

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Análise do Potencial de Promoção de Crescimento de Plantas
por Rizobactérias Isoladas de *Campomanesia adamantium*
(Cambess) O. Berg

Autor: Alfred Werner Medina Loosli
Orientador: Tiago Tognolli de Almeida

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Janeiro – 2025.

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA

Análise do Potencial de Promoção de Crescimento de Plantas
por Rizobactérias Isoladas de *Campomanesia adamantium*
(Cambess) O. Berg

Autor: Alfred Werner Medina Loosli
Orientador: Tiago Tognolli de Almeida

"Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA, no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco - Área de concentração: "Sustentabilidade Ambiental e Produtiva" Aplicada ao "Agronegócio e Produção Sustentável"

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Janeiro – 2025.

L863a Loosli, Alfred Werner Medina

Análise do potencial de promoção de crescimento de plantas por rizobactérias isoladas de *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg/ Alfred Werner Medina Loosli sob orientação do Prof. Dr. Tiago Tognolli de Almeida.-- Campo Grande, MS : 2025.

52 p.: il.;

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS, 2025

Bibliografia: p. 11-15

1. RPCP. 2. Biofertilizantes. 3. Sustentabilidade. 4. Rizosfera. 5. Guavira I.Almeida, Tiago Tognolli de. II. Título.

CDD: 630.277

**Análise do Potencial de Promoção de Crescimento de Plantas por
Rizobactérias Isoladas de *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg**

Autor: Alfred Werner Medina Loosli

Orientador: Prof. Dr. Tiago Tognolli de Almeida

Titulação: Mestre em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária

Área de Concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva

Aprovado em 31 de janeiro de 2025.

A presente defesa foi realizada via google Meet.

Eu, Tiago Tognolli de Almeida, como presidente da banca, assinei a folha de aprovação com o consentimento de todos os membros.



Documento assinado digitalmente

TIAGO TOGNOLLI DE ALMEIDA

Data: 31/01/2025 17:05:13-0300

Verifique em <https://validar.itb.gov.br>

Prof. Dr. Tiago Tognolli de Almeida – UCDB

Prof. Dr. Denilson de Oliveira Guilherme - UCDB

Prof. Dr. Luiz Ricardo Olchanheski - UCDB

Magnus est Deus noster, et magna est potentia
ejus, et potentia ejus non est numerus

- Carlos Lineu

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Acima de tudo, a Deus por todas as oportunidades dadas a mim;

Aos meus pais Alfred Werner e Carla Cristina por todo apoio e dedicação a minha formação;

A minha namorada Juliana que esteve ao meu lado incondicionalmente;

Ao meu orientador e professor Tiago Tognolli de Almeida por todo conhecimento transmitido, pela paciência e auxílio;

Aos meus colegas de laboratório, especialmente ao Yan pelo auxílio nos experimentos;

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	3
Objetivo geral.....	3
Objetivos específicos.....	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
BIOINSUMOS.....	4
BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS.....	4
MECANISMOS DIRETOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO.....	6
Fixação de nitrogênio	6
Solubilização de fosfato	6
Síntese de fitormônios	7
Outros mecanismos	9
MECANISMOS INDIRETOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO.....	10
<i>Campomanesia adamantium</i>	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
Capítulo 1 Análise do Potencial de Promoção de Crescimento de Plantas por Rizobactérias Isoladas de <i>Campomanesia adamantium</i> (Cambess)	
O. Berg.....	16
Resumo	17
Introdução	18
Metodologia	18
Resultados	23
Discussão	30

Considerações finais.....	34
Referências.....	35
Considerações finais.....	40

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 Nutrientes avaliados e os respectivos métodos empregados na análise....	22
Tabela 2 Identificação das rizobactérias isoladas de <i>C. adamantium</i> com base no banco de dados GenBank.....	23
Tabela 3 Índices de antagonismo de rizobactérias de <i>C. adamantium</i> contra fitopatógenos.....	25
Tabela 4 Testes de atividade de promoção de crescimento vegetal por rizobactérias de <i>C. adamantium</i>	27

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1 . Mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento de plantas por rizobactérias.....	5
Figura 2 Delineamento do teste qualitativo de antagonismo contra fitopatógenos.....	20
Figura 3 Rizobactérias de <i>C. adamantium</i> contra fitopatógenos. A = RCA12 contra <i>C. gloeosporioides</i> ; B = RCA18 contra <i>C. gloeosporioides</i> ; C = RCA15 contra <i>Fusarium</i> sp.; D = RCA16 contra <i>Fusarium</i> sp.; E = RCA16 contra <i>M. phaseolina</i>	25
Figura 4 Fixação biológica de nitrogênio indicada pelos anéis brancos de crescimento bacteriano (setas). A= RCA1, B= RCA3.....	26
Figura 5 Solubilização de fosfato por rizobactérias de <i>C. adamantium</i>	27
Figura 6 Teste colorimétrico para síntese bacteriana de AIA. A = com Triptofano; B = sem triptofano. Triplicatas das 18 rizobactérias iniciando-se da esquerda para direita e de cima para baixo.....	27
Figura 7 Efeito dos tratamentos com as rizobactérias selecionadas nas variáveis analisadas em plântulas de rabanete. K = consórcio; L = RCA3 (<i>Lysinibacillus sphaericus</i>); P = RCA (<i>Pseudomonas putida</i>).....	29
Figura 8 Promoção de crescimento em rabanete por RCA3 (<i>Lysinibacillus sphaericus</i>)(A) em comparação com controle (B) do teste <i>in vivo</i>	29
Figura 9 Concentração de macro e micronutrientes do teste <i>in vivo</i> de promoção de crescimento. K = Consórcio; L = RCA3; P = RCA8.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS

