

NAYRON VILELA DIOGO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS A
CANA-DE-AÇÚCAR COM POTENCIAL USO BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2021**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

D591i
2021 Diogo, Nayron Vilela, 1994-
Isolamento e caracterização de rizobactérias associadas a cana-de-açúcar com potencial uso biotecnológico / Nayron Vilela Diogo. – Viçosa, MG, 2021.
49 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas.
2. Podridão-vermelha. 3. Cana-de-açúcar - Doenças e pragas - Controle biológico. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 633.61932

Bibliotecário(a) responsável: Alice Regina Pinto Pires CRB6 2523

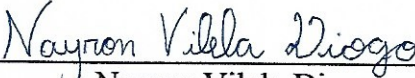
NAYRON VILELA DIOGO

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZOBACTÉRIAS ASSOCIADAS A
CANA-DE-AÇÚCAR COM POTENCIAL USO BIOTECNOLÓGICO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 21 de maio de 2021

Assentimento:



Nayron Vilela Diogo

Autor



Marcio Henrique Pereira Barbosa
Orientador

AGRADECIMENTOS

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

RESUMO

DIOGO, Nayron Vilela, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2021. **Isolamento e caracterização de rizobactérias associadas a cana-de-açúcar com potencial uso biotecnológico.** Orientador: Márcio Henrique Pereira Barbosa.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) com a produção de 642 milhões de toneladas (safra 2019/20). Porém para manter a produção, o país utiliza grande quantidade de fertilizantes químicos provenientes do mercado externo, o que aumenta os custos de produção. Além disso, a monocultura da cana reduz a diversidade de antagonistas do solo favorecendo o aparecimento de doenças, como a podridão vermelha, causada por *Colletotrichum falcatum*. A utilização de microrganismos benéficos pode compor uma alternativa para auxiliar na fertilização da cultura, bem como, no controle biológico de doenças. A rizosfera das plantas abriga uma diversidade de microrganismos que incluem as bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), capazes de realizar a solubilização de fosfato inorgânico (SFI), a produção de ácido-indol-acético (AIA) e de controlar de doenças. Dessa forma, objetivou-se isolar, identificar e selecionar bactérias associadas à cana, que possuam potencial para o uso biotecnológico. Para isso, foram isoladas bactérias da rizosfera de cana e, após a obtenção de culturas puras, realizou-se a extração de DNA, sequenciamento do gene 16S e identificação dos isolados pelo banco de dados NCBI. Posteriormente foram realizados os testes de SFI e produção de AIA. Para o teste de SFI, os isolados foram cultivados por 15 d em meio contendo CaHPO_4 . Para o teste de AIA, os isolados foram cultivados por 24 h em meio TSA 10 % contendo L-triptofano. A capacidade de antagonizar o *C. falcatum* foi avaliada pelo teste de pareamento em meio BDA. Os testes foram realizados em DIC com quatro repetições. Foram obtidos 25 isolados, distribuídos em cinco gêneros: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Kitasatospora* e *Streptomyces*. Dos 25 isolados, 20 (80 %) foram positivos para SFI, sendo que o isolado C10 apresentou maior índice de solubilização (IS = 5,06). Quanto ao AIA, 15 (60 %) isolados foram positivos, sendo que *Burkholderia* sp. (isolado C8) se destacou com produção de $21,38 \mu\text{g mL}^{-1}$. Quanto ao antagonismo, *Streptomyces* sp. (isolado C11) alcançou 55 % de inibição no crescimento do patógeno. Conclui-se que a rizosfera da cana possui BPCV capazes promover a SFI, produzir AIA e promover o controle do *C. falcatum in vitro*, indicando o potencial de uso biotecnológico dos isolados.

Palavras-chave: Promoção de crescimento. Podridão vermelha. Biocontrole.

ABSTRACT

DIOGO, Nayron Vilela, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May 2021. **Isolation and characterization rizobacteria associated with sugarcane with potential biotechnological use.** Adviser: Márcio Henrique Pereira Barbosa.

Brazil is the world's largest producer of sugarcane (*Saccharum* spp.) with a production of 642 million tons (harvest 2019/20). However, to maintain this production, the country uses chemical fertilizers from the foreign market, which increases production costs. In addition, sugarcane monoculture reduces the diversity of soil antagonists, favoring the appearance of diseases, such as red rot, caused by *Colletotrichum falcatum*. The use of beneficial microorganisms can be an alternative to the crop's fertilization and biological control of diseases. The rhizosphere of plants harbors a diversity of microorganisms, including plant growth-promoting bacteria (PGPB) capable of solubilizing inorganic phosphate (ISF), producing indole-acetic acid (IAA), and controlling diseases. Thus, the objective was to isolate, identify and select bacteria associated with sugarcane, which have the potential for biotechnological use. For this, bacteria were isolated from the sugarcane rhizosphere and, after obtaining pure cultures, DNA extraction, 16S gene sequencing, and identification of the isolates were performed using the NCBI database. Subsequently, ISF tests and AIA production were performed. For the ISF test, the isolates were cultured for 15 d in a medium containing CaHPO₄. For the IAA test, the isolates were cultured for 24 h in a 10 % TSA medium containing L-tryptophan. The ability to antagonize *C. falcatum* was evaluated by the pairing test in the BDA medium. The tests were performed in DIC with four repetitions. It was obtained 25 isolates, distributed in five genera, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Kitasatospora*, and *Streptomyces*. Of the 25 isolates, 20 (80 %) were positive for ISF, and isolate C10 had a higher solubilization index (IS = 5.06). As for the IAA, 15 (60 %) isolates were positive, and *Burkholderia* sp. (isolate C8) stood out with a production of 21.38 µg mL⁻¹. As for antagonism, *Streptomyces* sp. (isolate C11) achieved 55 % inhibition of pathogen growth. In conclusion, the sugarcane rhizosphere has PGPB capable of promoting ISF, producing IAA, and promoting the control of *C. falcatum in vitro*, indicating the potential for biotechnological use of the isolates.

Keywords: Growth promotion. Red rot. Biocontrol.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1. Cultura da cana-de-açúcar	10
2.2. Rizosfera e bactérias promotoras de crescimento vegetal	11
2.3. Solubilização de Fosfato Inorgânico (SFI).....	13
2.4. Produção de ácido indol-acético.....	14
2.5. Controle biológico	16
2.6. Controle biológico de <i>Colletotrichum falcatum</i> na cana-de-açúcar	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Obtenção do fitopatógeno.....	19
3.2. Amostragem de solo	19
3.3. Isolamento de rizobactérias	19
3.4. Identificação	20
3.5. Caracterização fisiológica.....	20
3.5.1. Solubilização de fosfato inorgânico (SFI).....	20
3.5.2. Produção de ácido indol-acético (AIA).....	21
3.5.3. Avaliação do potencial antagônico em cultura pareada	21
3.6. Isolados mais promissores	22
3.7. Análises estatísticas	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. Isolamento e identificação	23
4.2. Solubilização de Fosfato inorgânico	24
4.3. Produção de ácido indol-acético (AIA).....	28
4.4. Controle biológico do <i>Colletotrichum falcatum</i>	30

4.5.	Isolados de BPCV mais promissores.....	34
5.	CONCLUSÕES	38
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO GERAL

Devido à crescente preocupação com o desenvolvimento sustentável e o custo do processo de extração e beneficiamento do petróleo, verifica-se a necessidade de buscar fontes de combustíveis renováveis. Nesse contexto, a utilização da cana-de-açúcar se mostra favorável, uma vez que a cultura apresenta grande potencial para a produção de bicompostíveis (CONAB, 2019).

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma planta originária do sudeste da Ásia pertencente à família *Poaceae*, que tem como principais usos a produção de açúcar e etanol (Surendran et al., 2016; Klein et al., 2019). A cana foi introduzida no Brasil pelos portugueses e desde então o país ocupa lugar de destaque no cenário mundial, sendo o principal produtor da commodity. Atualmente a cultura ocupa no país uma área de 8,44 milhões hectares e possui uma produção de 642,7 milhões de toneladas (CONAB, 2020).

Apesar do potencial que a cultura apresenta, para manter a produção elevada, é preciso realizar a aplicação de grande quantidade de fertilizantes químicos. Em média, uma safra de cana-de-açúcar com produtividade de 100 t ha⁻¹ pode remover 200 a 250 Kg de N, 120 a 150 Kg de P e 175 a 225 Kg de K do solo (Surendran et al., 2016). Sabe-se que o mercado interno é incapaz de atender toda a demanda gerada pela agricultura brasileira por esse tipo de produto, sendo necessário, portanto, que o Brasil importe boa parte do adubo mineral utilizado no nosso país (ANDA, 2019), o que resulta no aumento do custo de produção.

Além disso, o modelo de monocultura empregado na produção da cana-de-açúcar reduz a diversidade de microrganismos antagonistas no solo favorecendo o ataque de pragas e doenças, a exemplo da podridão vermelha, causada pelo fungo *Colletotrichum falcatum* (Latz et al., 2012; Jin et al., 2020). A podridão vermelha causa prejuízos pois o patógeno ataca severamente o colmo da cana-de-açúcar, aproveitando-se de aberturas naturais ou das galerias escavadas pela *Diatraea saccharalis* (broca da cana-de-açúcar), o que resulta em perdas de produtividade e qualidade do produto (Pannuti et al., 2013).

O controle dessa doença tem sido uma área de trabalho desafiadora devido ao fato do controle químico apresentar sucesso limitado em condições de campo (Viswanathan e Malathi, 2019). Além disso, o uso indiscriminado de produtos químicos traz prejuízos ao meio ambiente, à saúde humana e dos animais, além de aumentar o custo de produção (Domingues et al., 2004). Assim, torna-se necessária a criação de novas tecnologias que permitam controlar essa doença, bem como reduzir a utilização de fertilizantes químicos no cultivo da cana-de-açúcar e que

sejam sustentáveis tanto do ponto de vista econômico quanto do ponto de vista ambiental e de saúde pública.

Uma alternativa pode ser o uso de produtos biológicos à base de microrganismos promotores do crescimento vegetal. Nos solos, mais especificamente na rizosfera das plantas, existem bactérias capazes de realizar diversos processos ecológicos, sendo que alguns desses processos apresentam interesse agrícola por resultarem em um maior desenvolvimento das culturas. Essas bactérias são conhecidas como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e podem atuar por diferentes mecanismos, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN), a solubilização de nutrientes (principalmente o fósforo), a produção de fitohormônios e o biocontrole de pragas e doenças (Boer et al., 2007; Patel et al., 2019; Lebrazi et al., 2020; Mendoza-Arroyo et al., 2020; Jain et al., 2021). Portanto, a utilização de microrganismos em processos agrícolas pode compor uma excelente alternativa ao uso de pesticidas e fertilizantes químicos (Kuklinsky-Sobral et al., 2004; Estrada et al., 2013; Hungria et al., 2013; Chen et al., 2014).

Assim, o objetivo desse trabalho foi isolar, caracterizar e selecionar bactérias da rizosfera da cana-de-açúcar com potencial para promover o crescimento vegetal e controlar o fungo *Colletotrichum falcatum*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cultura da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma monocotiledônea pertencente à família *Poacea*, que inclui grande número de espécies com elevado interesse agrícola, como o arroz (*Oryza sativa*), o milho (*Zea mays*), o sorgo (*Sorghum bicolor*) e o trigo (*Triticum aestivum*) (Bolot et al., 2009; Davidson et al., 2012). A cana é uma planta originária do sudeste da Ásia pertencente ao gênero *Saccharum*, que compreende várias espécies, das quais pode-se citar *Saccharum officinarum*, *S. robustum*, *S. spontaneum*, *S. sinense* e *S. barberie* (Singh et al., 2017a; Dong et al., 2018). Trata-se de uma cultura perene, que apresenta hábito de crescimento ereto levemente decumbente e desenvolvimento em touceiras podendo atingir de 2 a 5 m de altura. Seu caule apresenta formato cilíndrico com nós e entrenós bem definidos, sendo esse o órgão comercial da cultura, as folhas da cana podem ser alternadas ou opostas, com nervuras paralelinérveas e bainhas largas, podendo atingir até 140 cm de comprimento, o sistema radicular é fasciculado e o fruto é pequeno, do tipo cariopse (Fernandes, 1984).

A cana-de-açúcar possui importância mundial, sendo cultivada em mais de 110 países e o Brasil ocupa lugar de destaque por ser o maior produtor dessa cultura com a área plantada de 8,44 milhões de hectares e produção de 642,7 milhões de toneladas por ano (CONAB 2020). A cana apresenta inúmeras aplicações podendo ser utilizada para alimentação animal e para a fabricação de diversos produtos como etanol, aguardente, melado, açúcar, polietileno e estireno. Além disso, os resíduos da cana-de-açúcar podem ser utilizados como fertilizantes e o bagaço possui potencial para a produção de energia, para a produção do etanol de segunda geração e para a produção de cogumelos comestíveis (Okano et al., 2007; Nunes et al., 2012; Sindhu et al., 2016; Klein et al., 2019).

A cana-de-açúcar tem chamado atenção principalmente devido a sua utilização na produção de biocombustíveis, pois o etanol possui baixo poder poluente e é obtido a partir de uma fonte renovável contribuindo com a sustentabilidade (Santos et al., 2012a; Souza et al., 2014; Yang et al., 2021). Além disso, a indústria sucroalcooleira tem buscado aumentar sua eficiência pela utilização do bagaço para produção de energia, contribuindo assim para ampliar a sustentabilidade do setor (CONAB, 2019). Portanto, para os próximos anos pode-se esperar um cenário bastante favorável ao cultivo da cana no Brasil.

