a	230A	a-a-c-a-b-a-a	378B2	a-a-c-a-b-b-a	N19D	a-b-a-a-a-a
5177	a-a-b-b-a-a-a	231A	a-a-a-a-a-a	379A2	a-a-c-a-a-a-a	N1B	a-a-a-a-a-a
5178	a-a-b-b-a-a-a	231B1	a-a-a-a-a-a	382A	a-a-c-a-a-a-a	N1C	a-a-a-a-a-a
5180	b-a-b-b-a-a-a	232B2	a-b-b-a-a-a-a	387B2	a-a-a-a-a-a-a	N1F	a-b-b-b-a-a-a
5183	a-a-a-a-a-a	248C1	a-a-b-a-a-b-a	389B	a-a-c-a-b-a-a	N21A	a-a-a-a-a-a
5184	a-a-b-a-a-a-a	24B	a-a-b-b-a-a-a	38B	a-b-a-a-a-a-a	N21F	a-a-b-a-b-b-a
5187	a-a-b-b-a-a-a	252A	a-a-a-a-a-a	390B2	a-a-b-b-a-a-a	N22A	a-a-a-b-a-a-a
5191	b-b-b-a-a-a-a	258A2B	a-a-b-a-a-a-a	392A	a-a-a-b-a-a-a	N22B	a-a-b-b-a-b-a
5193	a-a-a-b-a-a-a	25B	a-a-a-a-a-a	394D	a-a-c-a-a-a-a	N23A	a-b-c-a-a-a-a
5194	a-a-a-a-a-a	261A	a-a-b-a-a-a-a	396A	b-a-b-a-a-a-a	N23B	a-a-a-b-a-a-a
5195	a-b-b-b-a-a-a	270A	a-b-a-a-a-a-a	396B	a-a-b-a-a-a-a	N23C	a-a-c-b-a-a-a
5196	b-b-b-a-a-a-a	270B	a-a-c-a-a-a-a	399B	a-a-b-b-a-a-a	N27B	a-a-a-a-a-a-a
5200	a-b-b-a-a-a-a	270C	a-a-c-a-a-a-a	39B	a-a-a-a-b-a-a	N27D	a-a-a-a-a-a-a
5202	b-b-b-a-a-a-a	273A	a-a-a-a-a-a	400B	b-b-b-b-a-a-a	N27E	b-a-c-a-b-b-a
5206	a-b-a-b-b-a-a	273B2	a-a-a-b-a-a-a	402A	a-a-b-b-a-a-a	N27F	a-b-a-a-b-b-b
5211	a-b-b-a-a-a-a	273C	a-b-c-a-a-a-a	402B	b-a-c-b-a-a-a	N27G	b-b-b-a-a-a-a
5216	a-b-b-a-a-a-a	274A2	a-a-b-a-a-a-a	403B	b-a-b-b-a-a-a	N28C	a-a-b-a-a-a-a
5222	a-b-b-a-a-a-a	274C	a-a-a-a-a-a	406A	a-a-a-b-a-a-a	N28D	b-a-a-b-a-a-a
5223	a-a-b-b-a-a-a	288A1A	a-a-b-a-a-a-a	406C	a-b-c-a-a-a-a	N2A	a-b-a-b-a-a-a
5225	b-b-b-a-a-a-a	288C	a-a-a-a-a-a	410B	b-a-b-a-a-a-a	N2C	a-a-c-a-a-b-a
5226	b-b-b-b-a-a-a	289A	a-a-c-a-a-a-a	410C1	a-a-b-a-a-a-a	N31C	a-a-a-a-a-a-a
5227	a-b-b-a-a-a-a	28A	a-a-c-a-a-a-a	412B1	a-b-a-a-a-a-a	N31E	a-a-a-a-a-a-a
5276	b-b-b-a-a-a-b	294A	a-b-a-a-a-a-a	413B1	a-b-a-a-a-a-a	N34B	c-a-a-a-a-a-a
5284	a-a-a-a-a-a	294B	a-b-c-a-a-a-a	413D2	a-b-a-a-a-b-b	N35C	a-a-a-a-a-a-a
5287	a-a-b-b-b-a-a	296C	a-a-c-a-a-a-a	415A	b-a-a-a-a-a-a	N37C	a-b-a-a-b-b-a
5289	a-b-c-a-a-a-a	297A	a-a-b-a-a-a-a	416A	a-a-b-b-a-a-a	N3A	a-a-c-a-a-b-a
5290	b-b-b-a-a-a-a	297C2	b-a-b-a-b-a-a	416B	a-a-c-a-a-a-a	N3C	a-a-c-a-a-a-a