RPCP	Rizobactérias promotoras de crescimento em Plantas
AIA	Ácido indolacético
PBS	Solução tampão salina tamponada com fosfato
TSA	Ágar Triptona de Soja
UCDB	Universidade Católica Dom Bosco
BDA	Ágar Batata Dextrose
IA	Índice de antagonismo
TSB	Caldo de Triptona de Soja

RESUMO

A agricultura enfrenta diversos obstáculos para suprir o crescente aumento populacional, com isso, após a descoberta das rizobactérias vários, estudos foram conduzidos com a finalidade de elucidar os mecanismos envolvidos entre planta e microrganismo, e como eles podem ser aplicados na agricultura a fim de substituir os pesticidas e fertilizantes químicos. O objetivo do trabalho foi isolar e avaliar o potencial de promoção de crescimento de plantas por rizobactérias de Guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg). Amostras da rizosfera de *C. adamantium* foram utilizadas para o isolamento das rizobactérias, e posteriormente identificadas por meio do sequenciamento da região 16S do rRNA. Os isolados foram inicialmente testados quanto a sua capacidade de inibição de fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina*). As rizobactérias que apresentaram ação inibitória foram avaliadas em um teste semiquantitativo. Testes para atividades de promoção de crescimento foram conduzidos: inoculação em meio Nfb semissólido para a fixação biológica de nitrogênio e em meio fosfato insolúvel para a solubilização de fosfato, além do teste colorimétrico com o reagente de Salkowski para a síntese de ácido indolacético (AIA). Duas rizobactérias (*Lysinibacillus* RCA3 e *Pseudomonas* RCA8) que apresentaram resultados positivos, além de um consórcio entre elas, foram testadas *in vivo* em rabanete. Os fitopatógenos utilizados foram parcialmente inibidos por rizobactérias do gênero *Bacillus*. As rizobactérias isoladas apresentaram capacidade de promoção de crescimento *in vitro* por meio da disponibilização de nutrientes como fixação de nitrogênio atmosférico e solubilização de fosfato e da produção de AIA. Os resultados obtidos apresentaram *Lysinibacillus* RCA3 e *Bacillus* RCA18 como cepas promissoras para pesquisas futuras como bioinoculantes na agricultura, além de fornecer informações sobre a diversidade microbiana presente no solo do Cerrado.

Palavras-chave: RPCP; biofertilizantes; sustentabilidade; rizosfera; Guavira.

ABSTRACT

Agriculture faces several challenges in meeting the growing population demand. With the discovery of rhizobacteria, numerous studies have been conducted to elucidate the mechanisms involved in plant-microorganism interactions and how they can be applied in agriculture to replace chemical pesticides and fertilizers. This study aimed to isolate and evaluate the plant growth-promoting potential of rhizobacteria from Guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg). Rhizosphere samples of *C. adamantium* were used for rhizobacteria isolation and subsequently identified through sequencing of the 16S rRNA region. The isolates were initially tested for their ability to inhibit phytopathogenic fungi (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp., and *Macrophomina phaseolina*). The rhizobacteria that exhibited inhibitory action were further evaluated in a semi-quantitative test. Tests for plant growth-promoting activities were conducted, including inoculation in semi-solid Nfb medium for biological nitrogen fixation, in an insoluble phosphate medium for phosphate solubilization, and a colorimetric test with Salkowski reagent for indole-3-acetic acid (IAA) synthesis. Two rhizobacteria (*Lysinibacillus* RCA3 and *Pseudomonas* RCA8), along with a consortium of both, were tested in vivo on radish plants. The phytopathogens used were partially inhibited by rhizobacteria of the *Bacillus* genus. The isolated rhizobacteria demonstrated in vitro plant growth-promoting potential by providing nutrients through atmospheric nitrogen fixation, phosphate solubilization, and IAA production. The results identified *Lysinibacillus* RCA3 and *Bacillus* RCA18 as promising strains for future research as bioinoculants in agriculture, while also providing insights into the microbial diversity present in Cerrado soil.

Keywords: PGPR; biofertilizers; sustainability; rhizosphere; Guavira.

INTRODUÇÃO

A agricultura enfrenta diversos obstáculos para suprir o crescente aumento populacional. Estiagens, precipitações, variabilidade térmica e ataque de pragas como fitopatógenos e insetos podem prejudicar seriamente a produtividade da agricultura. Portanto é necessário buscar outras vias para o melhoramento do rendimento agrícola, usando sustentavelmente os recursos naturais a custos mais acessíveis (Pretty *et al.*, 2018). O uso de agroquímicos é amplamente empregado na agricultura convencional trazendo consigo a defesa das plantas contra patógenos e a garantia de suprimento de nutrientes, entretanto o uso indevido destes produtos pode ocasionar danos ao ambiente como eutrofização, contaminação do lençol freático e acúmulo nas cadeias tróficas (Camelo; Vera; Bonilla, 2011; Gill *et al.*, 2021; Okon; Antia, 2022).