Contudo para manter a produção do país elevada é necessário realizar a aplicação de grandes quantidades de fertilizantes químicos e o mercado interno brasileiro é incapaz de suprir

toda a demanda de fertilizantes gerada pela agricultura, fazendo com que o Brasil importe boa parte do adubo químico utilizado, o que resulta em um aumento significativo no custo de produção (ANDA, 2019). Além disso, o modelo de monocultura atualmente empregado na produção da cana-de-açúcar pode reduzir a diversidade de microrganismos antagonistas no solo favorecendo o ataque de pragas e doenças como o caso da podridão vermelha, causada pelo fungo *Colletotrichum falcatum* (Latz et al., 2012; Jin et al., 2020).

Devido à grande importância do setor canavieiro para economia brasileira somado ao risco que as doenças representam para a cultura, é necessário a criação de novas tecnologias que permitam controlar o ataque de patógenos bem como reduzir a utilização de insumos químicos sem que haja decréscimos na produtividade, tornando assim o cultivo da cana-de-açúcar menos dependente do mercado externo e mais sustentável do ponto de vista ambiental e econômico (Renzi et al., 2019).

Dessa forma a utilização das bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) aparece como alternativa para superar os problemas citados, uma vez que essas bactérias são capazes de realizar processos ecológicos que favorecem a nutrição e a sanidade das plantas (Patel et al., 2019; Mendoza-Arroyo et al., 2020; Jain et al., 2021).

2.2. Rizosfera e bactérias promotoras de crescimento vegetal

A palavra rizosfera deriva dos termos gregos rhizo que significa raiz e esfera que significa área de influência, ou seja, a rizosfera nada mais é que a região que sofre a influência das raízes das plantas (Hiltner, 1904 *apud* Metting, 1993). Essa região é caracterizada pela presença de exsudatos radiculares como, por exemplo, açúcares, aminoácidos, ácidos e outros compostos orgânicos (Curl e Truelove, 2012). Por causa dessas características a rizosfera das plantas apresenta uma intensa atividade microbiana e abriga uma grande quantidade e diversidade de microrganismos, sendo que à medida que nos afastamos das raízes, observa-se normalmente uma redução tanto em quantidade quanto em diversidade de microrganismos presentes naquela região (Papavizas e Davey, 1961; Prashar et al., 2014). Essa diferença na quantidade de microrganismos pode ser evidenciada pelo efeito rizosférico, ou seja, a relação R/S que é a razão entre o número de microrganismos presentes no solo rizosférico (R) e o número de microrganismos presentes no solo não rizosférico (S), cujo valor varia de acordo com os grupos taxonômicos e com as funções que esses microrganismos desempenham deixando claro a influência das raízes na comunidade microbiana presente (Prashar et al., 2014).

Dentre os microrganismos localizados na rizosfera das plantas encontram-se uma ampla gama de bactérias capazes de realizar diversos processos ecológicos, sendo que alguns desses processos possuem elevado interesse agrícola por resultarem em benefícios ao crescimento e a sanidade das plantas favorecendo a adaptação dos vegetais à diferentes ambientes (Trivedi et al., 2020). As rizobactérias capazes de realizar esses processos são conhecidas como bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) e podem atuar por diferentes mecanismos de promoção do crescimento (Lebrazi et al., 2020; Mendoza-Arroyo et al., 2020; Jain et al., 2021).

Algumas BPCV são capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), que consiste na fixação do N atmosférico em formas absorvíveis pelas plantas, são capazes de solubilizar nutrientes, como por exemplo, o fósforo e o potássio, tornando-os disponíveis para as plantas e até mesmo produzir hormônios vegetais relacionados com a regulação do crescimento, como o ácido indol acético (AIA) (Chawngthu et al., 2020; Singh et al., 2020). Estas bactérias também são capazes de reduzir os danos causados por pragas e doenças, seja por competição, pela produção de compostos inibidores ou outros mecanismos, atuando assim como agentes de biocontrole (Gray e Smith, 2005; Manoj et al., 2020).

Estudos têm demonstrado a presença das BPCV colonizando tanto a rizosfera quanto o interior de plantas de cana-de-açúcar. A bactéria endofítica fixadora de nitrogênio *Glucanacetobacter diazotrophicus* foi capaz de induzir respostas de defesa em plantas de cana-de-açúcar contra o ataque da bactéria patogênica *Xanthomonas albilineans* (Arencibia et al., 2006). Bactérias do gênero *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Burkholderia* encontradas em associação com raízes de diferentes variedades de cana-de-açúcar se mostraram capazes de realizar a FBN e de produzir AIA, sendo que a inoculação de *Klebsiella* sp. em plantas de cana-de-açúcar adubadas com 50 % da dose recomendada de N permitiu maior acúmulo de biomassa em comparação com o controle que recebeu 100 % da dose de N (Govindarajan et al., 2007). Da mesma forma a bactéria *Burkholderia tropica* isolada a partir da rizosfera de cana-de-açúcar também se mostrou capaz de promover a FBN *in vitro*, característica que parece ser comum em bactérias desse gênero (Reis et al., 2004). Alguns isolados bacterianos pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Ochrobacterum*, *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* obtidos a partir da rizosfera de cana-de-açúcar foram capazes de produzir AIA e solubilizar fosfato inorgânico *in vitro* (Hassan et al., 2010b). Tudo isso demonstra o potencial biotecnológico das BPCV em serem utilizadas como inoculantes vegetais.

2.3. Solubilização de Fosfato Inorgânico (SFI)

O fósforo é um elemento químico requerido em grandes quantidades pelas plantas sendo classificado como um macronutriente. Este elemento possui importantes funções no metabolismo vegetal atuando na formação de compostos orgânicos e na formação de fosfolípidios de membranas, além disso, o P possui papel na produção de energia, na respiração, divisão celular e em diversos outros processos metabólicos (Singh et al., 2017b; Kaya et al., 2020; Maciel et al., 2020). A limitação desse nutriente pode causar alterações morfológicas nas raízes das plantas, redução da taxa fotossintética, redução da condutância estomática, aparecimento de necroses nas folhas e pecíolos, redução no crescimento e principalmente redução na produtividade das culturas (Zhang et al., 2014; Singh et al., 2017b; Das e Avasthe, 2018; Ramus-Artuso et al., 2018).

O fósforo é comumente encontrado nos solos tanto em formas orgânicas quanto em formas inorgânicas. Esse nutriente pode ser absorvido pelas plantas principalmente em suas formas iônicas H_2PO_4^- (diidrogenofosfato) e HPO_4^{2-} (hidrogenofosfato). Entretanto, como no solo a forma de diidrogenofosfato é normalmente predominante em relação ao hidrogenofosfato essa é a forma mais absorvida pelos vegetais (Richardson et al., 2009; Das e Avasthe, 2018; Muhammad et al., 2021).

Apesar desse elemento ser normalmente encontrado nos solos, o fósforo é considerado um dos nutrientes mais limitantes ao crescimento vegetal (Malavolta, 2006; Yuan e Chen, 2012; Du et al., 2020). Isso ocorre pois em solos ácidos presentes principalmente nas regiões tropicais e subtropicais a concentração das formas disponíveis desse nutriente normalmente é baixa (Malavolta, 2006; Richardson et al., 2009). A baixa concentração de P disponível nos solos se deve ao fato desse elemento apresentar alto potencial de adsorção na matriz do solo, ou seja, o fósforo pode interagir fortemente com componentes do solo resultando na formação de compostos insolúveis e, portanto, indisponíveis para as plantas. Por essa razão, para manter uma alta produção agrícola realiza-se normalmente a aplicação de doses elevadas de adubos fosfatados (Cavagnaro et al., 2015; Roy et al., 2017; Pavinato et al., 2020).

Felizmente a rizosfera das plantas abriga grande quantidade de BPCV capazes de solubilizar fosfato. Essas rizobactérias desempenham importante função para a promoção do crescimento e desenvolvimento das plantas devido a sua capacidade de aumentar a concentração de formas disponíveis de fósforo na solução do solo, permitindo que as raízes absorvam esse nutriente (Santos et al., 2012b; Pande et al., 2017; Mohamed et al., 2018; Mendoza-Arroyo et al., 2020). As BPCV podem promover a solubilização de fósforo atuando

por diversos mecanismos como, por exemplo, a excreção de prótons (H^+), a produção de H_2CO_3 e, principalmente, pela produção de ácidos orgânicos (Pande et al., 2017; Mendoza-Arroyo et al., 2020).

Estudos têm se concentrado na prospecção, isolamento e caracterização de bactérias em associação com os vegetais, sendo assim diversos gêneros de BPCV têm sido descritos na literatura por apresentarem a capacidade de solubilizar fosfato *in vitro* bem como favorecer o crescimento e desenvolvimento de diferentes culturas agrícolas. Algumas bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia* e *Paenibacillus* isoladas a partir de um arrozal apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro* (Chawngthu et al., 2020). Da mesma forma isolados pertencentes aos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia* foram capazes de realizar a SFI *in vitro*, sendo que a inoculação desses isolados em plantas de arroz resultou no aumento do rendimento de grãos de arroz (Estrada et al., 2013). Na rizosfera de plantas de milho foram encontrados isolados bacterianos solubilizadores de P pertencentes aos gêneros *Alcaligenes* e *Burkholderia* que ao serem reinoculados promoveram aumento em todos os parâmetros de crescimento da cultura (Pande et al., 2017). Da maneira semelhante a bactéria *Burkholderia cenocepacia* isolada a partir de raízes de milho também exibiu a capacidade de solubilizar fosfato *in vitro* e ao ser reinoculada na cultura do milho promoveu maior crescimento da cultura (You et al., 2020).

Sendo assim, a inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfato nas plantas pode ser uma boa alternativa tanto do ponto de vista econômico quanto do ponto de vista ambiental, uma vez que esses microrganismos podem reduzir a utilização de fertilizantes fosfatados e conseqüentemente reduzir os custos de produção e os problemas ambientais associados a fertilização química como a eutrofização de rios e lagos.

2.4. Produção de ácido indol-acético

Os hormônios vegetais são compostos que, em baixas concentrações, são capazes de atuar como reguladores, estimulando ou inibindo o crescimento das plantas (Dermastia, 2019). Esses fitohormônios atuam, também, regulando diversos processos fisiológicos relacionados com o desenvolvimento, incluindo a divisão e alongação celular, a senescência e a floração, além disso, os hormônios vegetais podem atuar induzindo respostas das plantas frente a condições adversas, sejam elas de origem biótica ou abiótica (Dermastia, 2019; Jochum et al., 2019; Frankenberger e Arshad, 2020).

Existem diversas classes de hormônios vegetais tais como auxinas, giberelinas e citocininas (Han et al., 2018). O ácido indol-acético (AIA) é um dos principais hormônios vegetais pertencentes à classe das auxinas, sendo esse fitohormônio fundamental no crescimento dos vegetais, por controlar importantes processos, incluindo o aumento e a divisão das células, a formação do tecido vascular e o desenvolvimento do sistema radicular (Zhao, 2010; Zhang et al., 2019).

Apesar do AIA ser um hormônio vegetal, existem microrganismos capazes de sintetizar esse composto, sendo esse um dos mecanismos utilizados pelas BPCV para favorecer o crescimento das plantas (Raut et al., 2017; Wagi e Ahmed, 2019). A síntese do AIA é complexa podendo ocorrer por diferentes vias metabólicas, no entanto podemos destacar as vias dependentes do aminoácido L-triptofano como as principais vias de produção, tanto em bactérias quanto em plantas (Zhao, 2010; Zhang et al., 2019).

Alguns estudos têm demonstrado a capacidade das bactérias em sintetizar não apenas o AIA, mas também outros hormônios vegetais. A produção destes reguladores já foi relatada em alguns gêneros bacterianos comumente encontrados nos solos, como *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Kocuria*, *Rhizobium* e *Pseudomonas* (Hao et al., 2012; Goswami et al., 2014; Tabassum et al., 2017; Saleem et al., 2018). Além disso, a inoculação de microrganismos produtores de AIA, tanto em casa de vegetação quanto em condições de campo, tem se mostrado promissora por resultar em benefícios para o crescimento e desenvolvimento das plantas principalmente quando sujeitas a condições adversas. A bactéria *Leclercia adecarboxylata* isolada a partir da rizosfera de tomateiro apresentou produção significativa de AIA *in vitro* e ao ser reinoculada em plantas de tomate melhorou todos os atributos de crescimento avaliados além de fornecer proteção frente ao estresse salino (Kang et al., 2019). Da mesma forma a bactéria *Mixta theicola* que também apresentou a capacidade de produzir AIA *in vitro* ao ser inoculada em sementes de milho promoveu o aumento da porcentagem de germinação, vigor das sementes, alongamento radicular, além de favorecer o acúmulo de matéria fresca e seca das plantas (Hagaggi e Mohamed, 2020). Em três cultivares de *Buxus sempervirens* a inoculação de um isolado produtor de AIA (*Burkholderia sp.* SSG) resultou no aumento de até 76 % no crescimento das plantas em relação ao controle (Kong e Hong 2020).