5294	b-b-b-b-b-a-a	303A2	a-a-a-a-a-a	41C	a-a-c-a-a-a-a	N40A	a-a-a-a-a-a-a

Isolado	Descrição	Isolado	Descrição	Isolado	Descrição	Isolado	Descrição
5297	b-b-b-a-b-a-a	312A	a-a-a-a-a-a-a	424A	a-a-c-a-a-a-a	N40B	a-a-a-a-a-a-a
5298	a-b-c-a-a-a-a	315B	a-b-a-a-a-a-a	424B	b-a-b-b-a-a-a	N40E	a-a-c-a-a-a-a
5302	a-b-c-a-a-a-a	328A	a-a-a-a-a-a-a	425A	b-a-b-b-a-a-a	N40G	a-a-b-a-a-a-a
5305	a-a-b-b-a-a-a	32B1	b-a-b-b-a-a-a	425B	a-a-a-a-a-b-a	N41A	a-a-b-b-a-a-a
5310	a-a-a-a-a-a-a	330A	a-a-a-b-a-a-a	428A	a-a-a-a-a-a-a	N41C	a-a-a-a-a-a-a
5326	a-a-a-b-a-a-a	330B1	a-a-a-a-a-a-a	430A	a-a-a-a-a-a-a	N42A	a-b-b-b-b-b-a
5328	a-a-c-a-a-a-a	330B2	a-a-a-a-a-a-a	432A2	a-a-a-a-a-a-a	N43A	a-a-a-a-a-a-a
5333	a-a-a-a-a-a-a	331A2	a-a-a-a-a-a-a	432D	b-a-a-a-a-a-a	N43D	a-a-a-a-a-a-a
5334	a-a-a-a-a-a-a	331C	b-a-a-a-a-a-a	435A	b-a-a-a-a-a-a	N44B2	a-b-b-a-a-a-a
5338	a-a-a-a-a-a-a	332A	a-a-a-a-a-a-a	45B	a-a-a-b-a-a-a	N44E	a-b-a-a-b-a-a
5347	a-b-d-a-a-a-a	333A	c-a-a-a-a-a-a	5012B	c-a-a-a-a-a-a	N45C	a-a-a-a-a-a-a
5360	a-a-a-a-a-a-a	333B	a-a-c-a-a-a-a	5020A2	b-b-a-a-a-a-a	N46C	a-a-a-a-a-a-a
5362	a-a-b-a-a-a-a	334B	a-a-a-a-b-a-a	5038A	a-a-a-b-a-b-a	N46D	a-b-a-a-a-a-a
5377	a-a-a-a-a-a-a	334B1B	a-a-a-a-a-a-a	5053B	a-a-d-a-a-a-a	N5F	a-a-a-b-a-a-a
5388	a-a-a-a-a-a-a	334C1	a-a-c-b-a-a-a	5057A	a-a-a-b-a-a-a	N5G	a-a-c-a-a-a-a
5396	a-b-a-a-a-b-a	335B2	a-a-a-b-a-a-a	5099A	a-c-a-a-a-a-a	N6B	a-a-c-a-a-b-a
5410	a-a-a-a-a-a-a	335C	b-a-b-a-a-a-a	5142A	a-a-a-a-a-a-a	N9B	a-a-c-a-a-a-a
121A	a-a-b-a-a-a-a	336A	a-a-a-b-a-a-a	5147B	c-a-a-a-a-a-a		
121B1	a-a-b-a-a-b-a	338A	b-a-b-b-a-a-a	5172B1	a-a-a-a-a-a-a		

(1) Descrição: 1º valor - pH: ácido (a), neutro (b), alcalino (c); 2º valor - produção de muco: sim (a), não (b); 3º valor - cor da colônia: a: creme com amarelo, b: creme, c: amarelo, d: rosa; 4º valor - opacidade: opaca (a), translúcida (b); 5º valor - forma: circular (a), irregular (b); 6º valor - borda: inteira (a), irregular (b); 7º valor - superfície: lisa (a), irregular (b).