Diversos trabalhos têm abordado os mecanismos envolvidos na interação planta-microrganismo, a fim de investigar como eles podem ser aplicados na agricultura para substituir pesticidas e fertilizantes químicos, melhorando a produtividade agrícola com menos impacto ambiental (Ghosh *et al.*, 2024; Singh *et al.*, 2023). Um exemplo dessa interação benéfica são as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, apresentando diversos mecanismos que estão associados na melhoria da produção com menos impacto ambiental (Hasan *et al.* 2024).

Rizobactérias são microrganismos associados à rizosfera das plantas podendo até mesmo colonizar os espaços intercelulares do tecido radicular, e que podem contribuir significativamente para o crescimento vegetal. As bactérias rizosféricas podem auxiliar no crescimento das plantas por meio de diversos mecanismos como a fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, fitohormônios e ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico, além de contribuírem na resistência a fatores abióticos (El-Saadony *et al.*, 2022; Marquina; Ramírez; Castro, 2018).

Fósforo, nitrogênio e potássio representam os nutrientes essenciais mais importantes às plantas. O aumento de fertilizantes químicos na agricultura pode garantir a autossuficiência na produção de alimento de um país, contudo, isso traz impactos ao meio ambiente, como o seu acúmulo em corpos d'água e alteração de propriedades do solo por conta da ineficiência das plantas em absorver fertilizantes químicos (Youssef; Eissa, 2014).

A partir do que foi apresentado, as bactérias rizosféricas são microrganismos de interesse para avaliação da aplicação destes organismos na promoção de crescimento vegetal, funcionando como um meio alternativo de fertilização e auxílio da planta. Em síntese, a busca por bactérias rizosféricas se constitui como uma forma de melhorar o rendimento da agricultura e diminuir os impactos de pesticidas e fertilizantes químicos, assegurando uma produção agrícola segura e mais eficiente. O presente trabalho tem como objetivo isolar e avaliar o potencial de crescimento de planta por rizobactérias de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg (Myrtaceae).

OBJETIVOS

Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho é isolar e avaliar o potencial de promoção de crescimento de plantas por rizobactérias isoladas de *C. adamantium*.

Objetivos específicos

- Isolar rizobactérias da planta *C. adamantium*;
- Identificar os isolados bacterianos utilizando a região 16S do rRNA;
- Avaliar o potencial de biocontrole das rizobactérias isoladas contra os fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina*;
- Avaliar o desempenho das rizobactérias na fixação biológica de nitrogênio;
- Avaliar o desempenho das rizobactérias na solubilização de fosfato;
- Avaliar o desempenho das rizobactérias na síntese de Ácido indol acético;
- Inocular as rizobactérias mais promissoras em rabanete (*Raphanus sativus*), para avaliar o desempenho de promoção de crescimento em plantas, bem como a concentração de macro e micronutrientes.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

BIOINSUMOS

Nos dias de hoje pode-se observar os impactos causados ao ambiente pelo constante uso de agroquímicos, e consequentemente a busca por uma agricultura sustentável vem ganhando espaço (Rocha *et al.*, 2024). Bioinsumos são uma alternativa aos agroquímicos tradicionais. São produtos como fitormônios, biofertilizantes, biocontroladores e óleos vegetais, caracterizados por serem oriundos do metabolismo de microrganismos ou de outras fontes orgânicas. São utilizados para melhorar a qualidade da produção agrícola por meio da biofertilização do solo ou do controle de pragas e doenças. Por consequência, essa prática agrícola possui baixo impacto ambiental e à saúde humana justamente por diminuir a dependência por produtos químicos agrícolas (Duque *et al.*, 2024).

O mercado de bioinsumos se desenvolve em vários países, gerando aproximadamente U\$4 bilhões e espera-se que em 2025 esse valor triplique (Almeida *et al.*, 2022). Desde 2020 o Brasil investe e incentiva o uso de bioinsumos por meio do Programa Nacional de Bioinsumos criado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e desde então mais de 500 produtos já foram registrados (Brasil, 2020).

BACTÉRIAS RIZOSFÉRICAS

A rizosfera é a denominação da área de poucos milímetros de solo em contato com as raízes das plantas, e é caracterizada pela expressiva interação

planta-microrganismos por meio de exsudatos radiculares e pela dinâmica biogeoquímica variada. As bactérias que habitam nesta área são chamadas de rizobactérias (Mcneer, 2013). Algumas espécies são capazes de auxiliar as plantas em seu crescimento e desenvolvimento e conseqüentemente são chamadas de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP). Esse termo foi originalmente empregado para uma espécie de *Pseudomonas* por Kloepper *et al.* (1980) e posteriormente se estendeu para todas as rizobactérias que promovem o crescimento da planta (Kapulnik *et al.*, 1981). Atualmente as RPCP são conhecidas e descritas na literatura científica por serem uma alternativa sustentável para pesticidas e fertilizantes químicos, trazendo diversos benefícios à planta e ao solo (De Andrade *et al.*, 2023).

As RPCP podem empregar diferentes processos (Figura 1), podendo ser classificados como direto aqueles que facilitam a absorção de nutrientes pela planta e indireto aqueles que atuam diretamente contra algum fitopatógeno que dificulte o desenvolvimento ideal da planta (Gupta *et al.*, 2015; Oleńska *et al.*, 2023).