Dessa forma, podemos dizer que a inoculação de bactérias capazes de realizar a síntese de AIA em ambientes de cultivo apresenta potencial para melhorar o rendimento das culturas agrícolas, uma vez que essas bactérias são importantes promotoras do crescimento vegetal.

2.5. Controle biológico

Estima-se que até 2050 a população mundial deva ultrapassar 9 bilhões de habitantes (United Nations, 2019), sendo necessário que ocorra um aumento na disponibilidade de alimentos para atender as demandas da população. Uma maneira de alcançar este objetivo é reduzir as perdas que ocorrem na agricultura. Estima-se que as perdas causadas por pragas e doenças em algumas das principais culturas agrícolas encontram-se na faixa de 17 a 30 % (Savary et al., 2019). Sendo assim, a utilização de métodos eficazes para o controle de pragas e de patógenos pode aumentar de maneira significativa a produção de alimentos.

Atualmente, o controle de patógenos na agricultura se dá principalmente por meio da utilização de produtos químicos e do controle cultural utilizando, por exemplo, a rotação de culturas e variedades resistentes. A aplicação de pesticidas possui importância nos modelos de produção, sendo possível por meio dessa prática alcançar alto rendimento e qualidade de produção (Raymaekers et al., 2020). Entretanto, apesar dos benefícios gerados, o uso de pesticidas pode trazer diversos prejuízos como a contaminação de solos, cursos d'água, a contaminação de animais e humanos (Lamichhane et al., 2016; Kim et al., 2017; Pouokam et al., 2017). O uso indiscriminado de produtos químicos pode resultar ainda na seleção de pragas e patógenos resistentes a determinados princípios ativos (Price et al., 2015), bem como aumentar os custos de produção.

Nesse contexto, o biocontrole de doenças aparece como uma alternativa para superar os problemas citados. Esse método pode contribuir para obtenção de produtos de melhor qualidade e, além disso, pode reduzir os custos de produção por ser geralmente mais barato que o controle químico (Parra, 2002).

O controle biológico consiste basicamente na utilização de um organismo para o controle de outro organismo considerado praga ou causador de doença (Raymaekers et al., 2020). Esses organismos que atuam como agentes de biocontrole são comumente encontrados no ambiente e podem atuar por meio de diferentes mecanismos: Antibiose, competição, parasitismo, predação e indução de resistência sistêmica (Dukare et al., 2019; Köhl et al., 2019; Wang et al 2020). O conhecimento dos mecanismos de controle pode auxiliar na escolha da melhor estratégia para utilização desses organismos em termos da quantidade, época e forma de aplicação.

Sabe-se que existem uma ampla gama de BPCV em associação com as culturas agrícolas que possuem potencial para promover o biocontrole de diversas doenças. Sendo assim, alguns

estudos têm se concentrado em avaliar e selecionar isolados bacterianos visando a aplicação na agricultura (Ding et al., 2017; Xiang et al., 2017; El-Shabrawy e Shehata, 2018; Dukare et al., 2020). No Brasil, os estudos envolvendo a utilização de bactérias antagonistas para o controle de doenças tiveram destaque a partir da década de 90 (Bettiol, 1997; Mariano et al., 2004). Desde então, trabalhos têm buscado entender e avaliar a capacidade das bactérias em promover o controle biológico de diferentes doenças na agricultura, a exemplo da murcha bacteriana causada por *Pseudomonas solanacearum* (Peixoto, 1997), da queda prematura dos frutos cítricos causada por *Colletotrichum acutatum* (Kupper et al., 2003), da queima-das-bainhas do arroz causada por *Rhizoctonia solani* (Ludwig & Moura, 2007), da murcha bacteriana causada por *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Martins et al., 2013) e da antracnose causada por *Colletotrichum musae* (Damasceno et al., 2019).

2.6. Controle biológico de *Colletotrichum falcatum* na cana-de-açúcar

A podridão vermelha causada pelo fungo *Colletotrichum falcatum* é um problema na cultura da cana-de-açúcar e causa sérios prejuízos ao cultivo dessa cultura em todo o mundo (Viswanathan e Malathi, 2019). Esse patógeno ataca a cana desde o início do seu desenvolvimento, causando falha na germinação ou a morte de mudas germinadas, além disso, *C. falcutum* pode causar a inversão de sacarose em glicose e frutose, devido à produção de invertases, o que resulta em perdas no rendimento da cultura e na qualidade do açúcar (Viswanathan e Samiyappan, 2002; Pannuti et al., 2013).

O controle da podridão-vermelha tem sido uma área de trabalho desafiadora para fitopatologistas e produtores de cana-de-açúcar. Vários fungicidas têm sido testados para o controle dessa doença, mas o sucesso tem sido limitado em condições de campo, provavelmente pelo fato do fungo se alojar profundamente no colmo dificultando a ação dos fungicidas, não sendo, portanto, produtos químicos recomendados para o controle dessa doença em cana-de-açúcar (Viswanathan e Malathi, 2019). Além disso, embora a seleção de variedades resistentes forneça proteção durável, o desenvolvimento frequente de novas cepas de patógeno da podridão vermelha torna as variedades suscetíveis no campo (Viswanathan et al., 2017).

Assim, o controle da podridão-vermelha por meio de antagonistas pode ser uma estratégia interessante ou, pelo menos, um componente do manejo integrado da doença na cana-de-açúcar. O sucesso na utilização de bactérias para o biocontrole de fungos do gênero *Colletotrichum* spp. têm sido demonstrado. Isolados de *Bacillus subtilis* e de *B. thuringiensis*

provocaram inibição *in vitro* ao crescimento micelial do fungo patogênico *C. acutatum*, por meio da produção de metabólitos antimicrobianos (Kupper et al., 2003). Da mesma forma, isolados de *Pseudomonas* spp. foram capazes de induzir a resistência sistêmica contra o *C. falcatum* em cinco variedades de cana-de-açúcar em condições de campo (Viswanathan e Samiyappan, 2002).

Considerando-se que a cana-de-açúcar é amplamente cultivada, sendo responsável por contribuir para aumentar o PIB brasileiro (CONAB, 2020), a utilização do controle biológico pode ser vantajosa do ponto de vista financeiro, uma vez que pequenos ganhos em produtividade podem resultar em um grande aumento na produção. Além disso, o MAPA lançou recentemente o decreto 10.375, de 26 de maio de 2020, que estimula e dispõe sobre o registro de produtos microbiológicos que tenham função de agrotóxicos e afins (Brasil, 2020). Assim, nos próximos anos espera-se que ocorra um incremento no uso de produtos à base de microrganismos e, portanto, nota-se uma oportunidade no desenvolvimento desse tipo de produto.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Departamento de Agronomia (DAA) e no Laboratório de Associações Micorrízicas (LAMIC) do Departamento de Microbiologia (DMB), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa – MG.

3.1. Obtenção do fitopatógeno

O isolado do fungo *Colletotrichum falcatum* foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras – MG.

3.2. Amostragem de solo

A amostragem de solo foi realizada em uma área de cultivo de cana-de-açúcar pertencente a empresa Agropeu-Agroindustrial Pompeu S/A, localizada no município de Pompéu – MG (19°20'53.7"S, 45°00'29.7"W). Foram amostrados quatro talhões, sendo que em cada um deles coletou-se, de forma aleatória, amostras de solo rizosférico de cinco plantas de cana-de-açúcar. As cinco amostras de solo obtidas em cada talhão foram peneiradas e homogeneizadas dando origem a uma amostra composta por área. Essas amostras foram refrigeradas e transportadas até o laboratório sob condições de refrigeração e armazenadas em geladeira até o processamento.

3.3. Isolamento de rizobactérias

Para o isolamento das rizobactérias 10 g de solo da rizosfera da cana-de-açúcar foram colocadas em frascos Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina (0,85 % de NaCl). A solução contendo o solo foi mantida sob agitação por 5 min, em temperatura ambiente. Posteriormente, uma alíquota de 1 mL da solução foi pipetada para um tubo de cultura contendo 9 mL de solução salina, em seguida esta solução foi homogeneizada em agitador tipo vortex. Esse procedimento foi repetido até a obtenção da diluição de 10^{-6} , compondo assim a diluição seriada. Uma vez alcançada a diluição de 10^{-6} , uma alíquota de 0,1 mL foi retirada e pipetada em uma placa de Petri contendo o meio de cultura batata dextrose ágar (BDA). Em seguida, com auxílio de uma alça de Drigalsky, a suspensão contendo os microrganismos foi espalhada

na superfície da placa de Petri que foi incubada a 25 °C até a formação de colônias bacterianas visíveis.

Para a obtenção de culturas puras as diferentes colônias obtidas foram reisoladas pelo método de estrias simples, por repetidas vezes, em placa de Petri contendo BDA. Após a obtenção das culturas puras, os isolados bacterianos foram armazenados em meio NBY (nutrient broth yeast extract) (Schaad, 1998) contendo glicerol a uma temperatura de -80 °C para preservação, onde permaneceram até a identificação e caracterização fisiológica.

3.4. Identificação

Para a identificação molecular, os isolados que estavam armazenados foram reativados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA. Após o crescimento, o DNA dos isolados foi extraído utilizando o kit de extração de DNA Núcleo Spin Soil (Macherey-Nagel, GmbH & Co. KG, Alemanha) conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, para amplificação do gene 16S foi realizada uma PCR utilizando os *primers* 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (5' ACGGCTACCTTGTTACGACTT) (Lane,1991). Após a amplificação e sequenciamento do gene 16S, o gênero dos isolados foi identificado por meio da consulta de similaridade de nucleotídeos com sequências depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

3.5. Caracterização fisiológica

3.5.1. Solubilização de fosfato inorgânico (SFI)

Para o teste de solubilização de fosfato inorgânico, os isolados bacterianos foram crescidos em placa de Petri contendo o meio de fosfato de cálcio insolúvel na forma de $\text{Ca}_3(\text{HPO}_4)_2$, sendo que cada placa recebeu um isolado em quatro pontos distintos representando quatro repetições. Após a inoculação, as placas contendo as bactérias foram incubadas a 25 °C por um período de 15 dias para a observação do halo de solubilização (Berraquero et al. 1976). Ao final do teste os isolados foram classificados como precoces ou tardios, sendo precoces aqueles nos quais o aparecimento do halo de solubilização se deu até o terceiro dia de cultivo e, tardios aqueles que o halo de solubilização apareceu somente a partir do quarto dia (Hara e Oliveira, 2005). Além disso foi realizado o cálculo do índice de solubilização (IS) utilizando a fórmula: $\text{IS} = \text{diâmetro do halo de solubilização (mm)} / \text{diâmetro da colônia (mm)}$. O

experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições.

3.5.2. Produção de Ácido indol-acético (AIA)

Para a avaliação da capacidade de produzir AIA, os isolados bacterianos foram inoculados em tubos de cultura contendo meio líquido TSA 10 % na presença do aminoácido L-triptofano (5 mM) e incubados no escuro a 28 °C por 24 horas e mantidos sob agitação constante (120 rpm). Após esta etapa realizou-se a centrifugação das amostras a 12.000 rpm por 5 min e 900 µL do sobrenadante foram transferidos a um novo tubo onde foram adicionados 400 µL do reagente de Salkowski (Bric et al., 1991). Em seguida, as amostras foram incubadas no escuro por 30 min a temperatura ambiente e após esta etapa, a quantificação da concentração de AIA presente nas amostras foi realizada pela leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. As leituras foram normalizadas mediante a calibração de uma curva padrão utilizando diferentes concentrações de AIA comercial. O experimento seguiu o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições por tratamento.

3.5.3. Avaliação do potencial antagonístico em cultura pareada

Para a avaliação da atividade antagonística dos isolados contra *C. falcatum* foi realizado o teste de pareamento direto em placa de Petri, onde cada isolado bacteriano foi inoculado juntamente com o fungo fitopatogênico, em placas contendo o meio de cultura BDA conforme descrito por Patel e colaboradores (2019) com alterações. Para isso, as bactérias foram estriadas em linha única a uma distância de 1,0 cm da borda da placa. Da mesma forma, um disco de BDA de aproximadamente 7 mm de diâmetro contendo micélio do fungo *C. falcatum* foi inoculado na outra extremidade da placa de Petri, também à uma distância de 1,0 cm da borda. O tratamento controle foi constituído do patógeno crescendo na ausência da bactéria antagonista. As placas foram incubadas por 10 dias a 25 °C em incubadora BOD.

Após o período de incubação as placas foram fotografadas utilizando uma câmera digital e as imagens obtidas foram analisadas com auxílio do software Quant v. 1.01 (Vale et al., 2001) para mensurar o crescimento (cm²) do patógeno *C. falcatum*. A inibição do crescimento do patógeno em relação ao controle foi avaliada por meio da seguinte fórmula: $ICF (\%) = [(CFC - CFT) / CFC] \times 100$. Sendo que ICF é a inibição do crescimento do fungo, CFC é o crescimento do fungo no controle e CFT é o crescimento do fungo nos tratamentos (Patel et al., 2019).

3.6. Isolados mais promissores

De acordo com os resultados obtidos nos testes de SFI, produção de AIA e no teste de antagonismo por pareamento em placa de Petri, avaliou-se quais isolados se mostravam mais promissores para a aplicação biotecnológica visando a promoção do crescimento de culturas agrícolas com o foco principal em cana-de-açúcar.