Tabela Suplementar 2. Identidade dos isolados bacterianos provenientes de *Digitaria eriantha* cv. Suvernola e das diferentes condições de isolamento, com base na identidade da sequência parcial do gene 16S rRNA realizada pelo programa Blast no GenBank.

Bactéria	Q cover	e-value	Identidade	Sequências mais similares no banco de dados	Descrição
5038	72%	2,00E-106	70.63%	Bactéria não cultivada	HM186918.1
5068	100%	0.0	99.60%	<i>Enterobacter</i> sp.	MT212231.1
5095	96%	0.0	99.56%	<i>Enterobacter</i> sp.	KF516257.1
5117	99%	0.0	99.00%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
5120	99%	0.0	98.66%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
5132	99%	0.0	98.09%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_157765.1
5155	99%	0.0	99.25%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
5167	95%	0	88%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	AB461796.1
5170	100%	0.0	99.82%	<i>Burkholderia</i> sp.	KT159931.1
5173	100%	0.0	98.98%	<i>Variovorax</i> sp.	NR_113736.1
5177	98%	0.0	99.71%	<i>Agrobacterium</i> sp.	NR_157010.1
5183	99%	0.0	99.44%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
5193	100%	0.0	98.36%	<i>Pseudomonas</i> sp.	MH428810.1
5195	20%	0,19	68%	<i>Pseudomonas</i> sp.	KF113577.1
5200	99%	0.0	99.71%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	MT779804.1
5211	100%	0.0	99.18%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
5223	99%	0.0	99.20%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
5225	100%	0.0	98.54%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
5226	100%	0.0	99.14%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
5227	100%	0.0	98.76%	<i>Pseudomonas</i> sp.	MT672503.1
5276	99%	0.0	99.28%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
5287	99%	0.0	99.02%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
5289	28%	4,00E-10	68%	Bactéria não cultivada	EU181793.1
5290	99%	0.0	98.76%	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_134794.1
5294	-	-	-	-	-
5297	7%	0,054	76%	<i>Rhizobium</i> sp.	KF202632.1
5302	100%	0.0	99.38%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
5305	100%	0.0	99.54%	<i>Pseudomonas</i> sp.	MT027239.1
5310	100%	0.0	99.08%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
5333	12%	5,00E-12	77.22%	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	JF746900.1
5347	100%	0.0	98.39%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
5396	100%	0.0	99.19%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_117406.1
5410	99%	0.0	99.46%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
121A	99%	0.0	99.14%	<i>Enterobacter</i> sp.	MK567957.1
121B	100%	0.0	99.28%	<i>Ochrobactrum</i> sp.	NR_074243.1
14C	99%	0.0	99.48%	<i>Variovorax</i> sp.	NR_134828.1

Bactéria	Q cover	e-value	Identidade	Sequências mais similares no banco de dados	Descrição
168A3	100%	0.0	98.08%	<i>Pantoea</i> sp.	LC462185.1
188B	87%	5,00E-134	76%	<i>Staphylococcus</i> sp.	JQ316247.1
18C	99%	0.0	99.18%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
18C2	99%	0.0	99.01%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
192C	100%	0.0	99.59%	<i>Achromobacter</i> sp.	NR_113732.1
193A	97%	0.0	99.79%	<i>Enterobacter</i> sp.	KJ847719.1
195C1	100%	0.0	98.19%	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_024709.1
198A	99%	0.0	99.47%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
199B2	100%	0.0	99.55%	<i>Ochrobactrum</i> sp.	NR_074243.1
20A2	100%	0.0	99.11%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	MN240936.1
212B2	99%	0.0	99.55%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