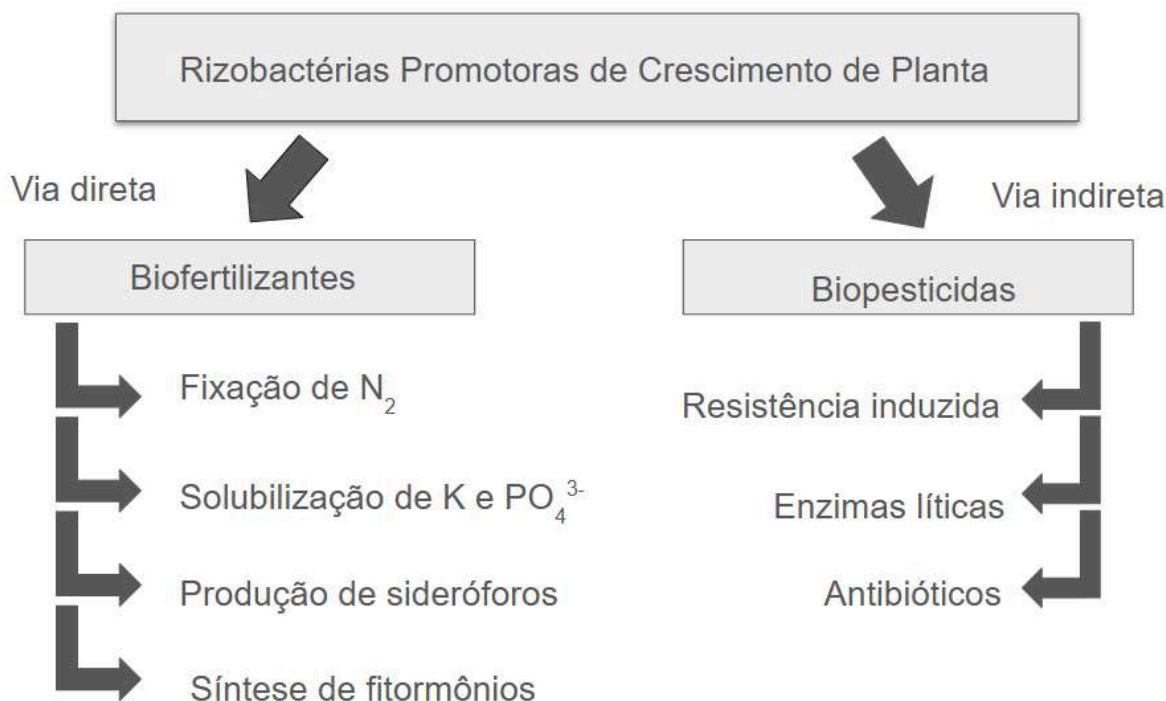


Figura 1 . Mecanismos diretos e indiretos de promoção de crescimento de plantas por rizobactérias

MECANISMOS DIRETOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO

Fixação de nitrogênio

O nitrogênio representa um elemento essencial para os seres vivos, em especial às plantas. A principal fonte de nitrogênio está contida na forma de gás nitrogênio que constitui 78% da atmosfera. Entretanto os organismos vegetais não conseguem absorver o nitrogênio nessa forma pelas raízes, logo necessitam da conversão do dinitrogênio ou diazoto em amônio (NH_4^+) ou amônia (NH_3) por meio da ação de enzima nitrogenase por bactérias (Gupta *et al.*, 2015; Mayz-figueroa, 2004).

Estes organismos são denominados de bactérias fixadoras de nitrogênio e podem ser classificados em dois tipos, baseado na relação ecológica com as plantas: bactérias simbióticas e não simbióticas. O primeiro tipo é constituído por bactérias que estabelecem uma relação mutualista com a planta, em que a fixação de N_2 ocorre no interior de nódulos radiculares (Oleńska *et al.*, 2020).

Em leguminosas a relação ocorre com bactérias da família Rhizobiaceae como os gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* e em árvores e arbustos não leguminosos com o gênero *Frankia* (Frankiaceae) (Ahemad; Kibret, 2014; Gupta *et al.*, 2015). A fixação não simbiótica é realizada por bactérias rizosféricas como cianobactérias (*Anabaena* e *Nostoc*), *Acetobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Paraburkholderia* e *Pseudomonas* (Bhattacharyya; Jha, 2012; Velasco-jiménez *et al.*, 2020).

Solubilização de fosfato

O fósforo possui um papel fundamental em diversos processos vitais para o desenvolvimento e produtividade vegetal como a fotossíntese, divisão celular, transdução de sinais, respiração celular, síntese macromolecular e desenvolvimento

das raízes e do caule (Khan *et al.*, 2010; Nath; Maurya; Meena, 2017; Razaq *et al.*, 2017). A fonte disponível desse elemento para as plantas está no solo na forma de compostos orgânicos, representados por fosfatos de inositol, fosfolipídio e ácidos nucleicos, e compostos inorgânicos como complexos de fosfato com cálcio, alumínio ou ferro (Yadav; Verma, 2012). Contudo, a maior parte deste componente não está em formas solúveis, consequentemente, não podem ser absorvidas pelas raízes (Liang *et al.*, 2019; Pandey; Maheshwari, 2007). Os únicos compostos absorvíveis são os fosfatos mono e dibásico (H_2PO_4 e HPO_4^{2-}) (Alori; Glick; Babalola, 2017; Lugtenberg; Kamilova, 2009).