3.7. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Os dados que não atenderam aos pressupostos da ANOVA foram submetidos ao teste de Kruskal-Walis ($p < 0,01$). Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico R (R Core Team 2018).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e identificação

Foram obtidos 25 isolados associados a rizosfera de plantas de cana-de-açúcar e após a amplificação e sequenciamento do gene 16S, o gênero dos isolados foram identificados por meio do BLAST, com base no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Tabela 1). Foram identificados cinco gêneros de bactérias, a saber, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Kitasatospora* e *Streptomyces*, além de dois isolados que não foram possíveis de serem identificados pela metodologia utilizada (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolados bacterianos associados a rizosfera de plantas de cana-de-açúcar.

Isolados	Identificação
C1	<i>Bacillus</i> sp.
C2	<i>Bacillus</i> sp.
C3	<i>Bacillus</i> sp.
C4	<i>Bacillus</i> sp.
C5	<i>Bacillus</i> sp.
C6	<i>Bacillus</i> sp.
C7	<i>Bacillus</i> sp.
C8	<i>Burkholderia</i> sp.
C9	Sp 9
C10	Sp 10
C11	<i>Streptomyces</i> sp.
C12	<i>Arthrobacter</i> sp.
C13	<i>Arthrobacter</i> sp.
C14	<i>Arthrobacter</i> sp.
C15	<i>Arthrobacter</i> sp.
C16	<i>Arthrobacter</i> sp.
C17	<i>Streptomyces</i> sp.
C18	<i>Arthrobacter</i> sp.
C19	<i>Kitasatospora</i> sp.
C20	<i>Bacillus</i> sp.
C21	<i>Arthrobacter</i> sp.
C22	<i>Streptomyces</i> sp.
C23	<i>Arthrobacter</i> sp.
C24	<i>Streptomyces</i> sp.
C25	<i>Streptomyces</i> sp.

Os gêneros *Bacillus*, *Burkholderia* e *Streptomyces* têm sido comumente relatados na literatura em associação com diferentes espécies de plantas, incluindo a cana-de-açúcar e outras gramíneas como promissores promotores de crescimento de vegetal (Costa et al., 2013; Oliveira et al., 2016; Hayat et al., 2020; You et al., 2020). *Bacillus* spp. em associação com leguminosas

promoveu aumento do comprimento e da massa seca da plântula e da raiz, beneficiando o crescimento da planta mediante a produção de fitohormônios (Oliveira et al., 2016). Na cultura da cana-de-açúcar a associação com *Bacillus* spp. resultou no aumento do comprimento da parte aérea e da raiz, aumento na massa fresca e seca das plantas, maior conteúdo de proteína e diversos outros importantes atributos fisiológicos (Chandra et al., 2018).

O gênero *Burkholderia* vem sendo relatado em associação com várias plantas, incluindo as gramíneas (Reis et al., 2004; Estrada et al., 2013; You et al., 2020). Esse gênero apresenta um metabolismo muito diverso conferindo a capacidade de atuar na promoção do crescimento vegetal por importantes mecanismos tais como a produção de AIA, fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e produção de sideróforos (Kong e Hong, 2020). Em cana-de-açúcar, a associação com bactérias pertencentes a esse gênero pode resultar em benefícios favorecendo o aumento da concentração de nitrogênio nas raízes e tecidos além do aumento do crescimento da cana (Paungfoo-Lonhienne et al., 2016).

Streptomyces, que pertence ao filo das actinobactérias, apresenta grande potencial para a promoção do crescimento vegetal e para o biocontrole de doenças (Suárez-Moreno et al., 2019). Sendo que alguns isolados bacterianos pertencentes a esse gênero apresentam a capacidade de empregar diferentes mecanismos para promover o crescimento das plantas como a produção de AIA, a produção de sideróforos e a antibiose (Kaur et al., 2019). Na cultura da cana-de-açúcar, a associação com a bactéria *Streptomyces chartreusis* favoreceu o crescimento das plantas em condições de estresse hídrico, sendo que essa bactéria foi capaz de atuar por diferentes mecanismos, como por exemplo a produção de hormônios vegetais e como consequência promoveu o alongamento das raízes e aumentou a absorção de água (Wang et al 2019).

4.2. Solubilização de Fosfato inorgânico

Dos 25 isolados encontrados na rizosfera da cana-de-açúcar, 20 (80 %) foram capazes de solubilizar fosfato (Tabela 2) representado pela formação do halo de solubilização ao redor das colônias (Figura 1). O aparecimento da região translúcida ao redor das colônias bacterianas ocorre devido a transformação do fosfato de cálcio da forma insolúvel para formas solúveis. Essa transformação pode ser resultado da excreção de prótons (H^+), da produção de H_2CO_3 e principalmente da produção de ácidos orgânicos (Pande et al., 2017; Mendoza-Arroyo et al., 2020). Na rizosfera de cana-de-açúcar parece ser comum encontrar bactérias solubilizadoras de fosfato, pois de 30 isolados bacterianos encontrados em associação com essa cultura, 90 % apresentavam esta capacidade (Santos et al., 2012b).

Tabela 2 – Classificação de bactérias isoladas da rizosfera de cana-de-açúcar em precoces ou tardias de acordo com o tempo de aparecimento do halo.

Isolado	Início da solubilização (dias)	Classificação
<i>Bacillus</i> sp. (C1)	2	Precoce
<i>Bacillus</i> sp. (C2)	2	Precoce
<i>Bacillus</i> sp. (C3)	2	Precoce
<i>Bacillus</i> sp. (C4)	2	Precoce
<i>Bacillus</i> sp. (C5)	2	Precoce
<i>Bacillus</i> sp. (C6)	2	Precoce
<i>Bacillus</i> sp. (C7)	2	Precoce
<i>Burkholderia</i> sp. (C8)	1	Precoce
Sp. 10	3	Precoce
<i>Streptomyces</i> sp. (C11)	8	Tardia
<i>Arthrobacter</i> sp. (C12)	2	Precoce
<i>Arthrobacter</i> sp. (C13)	2	Precoce
<i>Arthrobacter</i> sp. (C14)	2	Precoce
<i>Arthrobacter</i> sp. (C15)	3	Precoce
<i>Arthrobacter</i> sp. (C16)	2	Precoce
<i>Streptomyces</i> sp. (C17)	2	Precoce
<i>Arthrobacter</i> sp. (C18)	8	Tardia
<i>Kitasatospora</i> sp. (C19)	1	Precoce
<i>Arthrobacter</i> sp. (C21)	4	Tardia
<i>Streptomyces</i> sp. (C24)	5	Tardia

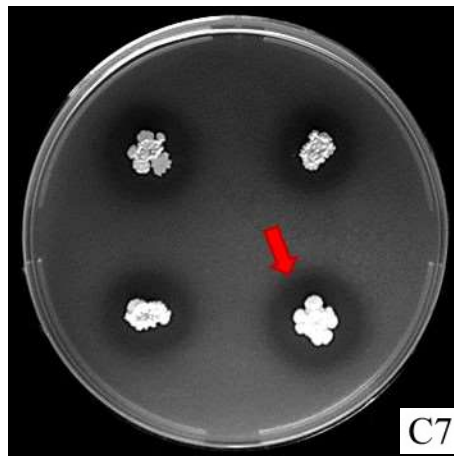


Figura 1 – Formação do halo de solubilização (região translúcida) ao redor das colônias bacterianas, mostrando a capacidade desse isolado em solubilizar fosfato de cálcio.

Dos 20 isolados bacterianos positivos para o teste de solubilização de fosfato inorgânico, 16 foram classificados como precoces e apenas quatro foram classificados como tardios em relação ao tempo (dias) de aparecimento do halo de solubilização (Tabela 2). Sendo que o tempo

de aparecimento do halo de solubilização variou de 1 até 8 dias após a inoculação dos isolados em meio de cultura.

O fato de um isolado bacteriano ser considerado precoce para o teste de SFI indica que esse microrganismo poderia estar apto a solubilizar fosfato inorgânico já nos primeiros dias após a sua inoculação e, como consequência disso, melhorar a nutrição e o crescimento dos vegetais, enquanto que no caso das tardias o mesmo só ocorreria em um segundo momento. Portanto a seleção de bactérias precoces pode ser mais vantajosa do que a seleção de bactérias tardias.

quanto ao índice de solubilização de fosfato, após 15 dias de cultivo (IS final), uma expressiva variabilidade foi observada. O IS final dos isolados bacterianos variou de 1,51 até 5,06 (Figura 2).

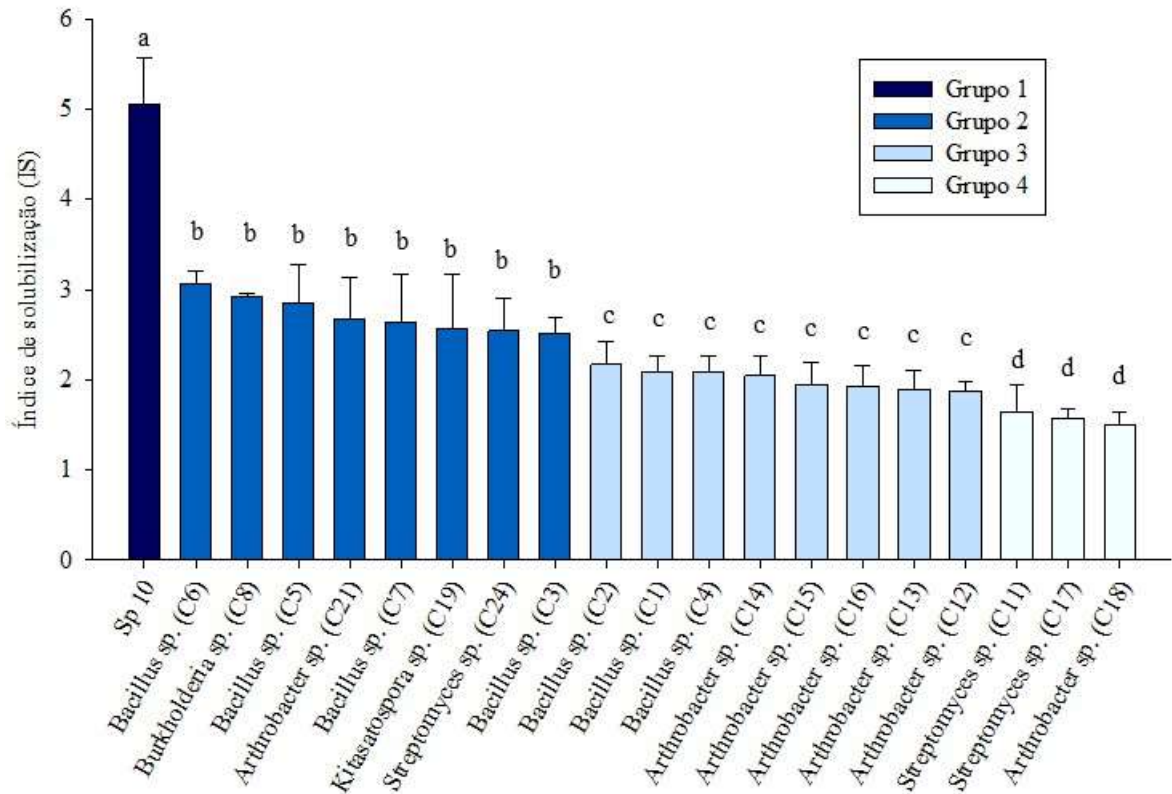


Figura 2 – Índice de solubilização (IS) final por bactérias isoladas de solo rizosférico de cana-de-açúcar. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Pode-se observar a formação de quatro grupos distintos de bactérias solubilizadoras (Figura 2). O primeiro grupo é composto apenas pelo isolado C10, cujo gênero ainda não pôde ser identificado, esse isolado se destacou por apresentar o maior IS final (5,06) e por ser

considerado um isolado precoce. O IS observado foi superior ao encontrado em isolados de tomate (2,8 a 3,2), em isolados de sorgo (1,23 a 1,75), em isolados de milho (4,48 a 4,88) e em um isolado do ambiente (2,85) (Chandrasekeran e Mahaligam, 2014; Pande et al., 2017; Paul e Sinha, 2017; Mohamed et al., 2018), demonstrando que o isolado C10 apresenta grande potencial biotecnológico. O segundo grupo de bactérias é composto por oito isolados que apresentaram IS variando entre 2,52 até 3,07, o terceiro grupo é composto por oito isolados com IS variando entre 1,88 a 2,17 e o quarto grupo é composto por três isolados que apresentaram os menores IS de 1,51 a 1,65 (Figura 2). Estes valores são próximos aos encontrados por outros autores para isolados associados a cana-de-açúcar, que apresentaram IS variando de 1,00 a 3,48 (Santos et al., 2012b).

De modo geral podemos dizer que os isolados pertencentes ao primeiro (C10) e ao segundo grupo (C6, C8, C5, C21, C7, C19, C24 e C3) apresentaram IS igual ou superior aos encontrados pela maioria dos autores mencionados acima o que indica o potencial dessas bactérias em promover o crescimento vegetal mediante a solubilização de fosfato. Esse é um resultado interessante pois no caso da cultura da cana-de-açúcar, que extrai do solo quantidades significativas de P (Surendran et al., 2016), a seleção de bactérias solubilizadoras que possam ser utilizadas como inoculantes pode ser de grande importância.