219B	100%	0.0	99.29%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
225B	99%	0.0	99.37%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
230A	99%	0.0	98.82%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
231B1	100%	0.0	99.32%	<i>Bacillus</i> sp.	MK424276.1
252A	97%	0.0	99.31%	<i>Pantoea</i> sp.	MT779002.1
258A2B	100%	0.0	99.02%	<i>Enterobacter</i> sp.	MT212231.1
270B	50%	3,00E-28	72.71%	<i>Anoxybacillus</i> sp.	CP015438.1
270C	33%	2,00E-15	76%	<i>Rhizobium</i> sp.	AJ784209.1
288A1A	100%	0.0	99.54%	<i>Enterobacter</i> sp.	MT212231.1
288C	97%	0.0	99.05%	<i>Enterobacter</i> sp.	KJ847719.1
289A	4%	0,14	86%	Acidobacteria não cultivada	GU015882.1
294D	100%	0.0	99.71%	<i>Curtobacterium</i> sp.	NR_104839.1
297A	100%	0.0	96.84%	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_024709.1
303A2	100%	0.0	98.11%	<i>Agrobacterium</i> sp.	NR_026519.1
328A	99%	0.0	99.73%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
331A2	100%	0.0	99.09%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
331C	99%	0.0	99.38%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
333A	100%	0.0	99.27%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
333B	100%	0.0	99.54%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
334C1	96%	0.0	99.89%	<i>Pantoea</i> sp.	MT781469.1
335B2	99%	0.0	99.01%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
335C	99%	0.0	98.46%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_136447.1
336A	99%	0.0	99.28%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
338A	100%	0.0	98.64%	<i>Rhizobium</i> sp.	JX678769.2
33D	100%	0.0	99.43%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_044053.1
344B1B	99%	0.0	99.60%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
346A2	100%	0.0	99.36%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
347E	100%	0.0	99.09%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1

Bactéria	Q cover	e-value	Identidade	Sequências mais similares no banco de dados	Descrição
360B	100%	0.0	99.28%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_044053.1
363B	99%	0.0	99.62%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_117406.1
36D	99%	0.0	98.30%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	MN036524.2
374B	97%	0.0	99.90%	<i>Pantoea</i> sp.	MT780130.1
376A	100%	0.0	98.65%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_117406.1
377D	100%	7,00E-111	98.70%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
387B2	100%	0.0	99.71%	<i>Bacillus</i> sp.	MN536904.1
389B	100%	0.0	99.67%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
394D	99%	0.0	99.37%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
396A	100%	0.0	99.44%	<i>Paenibacillus</i> sp.	NR_113748.1
396B	83%	0.0	92.04%	<i>Achromobacter</i> sp.	MN691161.1
399B	100%	0.0	99.72%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
39B	100%	0.0	99.34%	<i>Enterobacter</i> sp.	MG832788.1
400B	97%	0.0	99.79%	<i>Pantoea</i> sp.	MT779002.1
402B	80%	0.0	79.57%	<i>Pseudomonas</i> sp.	JQ659975.1
403B	99%	0.0	99.50%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
410B	84%	0.0	88.34%	<i>Agrobacterium</i> sp.	MK100778.1
413D2	100%	0.0	99.73%	<i>Ochrobactrum</i> sp.	NR_074243.1
415A	100%	0.0	99.17%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
416A	97%	0.0	99.79%	<i>Pantoea</i> sp.	MT779002.1
41C	99%	0.0	98.54%	<i>Enterobacter</i> sp.	MK567957.1
425B	99%	0.0	99.72%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
428A	100%	0.0	99.53%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
432A2	100%	0.0	98.87%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