A solubilização de fosfato é realizada por bactérias rizosféricas por meio de enzimas como fosfatases, fotofosfatase e C-P liase, que agem diretamente em compostos orgânicos contendo fósforo. Outra via é a da quelação de fósforo disponível por meio de grupos hidroxila e carbonila de ácido orgânicos produzidos por rizobactérias, variando a produção dos ácidos de acordo com o exsudato radicular (Molina-Romero *et al.*, 2015). As principais rizobactérias solubilizadoras de fosfato pertencem aos gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus* e *Serratia* (Bhattacharyya; Jha, 2012; De Boer; Wolzak; Sloopweg, 2019).

Síntese de fitormônios

Os hormônios vegetais são moléculas que influenciam o crescimento e desenvolvimento vegetal por meio da sinalização para a expressão de genes relacionados. Essas moléculas possuem funções diversas e são produzidas por todas as partes das plantas, sendo também influenciadas por fatores ambientais (Damam *et al.*, 2016). Rizobactérias são capazes de produzir fitormônios como auxinas, citocininas, giberelinas e etileno, atuando principalmente no desenvolvimento radicular, aumentando a região rizosférica e como resultado maior absorção de nutrientes (Kejela, 2024).

As auxinas são consideradas um grupo de moléculas de extrema importância para a planta. Elas desempenham papéis de desenvolvimento vegetal por meio do

alongamento e da divisão celular, bem como indução da formação de raízes secundárias (Gao; Zhuang; Zhang, 2024). O ácido indol-3-acético (AIA) é a principal auxina encontrada no reino vegetal e está muito bem relacionada com o desenvolvimento radicular (De Angelis *et al.*, 2024). Essa auxina beneficia o sistema radicular pelo aumento do peso, ramificação, tamanho e área superficial das raízes. Outros benefícios são descritos como a função de sinalização e comunicação microrganismo-planta e o incremento da nutrição vegetal (Raheem *et al.*, 2018). Rizobactérias produzem AIA principalmente pela via do triptofano, aminoácido comumente encontrado nos exsudatos radiculares, através da transformação indol-3-pirúvico e indol-3-aldeído (Zhang *et al.*, 2019).

Citocininas promovem a divisão e formação de folhas e raízes adventícias, além de atrasar a senescência. São formadas geralmente pela substituição do grupo N₆-Metiladenosina da adenina por um isoprenoide ou uma lateral aromática. Atualmente são conhecidas mais de 30 citocinas produzidas por rizobactérias, entre elas pode-se citar a cinetina, zeatina e isopenteniladenina (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

As giberelinas formam um enorme complexo com mais de 130 moléculas descobertas que estão relacionadas com o alongamento do caule, floração, formação de frutos e germinação das sementes (Kang *et al.*, 2017). Diversas giberelinas produzidas por rizobactérias são utilizadas atualmente para germinação de sementes (Molina-Romero *et al.*, 2015).

O etileno é um hormônio de suma importância para a planta em decorrência da ampla variedade de funções executadas por este fitormônio, que em altas concentrações promove a queda foliar, resultando em uma perda da produtividade do campo. Outras funções descritas são o amadurecimento dos frutos, germinação das sementes e síntese de outros fitormônios (Tipu; Sherif, 2024). A vida útil da planta é prolongada por meio da expressão de genes envolvidos com a reprodução e a longevidade dos órgãos (Barnawal *et al.*, 2017).

Algumas rizobactérias são capazes de produzir o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminase, que promove a conversão desse ácido, o precursor do etileno, em amônia e α -cetobutirato, auxiliando a manutenção

da quantidade de etileno disponível na planta (Shen *et al.*, 2012; Barnawal *et al.*, 2017).

Outros mecanismos indiretos

O potássio é um importante componente para a síntese de proteínas e enzimas, absorção de nitrogênio, transporte de açúcares e ainda está relacionado com a fotossíntese e trocas gasosas por meio do controle da turgidez das células guarda dos estômatos, permitindo e controlando a passagem de gases fundamentais à planta (Ahmad; Zargar, 2017). No solo, o potássio está disponível em baixas concentrações e é encontrado principalmente na forma de minerais de silicato e rochas insolúveis, que podem ser solubilizados por rizobactérias por meio da produção de ácidos orgânicos (Gupta *et al.*, 2015).

O ferro é um micronutriente de suma importância para os seres vivos, embora seja um elemento extremamente abundante no planeta. No solo sob condições aeróbicas, ele é encontrado majoritariamente na forma de íon férrico (Fe^{3+}), tendo uma baixa absorção pelos seres vivos (Gupta *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2019).