Além disso, com exceção dos isolados C24 e C21, todos os demais representantes do primeiro e segundo grupo foram classificados como solubilizadores precoces (Tabela 2), e o fato de um isolado apresentar a capacidade de solubilizar o fosfato já nos primeiros dias após sua inoculação, bem como a capacidade de manter o índice de solubilização elevado até 15º dia, pode ser importante do ponto de vista biotecnológico para manter o fósforo disponível para as plantas em um momento inicial e em um segundo momento no qual as reservas da plântula poderiam estar se esgotando.

Dentre os isolados mais promissores para o teste de solubilização de fosfato inorgânico, quatro (C3, C5, C6 e C7) pertencem ao gênero *Bacillus*. Esse gênero é comumente relatado como um excelente promotor de crescimento de vegetal (Oliveira et al., 2016; Mohamed et al., 2018), sendo que a espécie *Bacillus megaterium* foi capaz de favorecer o crescimento de plantas de mostarda atuando por meio solubilização de fosfato e de outros mecanismos (Kang et al., 2014). O isolado C8, que também se destacou, pertence ao gênero *Burkholderia*, que é relatado como um excelente solubilizador de fosfato (Kong e Hong, 2020), sendo que a bactéria *Burkholderia cenocepacia* promoveu maior crescimento da cultura do milho mediante à

solubilização de fosfato inorgânico o que demonstra a importância desse mecanismo para a promoção do crescimento das culturas agrícolas (You et al., 2020).

4.3. Produção de ácido indol-acético (AIA)

Das 25 bactérias avaliadas quanto a produção de AIA, 15 (60%) se mostraram capazes de produzir esse fitohormônio *in vitro* após 24h de incubação, cuja produção variou de 0,99 até 21,38 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3). A quantificação do ácido indol acético se deu por meio da reação colorimétrica com o reagente de Salkowisk, que promoveu o aparecimento de uma coloração avermelhada variando de intensidade de acordo com as concentrações de AIA produzido (Figura 4).

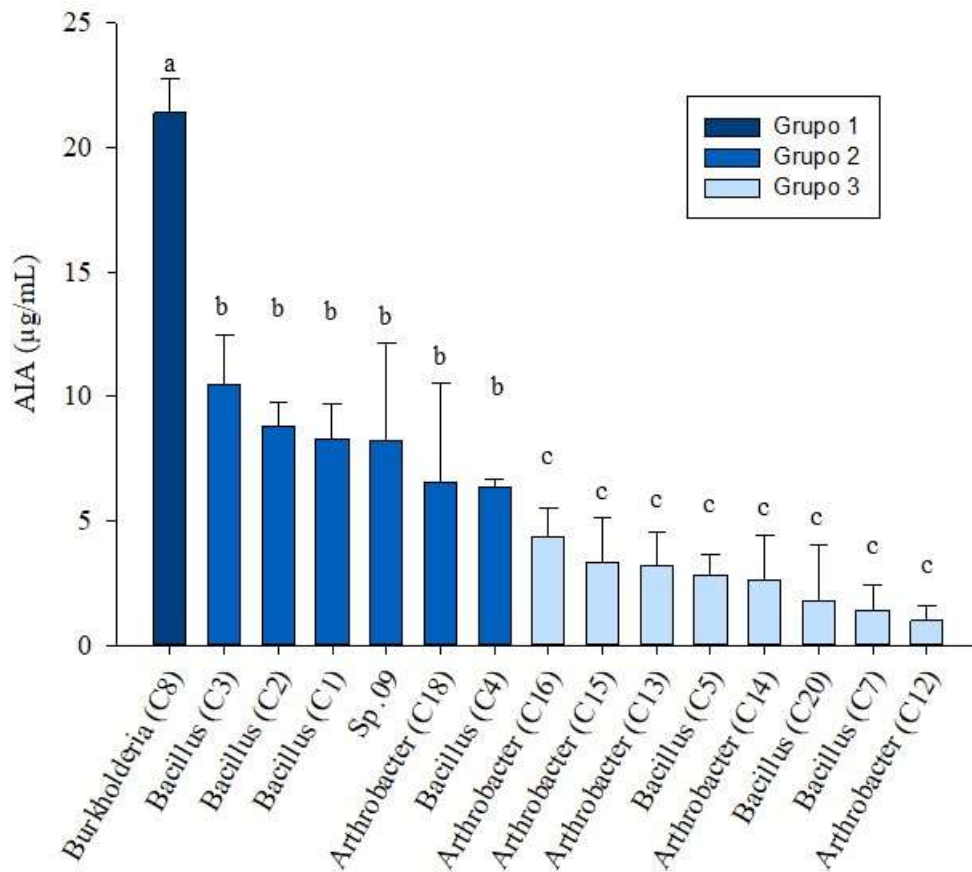


Figura 3 - Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de AIA produzido por bactérias isoladas de solo rizosférico de cana-de-açúcar. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott ($p < 0,05$).

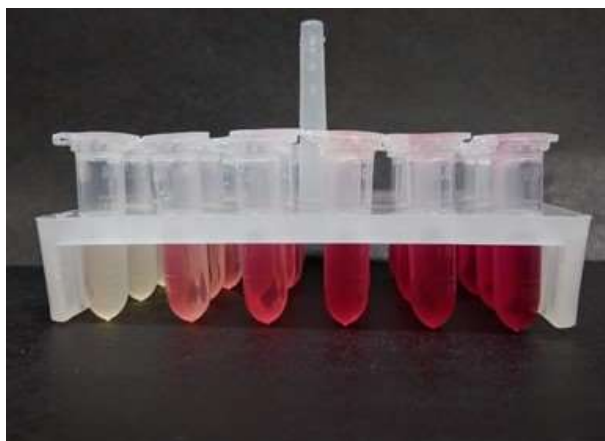


Figura 4 – Gradiente de coloração (tons de vermelho) formado devido a reação colorimétrica do reagente de Salkowski na presença de concentrações crescentes de ácido indol acético.

Podemos observar a formação de três grupos distintos de bactérias produtoras de AIA (Figura 3). O primeiro grupo é composto apenas pelo isolado C8 pertencente ao gênero *Burkholderia* que se destacou por apresentar a maior concentração de AIA ($21,38 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esse valor é superior ao observado na bactéria *Leclercia adecarboxylata* que apresentou a produção de $9,815 \mu\text{g mL}^{-1}$ e em bactérias do gênero *Streptomyces* que apresentaram produção variando entre $4,07$ e $7,98 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 96 h de cultivo (Kang et al., 2019; Suárez-Moreno et al., 2019), indicando assim, o potencial do isolado C8 em promover o crescimento vegetal mediante a produção de AIA. O segundo grupo de bactérias é composto por seis isolados, os quais apresentaram concentrações de AIA produzido variando de $6,35$ a $10,43 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o terceiro grupo de bactérias é composto por oito isolados que apresentaram as menores concentrações de AIA produzido variando de $0,99$ a $4,35 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 3). Esses valores estão próximos aos encontrados em *Burkholderia* que foi capaz de produzir doses de AIA que variaram de $2,9$ a $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ após 72 h de cultivo (Kong e Hong, 2020).

Portanto, podemos observar que os isolados pertencentes ao primeiro grupo (C8) bem como os isolados pertencentes ao segundo grupo (C4, C18, C9, C1, C2 e C3) são eficientes produtores de AIA, apresentando valores semelhantes ou superiores aos encontrados pelos autores citados anteriormente. No entanto, é importante salientar que a comparação de resultados com outros estudos nem sempre é uma tarefa fácil, pois a produção de AIA está relacionada a diversos fatores que podem influenciar a dose produzida, tais como o tempo de incubação, temperatura e a composição do meio de cultura (You et al., 2020). Nós avaliamos a produção de AIA após 24h de incubação, no entanto existem trabalhos que avaliam a produção após 42, 72, 96 e até 120 horas, assim é possível que os isolados assumam valores superiores

ao serem incubados por um período maior.

Dentre os isolados promissores para o teste de AIA, boa parte (C1, C2, C3 e C4) pertencem ao gênero *Bacillus* e o isolado mais promissor (C8) pertence ao gênero *Burkholderia*. Esses resultados confirmam a diversidade metabólica bem como o potencial descrito por outros autores quanto à capacidade desses dois gêneros de bactérias atuarem por diferentes mecanismos de promoção do crescimento vegetal (Oliveira et al., 2016; Wagi e Ahmed, 2019; Kong e Hong, 2020).

4.4. Controle biológico do *Colletotrichum falcatum*

Dos 25 isolados bacterianos avaliados, oito apresentaram porcentagem de inibição inferior a 10 %, dez isolados apresentaram porcentagem de inibição entre 10 e 20 %; seis apresentaram porcentagem de inibição entre 20 e 30 % e o destaque foi o isolado C11 que apresentou porcentagem de inibição de 55,1 % (Tabela 3).

Tabela 3 - Porcentagem de inibição ao crescimento do fungo *Colletotricum falcatum* por bactérias isoladas de solo rizosférico de cana-de-açúcar. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Kruskal-wallis ($p < 0,01$).

Tratamento	Inibição (%)	
<i>Streptomyces</i> (C11)	55,1	a
<i>Streptomyces</i> (C22)	29,5	ab
<i>Kitasatospora</i> (C19)	27,2	ab
<i>Streptomyces</i> (C25)	25,8	ab
<i>Burkholderia</i> (C8)	24,1	abc
<i>Streptomyces</i> (C24)	24,2	abc
<i>Streptomyces</i> (C17)	20,5	abcd
<i>Arthrobacter</i> (C21)	18,7	bcde
<i>Bacillus</i> (C3)	17,8	bcdef
<i>Arthrobacter</i> (C16)	19,0	bcdefg
Sp. 10	14,02	bcdefgh
<i>Bacillus</i> (C6)	12,78	cdefgh
<i>Arthrobacter</i> (C14)	12,75	cdefgh
<i>Arthrobacter</i> (C12)	11,7	cdefghi
<i>Arthrobacter</i> (C23)	12,2	cdefghi
<i>Arthrobacter</i> (C13)	11,3	defghij
<i>Bacillus</i> (C5)	10,2	defghij
<i>Bacillus</i> (C7)	8,9	defghij
<i>Bacillus</i> (C2)	6,7	efghij
<i>Arthrobacter</i> (C15)	6,0	fghij
<i>Bacillus</i> (C4)	4,8	ghij
<i>Arthrobacter</i> (C18)	4,8	hij
<i>Bacillus</i> (C1)	1,4	ij
Sp. 09	1,1	j
<i>Bacillus</i> (C20)	1,0	j

A inibição máxima encontrada foi semelhante a observada nas bactérias *Bacillus* sp., *Ochrobactrum intermedium* e *Escherichia* sp. que apresentaram respectivamente as inibições de 53 %, 61,18 % e 61,11 % ao crescimento micelial do fungo *C. falcatum in vitro* (Hassan et al., 2010a; Patel et al., 2019).

A supressão de doenças por bactérias antagonistas pode ocorrer por diversos mecanismos de biocontrole, sendo um desses mecanismos a indução da resistência sistêmica (IRS) nas plantas (Freimoser et al., 2019). No entanto, no teste de pareamento direto em placa de Petri o efeito da IRS não é evidenciado. Sendo assim, podemos dizer que os diferentes níveis de supressão ao *C. falcatum* observados neste estudo podem estar relacionados principalmente a produção de metabólitos pelos isolados antagonistas e pela competição.

Ainda quanto a porcentagem de inibição, os isolados bacterianos avaliados podem ser divididos em três grupos principais de bactérias antagonistas (figura 5 e figura 6). O primeiro

grupo de bactérias é composto pelo isolado C11 que apresentou a maior porcentagem de inibição ao crescimento do *C. falcatum* e todos os outros isolados que não diferiram desse tratamento (C19, C25, C22, C8, C24 e C17), o segundo grupo é composto pelos isolados intermediários (C3, C16, C10, C6, C14, C12 e C23) e o terceiro grupo de bactérias é composto pelo isolado C20 apresentou a menor inibição ao crescimento do *C. falcatum* e todos aqueles isolados que não diferiram estatisticamente desse tratamento (C13, C5, C7, C2, C15, C4, C18, C1 e C9).