432D	100%	0.0	99.34%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
5038A	100%	0.0	99.42%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
5057A	100%	0.0	97.86%	<i>Shinella</i> sp.	NR_114067.1
5333A	99%	0.0	99.37%	<i>Achromobacter</i> sp.	NR_117613.1
5358A	100%	0.0	99.07%	<i>Paenibacillus</i> sp.	NR_113748.1
5378EB	100%	0.0	98.77%	<i>Pseudomonas</i> sp.	LC507977.1
5379A	100%	0.0	99.71%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_118008.1
G20	98%	0.0	99.25%	<i>Enterobacter</i> sp.	NR_118568.1
G37B1	100%	0.0	97.22%	<i>Pseudomonas</i> sp.	MH305533.1
N12A	100%	0.0	99.32%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
N13A	100%	0.0	99.73%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
N14D	100%	0.0	99.09%	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_114195.1
N15B1	100%	0.0	97.44%	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_159101.1
N15D	100%	0.0	98.97%	<i>Herbaspirillum</i> sp.	NR_114140.1
N16B	99%	0.0	99.44%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1

Bactéria	Q cover	e-value	Identidade	Sequências mais similares no banco de dados	Descrição
N18A	100%	0.0	98.63%	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_024709.1
N18E	-	-	-	-	-
N1C	100%	0.0	99.63%	<i>Variovorax</i> sp.	NR_134828.1
N21F	100%	0.0	99.34%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	MN036524.2
N22B	100%	0.0	99.34%	<i>Pseudomonas</i> sp.	NR_114195.1
N23B	100%	0.0	99.34%	<i>Pantoea</i> sp.	AB907780.1
N27B	100%	0.0	99.18%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_117406.1
N27D	100%	0.0	97.71%	<i>Pseudomonas</i> sp.	LN551925.1
N28D	100%	0.0	97.81%	<i>Pseudomonas</i> sp.	LN551925.1
N2C	99%	0.0	99.73%	<i>Variovorax</i> sp.	NR_134828.1
N31C	99%	0.0	97.77%	<i>Pseudomonas</i> sp.	LN551925.1
N37C	-	-	-	-	-
N3C	99%	0.0	99.55%	<i>Rhizobium</i> sp.	NR_116874.1
N40E	-	-	-	-	-
N41A	100%	0.0	99.24%	<i>Kosakonia</i> sp.	NR_135211.1
N42A	100%	0.0	98.75%	<i>Agrobacterium</i> sp.	NR_157010.1
N44B2	100%	0.0	99.46%	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	NR_117406.1
N44E	100%	0.0	99.35%	<i>Achromobacter</i> sp.	NR_113732.1
N46D	100%	0.0	98.97%	<i>Serratia</i> sp.	NR_044385.1
N5G	99%	0.0	99.72%	<i>Burkholderia</i> sp.	MH748601.1
N9B	99%	0.0	99.16%	<i>Burkholderia</i> sp.	MH748601.1

Tabela Suplementar 3. Estirpes selecionadas para os testes *in vitro* de promoção de crescimento: crescimento em meio de cultura livre de nitrogênio (FBN), síntese de ácido indolacético (AIA), índice de solubilização de fosfato inorgânico (IS) e sideróforo.

Bactéria	Sequenciada	Local	Parte da planta	NFB	AIA	IS	Sideróforo
5038		Araripina	F	-	95,94	-	+
5068	<i>Enterobacter</i> sp.	Araripina	F	-	19,72	1,60	+
5095	<i>Enterobacter</i> sp.	Araripina	R	-	95,03	3,11	+
5117	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	R	+	110,77	2,49	+
5120	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	R	+	89,53	-	+
5132	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	S	-	25,77	-	-
5155	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	S	+	206,51	-	+
5167		Araripina	C	-	33,50	-	+
5170	<i>Burkholderia</i> sp.	Araripina	C	+	32,97	-	+
5173	<i>Variovorax</i> sp.	Araripina	C	+	20,18	-	+
5177	<i>Agrobacterium</i> sp.	Araripina	C	+	123,91	-	+
5183	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	C	+	118,09	-	+
5193	<i>Pseudomonas</i> sp.	Araripina	C	+	22,92	-	+
5195		Araripina	C	-	7,27	1,90	+
5200	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	C	-	16,92	-	+
5211	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	C	-	38,14	NC	+
5223	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	C	-	76,56	-	-