A disponibilização de ferro se dá por meio da quelação e sequestro de ferro, reduzindo-o ao íon Fe^{2+} por compostos de baixo peso molecular denominados sideróforos, que podem ser produzidos por rizobactérias. Esses compostos podem representar uma vantagem competitiva por parte das rizobactérias pela fácil captura e absorção do ferro (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

Algumas rizobactérias conseguem envolver as raízes com um biofilme formado por exopolissacarídeos, formando uma complexa camada celular bacteriana envolta de uma matriz extracelular polimérica (Talbi *et al.*, 2023). O filme produzido traz diversos benefícios como proteção contra a dessecação, fitopatógenos e estresse ambiental, promove a movimentação de nutrientes essenciais ao crescimento e desenvolvimento vegetal ideal (Gupta *et al.*, 2015), além de estar relacionados com a sinalização e indução da resposta defensiva da planta contra infecções (Gupta *et al.*, 2017).

MECANISMOS INDIRETOS DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO

Outra linha de defesa proporcionada por rizobactérias é a produção de enzimas líticas. Para hidrolisar material de origem vegetal, várias rizobactérias utilizam uma diversidade de enzimas como celulases, proteases, glucanases, lipases, fosfatases, desidrogenase, pectinases, quitinases e exo e endo-poligalacturonase (Galani; Chauhan; Gohel, 2024).

Estas enzimas podem ser secretadas contra a ação de patógenos como: *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani* e *Phytophthora* sp. (Gupta *et al.*, 2015).

A resistência induzida consiste na potencialização do sistema imune vegetal mediante à estímulos ambientais, induzindo o incremento das capacidades defensivas da planta frente a pressões bióticas (Devi *et al.*, 2024). Esta interação é mediada pela sinalização do gás etileno e do ácido jasmônico, que induzem na planta uma série de processos envolvidos na defesa vegetal como a produção de fitoalexinas antimicrobianas, β -1,3-glucanase, peroxidase, biossurfactantes, quitinase, fenilalanina amônia-liase e espessamento da parede celular (Sunar *et al.*, 2015). As rizobactérias detêm a capacidade de produzir flagelos, sideróforos, lipopolissacarídeos, acetoina, 2,4-diacetilfloroglucinol, 2,3-butanodiol, lipopeptídeos cíclicos, ácido salicílico e lactonas homoserina (Doornbos; Van Loon; Bakker, 2012; Molina-Romero *et al.*, 2015).

Contra fitopatógenos, a síntese de antibióticos por rizobactérias é o processo mais estudado para o seu uso contra ameaças bióticas às plantas. Os antibióticos produzidos podem inibir outros organismos por meio de vários processos, dentre eles pode-se observar a desestabilização da parede celular, bem como a supressão de sua síntese, e bloqueio da tradução de proteínas (Fischer; López-Ramírez; Asconapé, 2024).

Na literatura são descritos diversos antibióticos como: oomicina-A, kanosamina, tensina, 2,4-diacetilfloroglucinol, fenazina, xantobaccina, oligomicina, pirrolnitrina, tropolona, entre outros (Odoh, 2017). Os principais gêneros estudados para a antibiose são *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas* e *Streptomyces* (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

Campomanesia adamantium

Campomanesia adamantium é um arbusto perene da família Myrtaceae encontrado no Cerrado brasileiro e em outros países (Crispim *et al.* 2021). Possui diversos usos pela população e no que se diz respeito à medicina popular, várias partes da planta são utilizadas possuem uso terapêutico como antidiarreico, anti-inflamatório, antirreumático e no uso para cistite e uretrite (Machate *et al.* 2021).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, M.; ZARGAR, M. Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) in rhizospheric soils of apple (*Malus domestica* Borkh.) in temperate Kashmir. **Journal of Applied Life Sciences International**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2017. <https://doi.org/10.9734/JALSI/2017/36848>
- AHEMAD, M.; KHAN, M. S.. Functional aspects of plant growth promoting rhizobacteria: recent advancements. **Insight Microbiol**, v. 1, n. 3, p. 39-54, 2011. DOI: 10.5567/IMICRO-IK.2011.39.54
- ALMEIDA, A. S. et al. Biological inputs, more economy and greater sustainability. In: **Colloquium Agrariae**. 2022. DOI: 10.5747/ca.2022.v18.n4.a507
- ALORI, E. T.; GLICK, B. R.; B., Olubukola O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 971, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- ANSARI, F. A.; AHMAD, I.. Isolation, functional characterization and efficacy of biofilm-forming rhizobacteria under abiotic stress conditions. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 112, n. 12, p. 1827-1839, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01306-3>
- ASHRY, N. M. et al. Utilization of drought-tolerant bacterial strains isolated from harsh soils as a plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 3, p. 1760-1769, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.10.054>
- BARNAWAL, D. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. **Physiologia plantarum**, v. 161, n. 4, p. 502-514, 2017. <https://doi.org/10.1111/ppl.12614>
- BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**, v. 35, p. 1044-1051, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000600020>
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 1327-1350, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9>

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Bioinputs. Brasília, 2020. Disponível em <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inovacao/bioinsumos>

CAMELO, M.; VERA, S. P.; BONILLA, R. R.. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. **Ciencia y tecnología agropecuaria**, v. 12, n. 2, p. 159-166, 2011. https://doi.org/10.21930/rcta.vol12_num2_art:227

CRISPIM, Bruno do Amaral et al. Genetic diversity of *Campomanesia adamantium* and its correlation with land use and land cover. **Diversity**, v. 13, n. 4, p. 160, 2021. <https://doi.org/10.3390/d13040160>

DAMAM, M. et al. Plant growth promoting substances (phytohormones) produced by rhizobacterial strains isolated from the rhizosphere of medicinal plants. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 37, n. 1, p. 130-136, 2016.