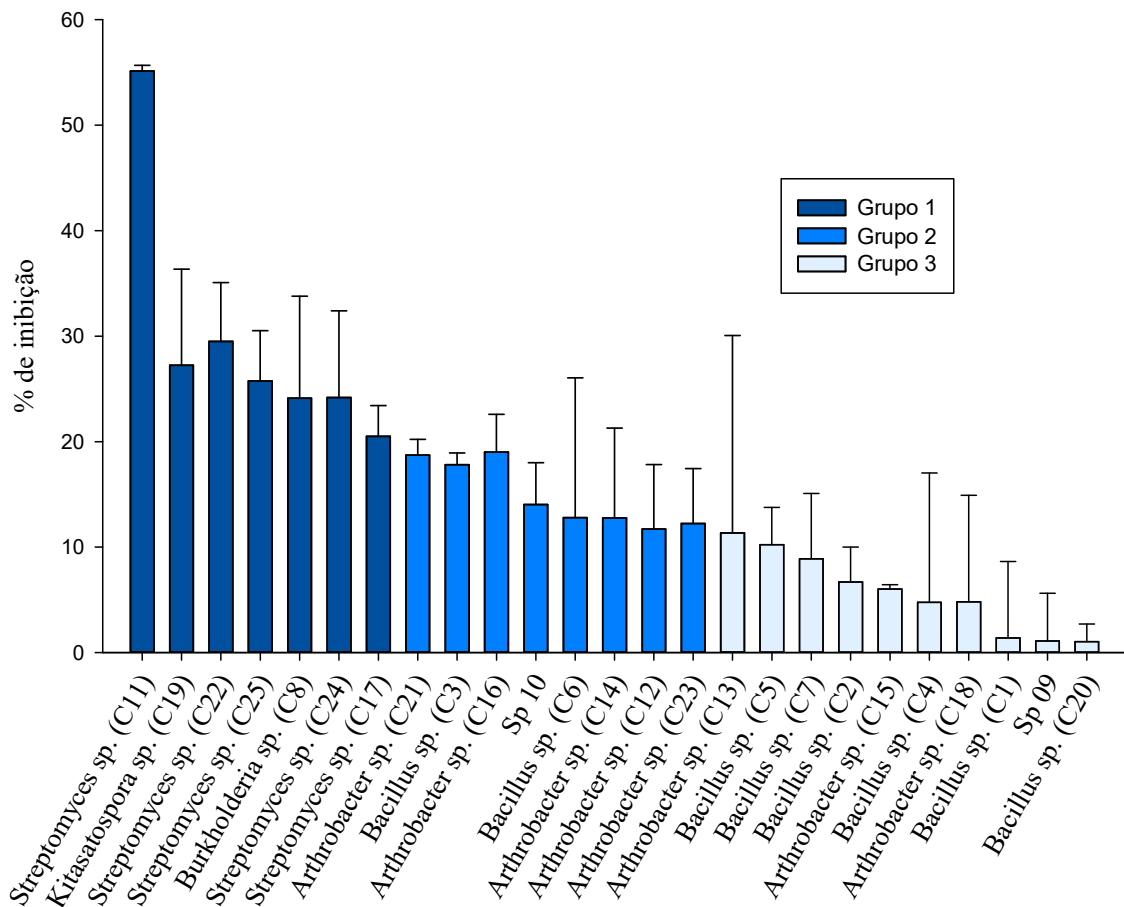


Figura 5 – Porcentagem de inibição ao crescimento do fungo *C. falcatum* por bactérias isoladas de solo rizosférico de cana-de-açúcar. Isolados bacterianos representados por barras de mesma coloração são pertencentes ao mesmo grupo de isolados.

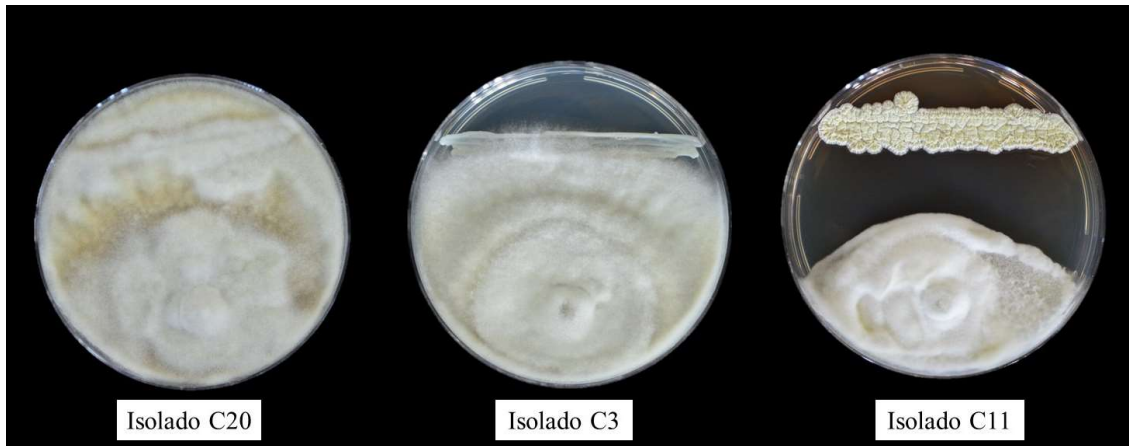


Figura 6 – Atividade antifúngica causada por bactérias isoladas de solo rizosférico de cana-de-açúcar contra *C. falcatum*, C11 (grupo 1), C3 (grupo 2) e C20 (grupo 3) (Ver Figura 5)

Dos sete isolados pertencentes ao primeiro grupo de bactérias apenas o isolado C8 (*Burkholderia*) não pertence ao gênero *Streptomyces* e ao filo das actinobactérias. Esse filo e mais especificamente, o gênero *Streptomyces* apresenta grande potencial em atuar como agentes de biocontrole de diversas doenças vegetais (Vurukonda et al., 2018; Olanrewaju e Babalola, 2019). A bactéria *Streptomyces* sp. MR14 foi capaz de antagonizar 13 patógenos fúngicos dentre eles, o fungo *Pyricularia oryzae* e também fungos do gênero *Colletotrichum* (Kaur et al., 2019). Esse mesmo gênero foi capaz de antagonizar patógenos fúngicos e bacterianos, dentre eles a bactéria *Burkholderia glumae* (Suárez-Moreno et al., 2019).

Diversos gêneros de BPCV em associação com a cultura da cana-de-açúcar têm sido descritos quanto a capacidade de atuarem por diferentes mecanismos de promoção de crescimento vegetal (Dobereiner, 1961; Bellone et al., 1997; Reis et al., 2004; Arencibia et al., 2006; Govindarajan et al., 2007; Hassan et al., 2010b; Santos et al., 2012b). Todavia, no que diz respeito à utilização dessas bactérias no controle de doenças da cana-de-açúcar, os trabalhos ainda são escassos. Apesar de já existirem alguns relatos de sucesso na utilização de bactérias antagonistas para o controle da podridão vermelha da cana-de-açúcar, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a maior parte dos trabalhos existentes são desenvolvidos em outros países (Hassan et al., 2010a; Patel et al., 2019), sendo assim a seleção de isolados que sejam adaptados às condições de cultivo de cana-de-açúcar no Brasil pode ser vantajosa. Além disso, a realização de estudos visando selecionar novos isolados é sempre importante, pois novas linhagens de patógenos surgem constantemente (Viswanathan et al., 2017).

No presente estudo foram encontrados isolados bacterianos capazes de exercer forte inibição ao crescimento do fungo *C. facatum in vitro*. Esses resultados indicam o potencial em utilizar as rizobactérias para controle da podridão vermelha da cana-de-açúcar principalmente se levarmos em conta a escassez de métodos eficazes para o controle dessa doença (Hassan et al., 2011). No entanto, é importante ressaltar que o teste de cultura pareada em placa de Petri consiste apenas em uma triagem inicial de microrganismos antagonistas. Sendo assim, torna-se necessário a realização de mais testes *in vitro* utilizando diferentes meios de cultura, diferentes linhagens do fungo patogênico e utilizando misturas de isolados, uma vez que efeitos sinérgicos já foram observados ao avaliar bactérias de forma conjunta (Boer et al., 2007). Além disso são necessários experimentos visando determinar os mecanismos pelos quais os antagonistas promovem a supressão do patógeno e, por fim, é de extrema importância a realização de ensaios em condições de casa de vegetação e em condições de campo para validar o potencial observado *in vitro* (Boer et al., 2007; Patel et al., 2019).

4.5. Isolados de BPCV mais promissores

Todos os 25 isolados avaliados foram capazes de atuar em pelo menos um mecanismo avaliado, sendo que 5 destes apresentaram apenas um mecanismo, 15 isolados apresentaram dois mecanismos e 5 isolados apresentaram os três mecanismos testados (Tabela 4 e Figura 7).

A capacidade das BPCV atuarem por mais de um mecanismo de promoção do crescimento vegetal é comumente relatada na literatura (Boer et al., 2007; Patel et al., 2019; Lebrazi et al., 2020; Mendoza-Arroyo et al., 2020; Jain et al., 2021). Bactérias do gênero *Azotobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Phyllobacterium* e *Rhizobium* já foram relatadas quanto a sua capacidade de produzir AIA e solubilizar fosfato inorgânico (Lebrazi et al., 2020; Jain et al., 2021). Os autores associaram a multifuncionalidade das BPCV com um maior potencial dessas bactérias em serem utilizadas como inoculantes. Sendo assim para verificação das BPCV mais promissoras levou-se em conta os resultados dos testes de SFI, produção de AIA, antagonismo em placa, bem como a combinação de funções (Tabela 5).

Tabela 4 – Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) associados a rizosfera de cana-de-açúcar classificadas quanto à capacidade de solubilizar fosfato inorgânico, produzir AIA e atuar como agentes de biocontrole ao *C. falcatum*.

Isolado	Identificação	AIA	SFI	Antagonismo
C1	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	-
C2	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	-
C3	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+
C4	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	-
C5	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	-
C6	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	+
C7	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	-
C8	<i>Burkholderia</i> sp.	+	+	+
C9	Sp 9	+	-	-
C10	Sp 10	-	+	+
C11	<i>Streptomyces</i> sp.	-	+	+
C12	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+	+
C13	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+	-
C14	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+	+
C15	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+	-
C16	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+	+
C17	<i>Streptomyces</i> sp.	-	+	+
C18	<i>Arthrobacter</i> sp.	+	+	-
C19	<i>Kitasatospora</i> sp.	-	+	+
C20	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	-
C21	<i>Arthrobacter</i> sp.	-	+	+
C22	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	+
C23	<i>Arthrobacter</i> sp.	-	-	+
C24	<i>Streptomyces</i> sp.	-	+	+
C25	<i>Streptomyces</i> sp.	-	-	+



Figura 7 – Isolados de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) associadas a rizosfera de cana-de-açúcar quanto a capacidade solubilizar fosfato (SFI), produzir ácido-indolacético (AIA) e antagonizar o *C. falcatum in vitro*.

Dos 25 isolados, 7 foram considerados como os mais promissores, os quais pertenciam aos gêneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces* e *Kitasatospora*. Dos sete isolados, cinco apresentam capacidade de atuar por dois mecanismos de promoção de crescimento (C2, C6, C10, C11 e C19) e dois apresentam capacidade de atuar pelos três mecanismos de promoção de crescimento avaliados nesse estudo (C3 e C8) (Tabela 5).

Tabela 5 – Isolados de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) associados a rizosfera de cana-de-açúcar classificados como mais promissores com base nos testes de caracterização fisiológica *in vitro*.

Isolado	Identificação	Mecanismos de promoção de crescimento
C2	<i>Bacillus</i> sp.	AIA e SFI
C3	<i>Bacillus</i> sp.	AIA, SFI e antagonismo
C6	<i>Bacillus</i> sp.	SFI e antagonismo
C8	<i>Burkholderia</i> sp.	AIA, SFI e antagonismo
C10	<i>Sp 10</i>	SFI e antagonismo
C11	<i>Streptomyces</i> sp.	Antagonismo e SFI
C19	<i>Kitasatospora</i> sp.	Antagonismo e SFI

Apesar de se mostrarem capazes de atuar mediante aos três mecanismos de promoção do crescimento vegetal avaliados, os isolados C12, C14 e C16 não se destacaram em nenhum dos testes realizados, isto é, não foram incluídos como mais promissores. No entanto, devemos levar em consideração que foi somente nas condições *in vitro*.

Assim, tanto os isolados que foram considerados mais promissores quanto estes que apresentaram os três mecanismos deverão ser utilizados em testes de inoculação *in vivo*, tanto em casa de vegetação como em campo, para avaliar o seu potencial. Essas bactérias poderão também ser testadas em outras culturas ou espécies florestais.

5. CONCLUSÕES

A rizosfera da cana-de-açúcar abriga bactérias promotoras de crescimento vegetal capazes de solubilizar fosfato inorgânico, produzir ácido-indol-acético, bem como promover o biocontrole do *C. falcatum in vitro*, indicando o potencial de uso biotecnológico dessas bactérias na agricultura. Recomenda-se testes *in vivo*, seja em casa de vegetação ou em campo, para comprovar o potencial dessas bactérias em promover o crescimento vegetal e no biocontrole para que se tornem um produto biotecnológico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDA (2019). Principais indicadores do setor de fertilizantes. Associação Nacional para Difusão de Adubos. Disponível em: http://anda.org.br/wp-content/uploads/2019/09/Principais_Indicadores_2019.pdf. Acessado dia 07 de dezembro de 2020
- Arencibia, A. D., Vinagre, F., Estevez, Y., Bernal, A., Perez, J., Cavalcanti, J., Hemerly, A. S. *Gluconoacetobacter diazotrophicus* elicitate a sugarcane defense response against a pathogenic bactéria *Xanthomonas albilineans*. **Plant signaling & behavior**, v. 1, n. 5, p. 265-273, 2006. doi.org/10.4161/psb.1.5.3390
- Berraquero, F. R.; Baya, A. M.; Cormenzana, A. R. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. **Ars Pharmaceutica**, v.17, p.399-406, 1976.
- Bettiol, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. **Revisão anual de patologia de plantas**, v. 5, 1997.
- Boer, W., Wagenaar, A. M., Klein Gunnewiek, P. J., Van Veen, J. A. In vitro suppression of fungi caused by combinations of apparently non-antagonistic soil bacteria. **FEMS microbiology ecology**, v. 59, n. 1, p. 177-185, 2007. doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00197.x
- Bolot, S., Abrouk, M., Masood-Quraishi, U., Stein, N., Messing, J., Feuillet, C., Salse, J. The 'inner circle' of the cereal genomes." **Current opinion in plant biology**, v. 12, n. 2, p. 119-125, 2009. doi.org/10.1016/j.pbi.2008.10.011
- Bolton Jr, H., Fredrickson, J. K., Elliott, L. Microbial ecology of the rhizosphere. **Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management**. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 27-63.
- Brasil. Decreto N° 10.375, de 26 de maio de 2020. Dispõe sobre o Programa Nacional de Bioinsumos e o conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. Disponível em: <http://www.in.gov.br/en/web/dou/-/decreto-n-10.375-de-26-de-maio-de-2020-258706480>
- Bric, J. M., Bostock, R. M., Silverstone, S. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p 535-538, 1991.
- Cavagnaro, T. R., Bender, S. F., Asghari, H. R., van der Heijden, M. G. The role of arbuscular mycorrhizas in reducing soil nutrient loss. **Trends in Plant Science**, v. 20, n. 5, p. 283-290, 2015. doi.org/10.1016/j.tplants.2015.03.004
- Chandra, P., Tripathi, P., Chandra, A. Isolation and molecular characterization of plant growth-promoting *Bacillus* spp. and their impact on sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) growth and tolerance towards drought stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 11, p. 1-15, 2018. doi.org/10.1007/s11738-018-2770-0
- Chandrasekeran, A., & Mahalingam, P. U. Isolation of Phosphate solubilizing bacteria from

Sorghum bicolor rhizosphere soil inoculated with arbuscular mycorrhizae fungi (*Glomus* sp). **Res Biotechnol**, v. 5, n. 2, 2014.