5225	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	C	-	49,53	NC	+
5226	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	C	-	44,08	NC	+
5227	<i>Pseudomonas</i> sp.	Araripina	C	-	50,49	-	+
5276	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	R	+	205,50	-	-
5287	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	R	-	139,53	-	+
5289		Araripina	R	-	9,09	-	+
5290	<i>Pseudomonas</i> sp.	Araripina	R	-	41,34	NC	+
5297		Araripina	R	-	103,71	-	+
5302	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	R	-	13,68	-	-
5305	<i>Pseudomonas</i> sp.	Araripina	S	+	69,84	-	+
5310	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	S	+	115,69	1,71	+
5333		Araripina	s	+	101,73	-	+
5347	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	R	-	43,57	NC	+
5396	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	R	+	58,14	NC	+
5410	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	R	+	139,47	-	+
121A		Araripina	S	-	94,13	1,10	+
121B1	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Araripina	S	-	12,80	-	-
14C	<i>Variovorax</i> sp.	Gravatá	F	+	20,97	-	+
168A3	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	S	+	117,89	-	+

Bactéria	Sequenciada	Local	Parte da planta	NFB	AIA	IS	Siderofóro
188B	.	Araripina	C	-	10,14	-	-
18C	<i>Rhizobium</i> sp.	Gravatá	F	+	121,99	-	+
18C2	<i>Rhizobium</i> sp.	Gravatá	F	+	122,32	-	+
192C	<i>Achromobacter</i> sp.	Araripina	F	-	4,20	1,89	+
193A	<i>Enterobacter</i> sp.	Araripina	F	-	18,53	-	+
195C1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Araripina	F	-	11,75	1,63	+
198A	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	R	+	120,69	-	+
199B2	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Araripina	R	-	102,38	1,69	+
20A2	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Gravatá	F	+	58,09	-	+
212B2	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	S	-	119,36	-	+
219B	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	C	-	94,43	-	-
225B	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	C	-	98,67	NC	+
230A	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	C	+	133,45	-	+
231B1	<i>Priestia</i> sp.	Araripina	F	-	24,39	-	+
252A	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	F	-	90,77	1,71	+
258A2B	<i>Enterobacter</i> sp.	Araripina	F	+	104,73	-	+
270B		Araripina	C	-	110,84	-	-
270C		Araripina	C	+	109,65	1,24	-
288A1A	<i>Enterobacter</i> sp.	Araripina	C	+	114,61	-	+
288C	<i>Enterobacter</i> sp.	Araripina	C	-	45,97	1,44	-
289A		Araripina	C	-	8,04	1,74	+
294B	<i>Curtobacterium</i> sp.	Araripina	F	-	9,09	-	+
297A	<i>Pseudomonas</i> sp.	Araripina	F	-	20,42	-	+
303A2	<i>Agrobacterium</i> sp.	Araripina	f	-	159,13	NC	+
328A	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	S	+	118,20	-	+
331A2	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	S	+	23,79	-	-
331C	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	S	-	9,53	-	-
333A	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	S	+	123,68	1,84	+
333B	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	S	+	103,77	2,04	+
334C1	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	C	-	80,42	1,70	+
335B2	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	C	+	120,55	-	+
335C	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	C	+	53,08	2,32	-
336A	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	C	+	126,87	-	+
338A	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	C	-	14,03	-	-
33D	<i>Rhizobium</i> sp.	Gravatá	S	-	38,17	-	+
344B	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	C	-	19,91	1,55	+
346A2	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	C	+	106,17	2,03	+