DE ANDRADE, L. A. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria for sustainable agricultural production. **Microorganisms**, v. 11, n. 4, p. 1088, 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041088>

DE ANGELIS, M. et al. The Role of Auxin in Root Growth and Development. In: **Plant Roots**. CRC Press. p. 199-210.

De Boer, M. A., Wolzak, L., & Slootweg, J. C. (2019). Phosphorus: reserves, production, and applications. **Phosphorus recovery and recycling**, 75-100. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8031-9_5

DEVI, T. S. et al. Induced Resistance in Fruit and Vegetable Enhancing Host Defence to Control Post-harvest Diseases, 2024 : <https://doi.org/10.9734/acri/2024/v24i10939>.

DOORNBOS, R. F.; VAN LOON, L. C.; BAKKER, P. A. H. M. Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 227-243, 2012. <https://doi.org/10.1007/s13593-011-0028-y>

DUQUE, T. S. et al. Herbicides and bio-inputs: Compatibility and challenges for sustainable agriculture. **Chemosphere**, v. 369, p. 143878, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.143878>

EL-SAADONY, M. T. et al. Plant growth-promoting microorganisms as biocontrol agents of plant diseases: Mechanisms, challenges and future perspectives. **Frontiers in plant science**, v. 13, p. 923880, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.923880>

FISCHER, S.; LÓPEZ-RAMÍREZ, V.; ASCONAPÉ, J.. Historical advancements in understanding bacteriocins produced by rhizobacteria for their application in agriculture. **Rhizosphere**, p. 100908, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2024.100908>

GALANI, B.; CHAUHAN, J.; GOHEL, S. Role of rhizospheric microbial enzymes in plant growth promotion, antagonism, and sustainable agriculture: A review. **Trends in Horticulture**, v. 7, n. 2, p. 4902, 2024. <https://doi.org/10.24294/th.v7i2.4902>

GAO, J.; ZHUANG, S.; ZHANG, W.. Advances in plant auxin biology: synthesis, metabolism, signaling, interaction with other hormones, and roles under abiotic stress. **Plants**, v. 13, n. 17, p. 2523, 2024. <https://doi.org/10.3390/plants13172523>

GHOSH, A. et al. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Potential Alternative Tool for Sustainable Agriculture. In: **Updates on Rhizobacteria**. IntechOpen, 2024. DOI: 10.5772/intechopen.1004252

GILL, R. et al. Agrochemicals in Soil and Environment: An Overview. **Agrochemicals in Soil and Environment: Impacts and Remediation**, p. 3-24, 2022. https://doi.org/10.1007/978-981-16-9310-6_1

GLICK, B. R. et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 26, n. 5-6, p. 227-242, 2007. <https://doi.org/10.1080/07352680701572966>

GUPTA, G. et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. **J Microb Biochem Technol**, v. 7, n. 2, p. 096-102, 2015. <http://dx.doi.org/10.4172/1948-5948.1000188>

GUPTA, G.; SNEHI, S. K.; SINGH, V.. Role of PGPR in biofilm formations and its importance in plant health. **Biofilms in plant and soil health**, p. 27-42, 2017. <https://doi.org/10.1002/9781119246329.ch2>

HASAN, A. et al. Role of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as a plant growth enhancer for sustainable agriculture: A review. **Bacteria**, v. 3, n. 2, p. 59-75, 2024. <https://doi.org/10.3390/bacteria3020005>

KANG, S.-M. et al. Gibberellins and indole-3-acetic acid producing rhizospheric bacterium *Leifsonia xyli* SE134 mitigates the adverse effects of copper-mediated stress on tomato. **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 373-380, 2017. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1370142>

KAPULNIK, Y. et al. Effects of temperature, nitrogen fertilization, and plant age on nitrogen fixation by *Setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilense* (strain cd). *Plant Physiology*, v. 68, n. 2, p. 340-343, 1981. <https://doi.org/10.1104/pp.68.2.340>

KEJELA, T. Phytohormone-Producing Rhizobacteria and Their Role in Plant Growth. 2024.

KHAN, M. S. et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi—current perspective. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 56, n. 1, p. 73-98, 2010. <https://doi.org/10.1080/03650340902806469>

KLOPPER, J. W. et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, v. 286, n. 5776, p. 885-886, 1980. <https://doi.org/10.1038/286885a0>

KOZUSNY-ANDREANI, D. I.; AGIADO, J. C.; JUNIOR, R. A.. Efeito de bactérias rizosféricas sobre o desenvolvimento da cenoura. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 12, n. 1, p. 211-220, 2014. <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v12i1.1368>

LIANG, J. et al. A subcompatible rhizobium strain reveals infection duality in *Lotus*. **Journal of experimental botany**, v. 70, n. 6, p. 1903-1913, 2019. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz057>

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F.. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162918>

MA, J. F.. Plant root responses to three abundant soil minerals: silicon, aluminum and iron. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 4, p. 267-281, 2005. <https://doi.org/10.1080/07352680500196017>

MACHATE, D. J. et al. High concentration of heavy metal and metalloid levels in edible *Campomanesia adamantium* pulp from anthropic areas. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 11, p. 5503, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijerph18115503>

MARQUINA, M. E.; RAMÍREZ, Y.; CASTRO, Y.. Efecto de bacterias rizosféricas en la germinación y crecimiento del pimentón *Capsicum annuum* L. Var. cacique gigante. **Bioagro**, v. 30, n. 1, p. 3-16, 2018.