Chawngthu, L., Hnamte, R., Lalfakzuala, R. Isolation and Characterization of Rhizospheric Phosphate Solubilizing Bacteria from Wetland Paddy Field of Mizoram, India. **Geomicrobiology Journal**, v. 37, n. 4, p. 366-375, 2020.

Chen, Y., Fan, J. B., Du, L., Xu, H., Zhang, Q. Y., He, Y. Q. The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil. **Appl Soil Ecol** 84:235-244, 2014.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acomp. safra bras. cana, v. 6 - Safra 2019/20, n. 3 - Terceiro levantamento, Brasília, p. 1-58, dezembro de 2019. ISSN 2318-7921. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acomp. safra bras. cana, v. 6 - Safra 2019/20, n. 4 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-58 abril de 2020. ISSN 2318-7921. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>

Costa, E. M. D., Nóbrega, R. S. A., Carvalho, F. D., Trochmann, A., Ferreira, L. D. V. M., Moreira, F. M. D. S. Promoção do crescimento vegetal e diversidade genética de bactérias isoladas de nódulos de feijão-caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 9, p. 1275-1284, 2013. [dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012](https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013000900012)

Curl, E. A., Truelove, B. The rhizosphere. **Springer Science & Business Media**, 2012
 Damasceno, C. L., Duarte, E. A. A., dos Santos, L. B. P. R., de Oliveira, T. A. S., de Jesus, F. N., de Oliveira, L. M., Soares, A. C. F. Postharvest biocontrol of anthracnose in bananas by endophytic and soil rhizosphere bacteria associated with sisal (*Agave sisalana*) in Brazil. **Biological Control**, v. 137, p. 104016, 2019. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104016

Das, S. K., Avasthe, R. K. Plant nutrition management strategy: a policy for optimum yield. **Acta Scientific Agriculture** (ISSN: 2581-365X), v. 2, n. 5, 2018.

Davidson, R. M., Gowda, M., Moghe, G., Lin, H., Vaillancourt, B., Shiu, S. H., Jiang, N., Robin Buell, C. Comparative transcriptomics of three Poaceae species reveals patterns of gene expression evolution. **The Plant Journal**, v. 71, n. 3, p. 492-502, 2012. doi.org/10.1111/j.1365-313X.2012.05005.x

Dermastia, M. Plant hormones in phytoplasma infected plants. **Frontiers in plant science**, v. 10, p. 477, 2019.

Ding, T., Su, B., Chen, X., Xie, S., Gu, S., Wang, Q., Huang, D., Jiang, H. An endophytic bacterial strain isolated from *Eucommia ulmoides* inhibits southern corn leaf blight. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 903, 2017.

Dobereiner, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Dery in the rhizosphere of sugar cane. **Plant and Soil**, v. 15, n. 3, p. 211-216, 1961. doi.org/10.1007/BF01400455

Domingues, M. R., Bernardi, M. R., Ono, E. Y. S., Ono, M. A. Agrotóxicos: risco à saúde do trabalhador rural. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 45-54, 2004.

- Dong, M., Yang, Z., Cheng, G., Peng, L., Xu, Q., Xu, J. Diversity of the Bacterial Microbiome in the Roots of Four *Saccharum* Species: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 267, 2018. doi.org/10.3389/fmicb.2018.00267
- Du, E., Terrer, C., Pellegrini, A. F., Ahlström, A., van Lissa, C. J., Zhao, X., Xia, N., Wu, X., Jackson, R. B. Global patterns of terrestrial nitrogen and phosphorus limitation. **Nature Geoscience**, v. 13, n. 3, p. 221-226, 2020. doi.org/10.1038/s41561-019-0530-4
- Dukare, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., Vishwakarma, R. K. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 9, p. 1498-1513, 2019.
- Dukare, A., Paul, S., Arambam, A. Isolation and efficacy of native chitinolytic rhizobacteria for biocontrol activities against Fusarium wilt and plant growth promotion in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 30, p. 1-12, 2020.
- El-Shabrawy, E. S., Shehata, H. Controlling maize late-wilt and enhancing plant salinity tolerance by some rhizobacterial strains. **Egyptian Journal of Phytopathology**, v. 46, n. 1, p. 235-255, 2018.
- Estrada, G. A., Baldani, V. L. D., Oliveira, D. M., Urquiaga, S., Baldani, J. V. Selection of phosphate-solubilizing diazotrophic *Herbaspirillum* and *Burkholderia* strains and their effect on rice crop yield and nutrient uptake. **Plant Soil** 369:115-129, 2013.
- Fernandes, A. J. Manual da cana-de-açúcar. Livro ceres, 1984.
- Frankenberger Jr, W. T., Arshad, M. **Phytohormones in soils microbial production & function**. CRC Press, 2020.
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., Migheli, Q. Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 10, p. 1-19, 2019. doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4
- Goswami, D., Pithwa, S., Dhandhukia, P., Thakker, J. N. Delineating *Kocuria turfanensis* 2M4 as a credible PGPR: a novel IAA-producing bacteria isolated from saline desert. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 566-576, 2014. doi.org/10.1080/17429145.2013.871650
- Govindarajan, M., Kwon, S. W., Weon, H. Y. Isolation, molecular characterization and growth-promoting activities of endophytic sugarcane diazotroph *Klebsiella* sp. GR9. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 7, p. 997-1006, 2007. doi.org/10.1007/s11274-006-9326-y
- Hagaggi, N. S. A., Mohamed, A. A. Enhancement of *Zea mays* (L.) growth performance using indole acetic acid producing endophyte *Mixta theicola* isolated from *Solenostemma argel* (Hayne). **South African Journal of Botany**, v. 134, p. 64-71, 2020. doi.org/10.1016/j.sajb.2020.02.034
- Han, X., Zeng, H., Bartocci, P., Fantozzi, F., Yan, Y. Phytohormones and effects on growth and metabolites of microalgae: a review. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 25, 2018.

doi.org/10.3390/fermentation4020025

Hayat, K., Menhas, S., Bundschuh, J., Zhou, P., Niazi, N. K., Amna, ... & Chaudhary, H. J. Plant growth promotion and enhanced uptake of Cd by combinatorial application of *Bacillus pumilus* and EDTA on *Zea mays* L. **International Journal of Phytoremediation**, v. 22, n. 13, p. 1372-1384, 2020. doi.org/10.1080/15226514.2020.1780410

Hao, X., Xie, P., Johnstone, L., Miller, S. J., Rensing, C., Wei, G. Genome sequence and mutational analysis of plant-growth-promoting bacterium *Agrobacterium tumefaciens* CCNWGS0286 isolated from a zinc-lead mine tailing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 15, p. 5384-5394, 2012. DOI: 10.1128/AEM.01200-12

Hara, F. A. D. S., Oliveira, L. A. D. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.

Hassan, M. N., Osborn, A. M., Hafeez, F. Y. Molecular and biochemical characterization of surfactin producing *Bacillus* species antagonistic to *Colletotrichum falcatum* Went causing sugarcane red rot. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 20, p. 2137-2142, 2010a.

Hassan, M. N., Afghan, S., & Hafeez, F. Y. Suppression of red rot caused by *Colletotrichum falcatum* on sugarcane plants using plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol**, v. 55, n. 4, p. 531-542, 2010b.

Hungria, M., Nogueira, M. A., Araujo, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. **Biol Fertil Soils** 49:791-801, 2013.

Jain, D., Sharma, J., Kaur, G., Bhojija, A. A., Chauhan, S., Sharma, V., Suman, A., Mohanty, S. R., Maharjan, E. Phenetic and Molecular Diversity of Nitrogen Fixating Plant Growth Promoting *Azotobacter* Isolated from Semiarid Regions of India. **BioMed Research International**, v. 2021, 2021.

Jin, X., Shi, Y., Wu, F., Pan, K., Zhou, X. Intercropping of wheat changed cucumber rhizosphere bacterial community composition and inhibited cucumber *Fusarium* wilt disease. **Scientia Agricola**, v. 77, n. 5, 2020.

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.org/10.3389/fmicb.2019.02106

Kang, S. M., Radhakrishnan, R., You, Y. H., Joo, G. J., Lee, I. J., Lee, K. E., & Kim, J. H. Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrate and amino acids contents to promote mustard plant growth. **Indian journal of microbiology**, v. 54, n. 4, p. 427-433, 2014.

Kang, S. M., Shahzad, R., Bilal, S., Khan, A. L., Park, Y. G., Lee, K. E., Asaf, S., Khan, M. A., Lee, I. J. Indole-3-acetic-acid and ACC deaminase producing *Leclercia adecarboxylata* MO1 improves *Solanum lycopersicum* L. growth and salinity stress tolerance by endogenous

- secondary metabolites regulation. **BMC microbiology**, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2019. doi.org/10.1186/s12866-019-1450-6
- Kaur, T., Rani, R., Manhas, R. K. Biocontrol and plant growth promoting potential of phylogenetically new *Streptomyces* sp. MR14 of rhizospheric origin. **AMB Express**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019. doi.org/10.1186/s13568-019-0849-7
- Kaya, C., Şenbayram, M., Akram, N. A., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., Ahmad, P. Sulfur-enriched leonardite and humic acid soil amendments enhance tolerance to drought and phosphorus deficiency stress in maize (*Zea mays* L.). **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020. doi.org/10.1038/s41598-020-62669-6
- Kim, K. H., Kabir, E., Jahan, S. A. Exposure to pesticides and the associated human health effects. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 525-535, 2017. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009
- Klein, B. C., Mesquita Sampaio, I. L., Mantelatto, P. E., Filho, R. M., Bonomi, A. Beyond ethanol, sugar, and electricity: a critical review of product diversification in Brazilian sugarcane mills. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 13, n. 3, p. 809-821, 2019. doi.org/10.1002/bbb.1969
- Köhl, J., Kolnaar, R., Ravensberg, W. J. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 845, 2019. doi.org/10.3389/fpls.2019.00845
- Kong, P., Hong, C. Endophytic *Burkholderia* sp. SSG as a potential biofertilizer promoting box wood growth. **PeerJ**, v. 8, p. e9547, 2020. doi.org/10.7717/peerj.9547
- Kuklinsky-Sobral, J., Araújo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., Azevedo, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v.6, p.1244-1251, 2004.
- Kupper, K. C., Gimenes-Fernandes, N., Goes, A. D. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia brasileira**, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.
- Lamichhane, J. R., Dachbrodt-Saaydeh, S., Kudsk, P., Messéan, A. Toward a reduced reliance on conventional pesticides in European agriculture. **Plant Disease**, v. 100, n. 1, p. 10-24, 2016. doi.org/10.1094/PDIS-05-15-0574-FE
- Lane, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, p. 115-175, 1991.
- Latz, E., Eisenhauer, N., Rall, B. C., Allan, E., Roscher, C., Scheu, S., Jousset, A. Plant diversity improves protection against soil-borne pathogens by fostering antagonistic bacterial communities. **Journal of Ecology**, v. 100, n. 3, p. 597-604, 2012.
- Lebrazi, S., Niehaus, K., Bednarz, H., Fadil, M., Chraibi, M., Fikri-Benbrahim, K. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization by rhizobacterial strains isolated from *Acacia cyanophylla* root nodules and their effects on its

plant growth. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2020. doi.org/10.1186/s43141-020-00090-2

Ludwig, J., Moura, A. B. Controle biológico da queima-das-bainhas em arroz pela microbiolização de sementes com bactérias antagonistas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 381-386, 2007.

Maciel, L. C., Santos, W. F., Peluzio, J. M., Junior, O. J. F., Barbosa, A. S., Silva, R. M., Sodré, L. F., Oliveira, M. Agronomic performance of corn cultivars as a function of phosphorus use. **Annual Research & Review in Biology**, p. 99-108, 2020. 10.9734/arrb/2020/v35i630241

Malavolta E (2006). Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Agronômica Ceres, 638 p. ISBN: 85-318-0047-1

Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., Rajkumar, M. Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. **Journal of environmental management**, v. 254, p. 109779, 2020.