347E	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	C	+	44,16	1,58	+
360B	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	R	-	38,14	-	+

Bactéria	Sequenciada	Local	Parte da planta	NFB	AIA	IS	Siderofóro
363B	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	R	-	25,12	-	+
36D	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Gravatá	S	-	105,63	-	-
374B	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	R	-	12,80	1,80	+
376A	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	F	-	16,57	1,93	+
377D	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	F	-	40,28	2,02	-
387B2	<i>Bacillus</i> sp.	Araripina	F	-	21,93	NC	+
389B	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	F	-	56,57	1,26	+
394D	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	C	+	120,38	-	+
396A	<i>Paenibacillus</i> sp.	Araripina	C	-	68,37	-	+
396B		Araripina	C	-	67,95	1,42	+
399B	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	C	+	100,06	1,85	+
39B	<i>Enterobacter</i> sp.	Gravatá	S	+	126,31	2,02	+
400B	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	C	-	17,06	1,50	-
402B		Araripina	R	+	19,25	1,38	+
403B	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	R	-	99,79	-	+
410B		Araripina	R	+	90,63	-	+
413D2	<i>Ochrobactrum</i> sp.	Araripina	R	-	124,16	2,86	+
415A	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	C	+	95,32	1,27	+
416A	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	R	-	99,23	1,15	-
41C	<i>Enterobacter</i> sp.	Gravatá	S	+	106,39	1,54	+
425B	<i>Rhizobium</i> sp.	Araripina	S	-	212,05	2,13	+
432D	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	S	-	46,03	NC	+
5038A	<i>Pantoea</i> sp.	Araripina	F	-	27,13	-	+
5057A	<i>Shinella</i> sp.	Araripina	F	-	81,47	-	+
5333A	<i>Achromobacter</i> sp.	Araripina	s	+	13,57	-	+
5358A	<i>Paenibacillus</i> sp.	Araripina	S	+	31,05	-	+
5378EB	<i>Pseudomonas</i> sp.	Araripina	C	-	31,26	-	+
5379A	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Araripina	C	-	93,99	1,40	+
G20	<i>Enterobacter</i> sp.	Gravatá	F	+	154,44	2,84	+
G37B1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Gravatá	S	+	53,45	-	+
N12A	<i>Pantoea</i> sp.	Nazaré	C	+	111,48	2,17	+
N13A	<i>Pantoea</i> sp.	Nazaré	C	+	16,70	-	+
N14D	<i>Pseudomonas</i> sp.	Nazaré	F	+	43,94	-	+
N15B1	<i>Pseudomonas</i> sp.	Nazaré	F	+	81,19	1,48	+
N15D	<i>Herbaspirillum</i> sp.	Nazaré	F	+	28,40	-	+
N16B	<i>Rhizobium</i> sp.	Nazaré	F	-	128,96	-	+
N18A	<i>Pseudomonas</i> sp.	Nazaré	F	-	35,43	NC	+
N18E		Nazaré	F	-	19,73	-	+
N1C	<i>Variovorax</i> sp.	Nazaré	EST	+	36,17	-	+

Bactéria	Sequenciada	Local	Parte da planta	NFB	AIA	IS	Siderofóro
N21F	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Nazaré	F	+	61,42	-	+
N22B	<i>Pseudomonas</i> sp.	Nazaré	F	+	38,37	-	+
N23B	<i>Pantoea</i> sp.	Nazaré	F	+	170,58	1,91	+
N27B	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Nazaré	F	-	30,52	-	+
N27D	<i>Pseudomonas</i> sp.	Nazaré	F	+	68,99	-	+
N28D	<i>Pseudomonas</i> sp.	Nazaré	F	+	117,04	-	+
N2C	<i>Variovorax</i> sp.	Nazaré	EST	+	19,44	2,04	+
N31C	<i>Pseudomonas</i> sp.	Nazaré	F	+	85,55	1,59	+
N37C		Nazaré	R	+	66,99	2,48	+
N3C	<i>Rhizobium</i> sp.	Nazaré	EST	-	27,35	1,69	+
N40E		Nazaré	S	+	103,06	3,10	+
N41A	<i>Kosakonia</i> sp.	Nazaré	S	+	67,58	-	+
N42A	<i>Agrobacterium</i> sp.	Nazaré	S	-	206,46	-	+
N44B2	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Nazaré	S	+	101,93	-	+
N44E	<i>Achromobacter</i> sp.	Nazaré	S	+	116,68	-	+
N46D	<i>Serratia</i> sp.	Nazaré	S	+	115,06	-	+
N5G	<i>Burkholderia</i> sp.	Nazaré	C	-	22,27	1,49	+
N9B	<i>Burkholderia</i> sp.	Nazaré	C	-	21,34	2,35	+