Mariano, R. D. L. R., da Silveira, E. B., de Assis, S. M. P., Gomes, A. M. A., Nascimento, A. R. P., Donato, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v. 1, p. 89-111, 2004.

Martins, S. J., de Medeiros, F. H. V., de Souza, R. M., de Resende, M. L. V., Junior, P. M. R. Biological control of bacterial wilt of common bean by plant growth-promoting rhizobacteria. **Biological control**, v. 66, n. 1, p. 65-71, 2013.

Mendoza-Arroyo, G. E., Chan-Bacab, M. J., Aguila-Ramírez, R. N., Ortega-Morales, B. O., Canché Solís, R. E., Chab-Ruiz, A. O., Cob-Rivera, K. I., Dzib-Castillo, B., Tun-Che, R. E., Camacho-Chab, J. C. Inorganic Phosphate Solubilization by a Novel Isolated Bacterial Strain *Enterobacter* sp. ITCB-09 and Its Application Potential as Biofertilizer. **Agriculture** 2020, 10, 383. doi.org/10.3390/agriculture10090383

Metting, F. B. Soil microbial ecology, applications in agriculture and environmental management. In: **Marcel Dekker, Inc. New**. 1993.

Mohamed, E. A., Farag, A. G., Youssef, S. A. Phosphate solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* isolated from tomato plant rhizosphere. **Journal of Environmental Protection**, v. 9, n. 03, p. 266, 2018. doi.org/10.4236/jep.2018.93018

Moreira, f. M. S., Siqueira, j. O. Microbiologia e bioquímica do solo. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

Muhammad, M., Isnatin, U., Soni, P., Adinurani, P. G. Effective ness of Mycorrhiza, Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Inorganic Fertilizer on Chlorophyll Content in *Glycine max* (L.) cv. Detam-4 Prida. In: **E3S Web of Conferences**. EDP Sciences, 2021. p. 00031.

Nunes, M. D., da Luz, J. M. R., Paes, S. A., Ribeiro, J. J. O., da Silva, M. D. C. S., Kasuya, M. C. M. Nitrogen supplementation on the productivity and the chemical composition of oyster

mushroom. **Journal of Food Research**, v. 1, n. 2, p. 113, 2012. <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v1n2p113>

Okano, K., Fukui, S., Kitao, R., Usagawa, T. Effects of culture length of *Pleurotus eryngii* grown on sugarcane bagasse on in vitro digestibility and chemical composition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 136, n. 3-4, p. 240-247, 2007. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.08.024

Olanrewaju, O. S., Babalola, O. O. *Streptomyces*: implications and interactions in plant growth promotion. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 1179-1188, 2019. doi.org/10.1007/s00253-018-09577-y

Oliveira, G. R. F., Silva, M. S., Marciano, T. Y. F., Proença, S. L., Sá, M. E. Crescimento inicial do feijoeiro em função do vigor de sementes e inoculação com *Bacillus subtilis*. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 10, n. 4, p. 439-448, 2016. dx.doi.org/10.18011/bioeng2016v10n4p439-448

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.org/10.1016/j.jgeb.2017.06.005

Paungfoo-Lonhienne, C., Lonhienne, T. G., Yeoh, Y. K., Donose, B. C., Webb, R. I., Parsons, J., Liao, W., Sagulenko, E., Lakshmanan, P., Hugenholtz, P., Schmidt, S., Ragan, S. A. Crosstalk between sugarcane and a plant-growth promoting *Burkholderia* species. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016. doi.org/10.1038/srep37389

Pannuti, L. E. D. R., Baldin, E. L. L., Gava, G. J. D. C., Kölln, O. T., Cruz, J. C. S. Danos do complexo broca-podridão à produtividade e à qualidade da cana-de-açúcar fertirrigada com doses de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, n. 4, p. 381-387, 2013.

Papavizas, G. C., Davey, C. B. Extent and nature of the rhizosphere of *Lupinus*. **Plant and Soil**, p. 215-236, 1961. <https://www.jstor.org/stable/42931907>

Parra, J. R. P. Controle biológico no Brasil: parasitóides e predadores. **Editora Manole Ltda**, 2002.

Patel, P., Shah, R., Joshi, B., Ramar, K., Natarajan, A. Molecular identification and biocontrol activity of sugarcane rhizosphere bacteria against red rot pathogen *Colletotrichum falcatum*. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. e00317, 2019. doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00317

Paul, D., Sinha, S. N. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 1, p. 130-136, 2017. doi.org/10.1016/j.aasci.2016.10.001

Peixoto, A. R. Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 153-160, 1997.

Pouokam, G. B., LemnyuyAlbum, W., Ndikontar, A. S., Sidatt, M. E. H. A pilot study in Cameroon to understand safe uses of pesticides in agriculture, risk factors for farmers' exposure

and management of accidental cases. **Toxics**, v. 5, n. 4, p. 30, 2017. doi.org/10.3390/toxics5040030

Prashar, P., Kapoor, N., Sachdeva, S. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 13, n. 1, p. 63-77, 2014. doi.org/10.1007/s11157-013-9317-z

Price, C. L., Parker, J. E., Warrilow, A. G., Kelly, D. E., Kelly, S. L. Azole fungicides—understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. **Pest management science**, v. 71, n. 8, p. 1054-1058, 2015. doi.org/10.1002/ps.4029

R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R. Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

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, n. 1, p. 1-11, 2017. doi.org/10.1186/s40538-016-0083-3

Raymaekers, K., Ponet, L., Holtappels, D., Berckmans, B., Cammue, B. P. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management—a review. **Biological Control**, v. 144, p. 104240, 2020. doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104240

Reis, V. M., Estrada-De Los Santos, P., Tenorio-Salgado, S., Vogel, J., Stoffels, M., Guyon, S., Caballero-Mellado, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2155-2162, 2004. doi.org/10.1099/ijs.0.02879-0

Renzi, A., Henz, A. P., Zidora, C. B. M., Shikida, P. F. A. Evolução do controle biológico de insetos e pragas no setor canavieiro: uma análise na perspectiva econômica. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 2, p. 459-485, 2019.

Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., Prigent-Combaret, C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and soil**, v. 321, n. 1, p. 305-339, 2009. doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2

Santos, F. A., Queiróz, J. H. D., Colodette, J. L., Fernandes, S. A., Guimarães, V. M., Rezende, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, 35(5), 1004-1010, 2012a.

Santos, I. B., de Lima, D. R. M., Barbosa, J. G., Oliveira, J. T. C., Freire, F. J., Kuklinsky-Sobral, J. Bactérias diazotróficas associadas a raízes de cana-de-açúcar: solubilização de fosfato inorgânico e tolerância à salinidade. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 1, 2012b.

Saleem, A. R., Brunetti, C., Khalid, A., Della Rocca, G., Raio, A., Emiliani, G., De Carlo, A., Mahmood, T., Centritto, M. Drought response of *Mucuna pruriens* (L.) DC. inoculated with ACC deaminase and IAA producing rhizobacteria. **PLoS One**, v. 13, n. 2, p. e0191218, 2018.

Savary, S., Willocquet, L., Pethybridge, S. J., Esker, P., McRoberts, N., Nelson, A. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature ecology & evolution**, v. 3, n. 3, p.

430-439, 2019. doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y

Schaad, N. W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, 2. ed., St. Paul: **American Phytopathological Society**. 1998. 164p.

Sindhu, R., Gnansounou, E., Binod, P., Pandey, A. Bioconversion of sugarcane crop residue for value added products—An overview. **Renewable Energy**, v. 98, p. 203-215, 2016. doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.057

Singh, R. B., Singh, B., Singh, R. K. Study of genetic diversity of sugarcane (*Saccharum*) species and commercial varieties through TRAP molecular markers. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 3, p. 332-338, 2017a. doi.org/10.1007/s40502-017-0314-z

Singh, S. K., Reddy, V. R., Fleisher, D. H., Timlin, D. J. Relationship between photosynthetic pigments and chlorophyll fluorescence in soybean under varying phosphorus nutrition at ambient and elevated CO₂. **Photosynthetica**, v. 55, n. 3, p. 421-433, 2017b. DOI: 10.1007/s11099-016-0657-0

Singh, R. K., Singh, P., Li, H. B., Canção, Q. Q., Guo, D. J., Solanki, M. K., Yang, L. T. Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: a comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. **BMC plant biology**, v. 20, n. 1, p. 1-21, 2020.

Souza, A. P., Grandis, A., Leite, D. C., Buckeridge, M. S. Sugarcane as a bioenergy source: history, performance, and perspectives for second-generation bioethanol. **BioEnergy Research**, v. 7, n. 1, p. 24-35, 2014. doi.org/10.1007/s12155-013-9366-8

Suárez-Moreno, Z. R., Vinchira-Villarraga, D. M., Vergara-Morales, D. I., Castellanos, L., Ramos, F. A., Guarnaccia, C., Degrassi, G., Venturi, V., Moreno-Sarmiento, N. Plant-growth promotion and biocontrol properties of three *Streptomyces* spp. isolates to control bacterial rice pathogens. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 290, 2019. doi.org/10.3389/fmicb.2019.00290

Surendran, U., Ramesh, V., Jayakumar, M., Marimuthu, S., Sridevi, G. Improved sugarcane productivity with tillage and trash management practices in semi arid tropical agro ecosystem in India. **Soil and Tillage Research**, v. 158, p. 10-21, 2016. doi.org/10.1016/j.still.2015.10.009

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.org/10.1016/j.apsoil.2017.09.030

Trivedi, P., Leach, J. E., Tringe, S. G., Sa, T., Singh, B. K. Plant–microbiome interactions: From community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 607-621, 2020. doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1

United Nations, 2019. World population prospects 2019. Disponível em: <https://population.un.org/wpp2019/>

Vale, F. X. R., Filho, E. I. F., Liberato, J. R., Zambolim, L. Quant-A software to quantify plant disease severity. In: **International workshop on plant disease epidemiology**. 2001. p. 161.

- Viswanathan, R., Malathi, P. Biocontrol Strategies to Manage Fungal Diseases in Sugarcane. **Sugar Tech**, v. 21, n. 2, p. 202-212, 2019. doi.org/10.1007/s12355-018-0690-3
- Viswanathan, R., Malathi, P., Sundar, A. R., Kaverinathan, K., Chhabra, M. L., Parameswari, B., Jothi, R. Diversity of *Colletotrichum falcatum* population in India: Comparative virulence at two different agro-climatic regions. **International Sugar Journal**, v. 119, n. 1428, p. 966-977, 2017.
- Viswanathan, R., Samiyappan, R. Induced systemic resistance by fluorescent pseudomonads against red rot disease of sugarcane caused by *Colletotrichum falcatum*. **Crop Protection**, v. 21, n. 1, p. 1-10, 2002.
- Vurukonda, S. S. K. P., Giovanardi, D., Stefani, E. Plant growth promoting and biocontrol activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 952, 2018. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00290
- Wagi, S., Ahmed, A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. **PeerJ**, v. 7, p. e7258, 2019. doi.org/10.7717/peerj.7258
- Wang, S., Ruan, C., Yi, L., Deng, L., Yao, S., Zeng, K. Biocontrol ability and action mechanism of *Metschnikowia citriensis* against *Geotrichum citri-aurantii* causing sour rot of postharvest citrus fruit. **Food Microbiology**, v. 87, p. 103375, 2020.
- Wang, Z., Solanki, M. K., Yu, Z. X., Yang, L. T., An, Q. L., Dong, D. F., Li, Y. R. Draft genome analysis offers insights into the mechanism by which *Streptomyces chartreusis* WZS021 increases drought tolerance in sugarcane. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 3262, 2019. doi.org/10.3389/fmicb.2018.03262
- Xiang, N., Lawrence, K. S., Kloepper, J. W., Donald, P. A., McInroy, J. A., Lawrence, G. W. Biological control of *Meloidogyne incognita* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton. **Plant Disease**, v. 101, n. 5, p. 774-784, 2017. doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1369-RE
- Yang, L., Deng, Y., Wang, X., Zhang, W., Shi, X., Chen, X., Lakshmanan, P., Zhang, F. Global direct nitrous oxide emissions from the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). **Science of the Total Environment**, v. 752, p. 141795, 2021. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141795
- You, M., Fang, S., MacDonald, J., Xu, J., Yuan, Z. C. Isolation and characterization of *Burkholderia cenocepacia* CR318, a phosphate solubilizing bacterium promoting corn growth. **Microbiological research**, v. 233, p. 126395, 2020. doi.org/10.1016/j.micres.2019.126395
- Yuan, Z. Y., Chen, H. Y. A global analysis of fine root production as affected by soil nitrogen and phosphorus. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1743, p. 3796-3802, 2012. doi.org/10.1098/rspb.2012.0955
- Zhang, K., Liu, H., Tao, P., Chen, H. Comparative proteomic analyses provide new insights into low phosphorus stress responses in maize leaves. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e98215, 2014. doi.org/10.1371/journal.pone.0098215

Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H., Wang, Y. The distribution of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by large-scale genomic analysis. **Molecules**, v. 24, n. 7, p. 1411, 2019. doi.org/10.3390/molecules24071411

Zhao, Y. Auxin biosynthesis and its role in plant development. **Annual review of plant biology**, v. 61, p. 49-64, 2010. doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308