MAYZ-FIGUEROA, J.. Fijación biológica de nitrógeno. **Revista Científica UDO Agrícola**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2004.

MCNEAR JR, D. H. The Rhizosphere-Roots. **Soil and Everything In**, 2013.

MOLINA-ROMERO, D. et al. Mecanismos de fitoestimulación por rizobacterias, aislamientos en América y potencial biotecnológico. **Biológicas**, v. 17, n. 2, p. 24-34, 2015.

NATH, D., MAURYA, B. R., & MEENA, V. S. (2017). Documentation of five potassium-and phosphorus-solubilizing bacteria for their K and P-solubilization ability from various minerals. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 10, 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.03.007>

ODOH, C. K.. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiolology. A review. **Int J Adv Res Biol Sci**, v. 4, n. 5, p. 123-142, 2017. <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.05.014>

OKON, O. G.; ANTIA, U. E.. Plants and soil microbiota health implications of agrochemicals: potential alternatives for the safe propagation of food crops. In: **One Health Implications of Agrochemicals and their Sustainable Alternatives**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 441-460. https://doi.org/10.1007/978-981-99-3439-3_16

OLEŃSKA, E. et al. Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of the Total Environment**, v. 743, p. 140682, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140682>

PANDEY, P.; MAHESHWARI, D. K. Two-species microbial consortium for growth promotion of Cajanus cajan. **Current science**, p. 1137-1142, 2007.

PRETTY, J. et al. Global assessment of agricultural system redesign for sustainable intensification. **Nature Sustainability**, v. 1, n. 8, p. 441-446, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41893-018-0114-0>

RAHEEM, A. et al. Auxin production by rhizobacteria was associated with improved yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 64, n. 4, p. 574-587, 2018. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1362105>

RAZAQ, M. et al. Influence of nitrogen and phosphorous on the growth and root morphology of Acer mono. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0171321, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171321>

ROCHA, T. M et al. Agricultural Bioinputs Obtained by Solid-State Fermentation: From Production in Biorefineries to Sustainable Agriculture. **Sustainability**, v. 16, n. 3, p. 1076, 2024. <https://doi.org/10.3390/su16031076>

SINGH, A. et al. Enhancing plant growth promoting rhizobacterial activities through consortium exposure: a review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, p. 1099999, 2023. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1099999>

SUNAR, K. et al. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. **Journal of basic microbiology**, v. 55, n. 1, p. 91-104, 2015. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300227>

TALBI, C. et al. Bacterial exopolysaccharides: from production to functional features. **Progress In Microbes & Molecular Biology**, v. 6, n. 1, 2023. <https://doi.org/10.36877/pmmb.a0000384>

TIPU, M. M.H.; SHERIF, S. M. Ethylene and its crosstalk with hormonal pathways in fruit ripening: mechanisms, modulation, and commercial exploitation. **Frontiers in Plant Science**, v. 15, p. 1475496, 2024. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1475496>

VAFADAR, F.; AMOOAGHAIE, R.; OTROSHY, M.. Effects of plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungus on plant growth, stevioside, NPK, and chlorophyll content of *Stevia rebaudiana*. **Journal of Plant Interactions**, v. 9, n. 1, p. 128-136, 2014. <https://doi.org/10.1080/17429145.2013.779035>

VELASCO-JIMÉNEZ, A. et al. Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. **Terra Latinoamericana**, v. 38, n. 2, p. 333-345, 2020.

YADAV, B.; VERMA, Arvind. Phosphate solubilization and mobilization in soil through microorganisms under arid ecosystems. **The functioning of ecosystems. Rijeka: Intech**, p. 93-108, 2012.

YOUSSEF, M. M. A.; EISSA, M. F. M. Biofertilizers and their role in management of plant parasitic nematodes. A review. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2014.

ZHANG, Pengfan et al. 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. <https://doi.org/10.3390/molecules24071411>

ZHANG, X. et al. The adaptive mechanism of plants to iron deficiency via iron uptake, transport, and homeostasis. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 10, p. 2424, 2019. DOI: 10.3390/ijms20102424

Capítulo 1

Análise do Potencial de Promoção de Crescimento de Plantas por Rizobactérias Isoladas de *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg

Conforme as normas da revista European Journal of Soil Science and Plant Nutrition

Análise do Potencial de Promoção de Crescimento de Plantas por Rizobactérias Isoladas de *Campomanesia adamantium* (Cambess) O. Berg

Alfred Werner Medina Loosli^{1*}, Yan Hideki Uehara², Priscila Quevedo Monteiro Garcez¹, Tiago Tognolli de Almeida^{1,3}

¹Universidade Católica Dom Bosco, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Universidade Católica Dom Bosco, Graduação em Biomedicina, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica, Maringá, Paraná, Brasil.

*Correspondence: amedinaloosli@gmail.com

Resumo

A rizosfera de uma planta consiste em uma região do solo que envolve a superfície das raízes, caracterizada por ser fortemente influenciada pela planta, sendo habitat de diversos microrganismos. As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) têm ganhado destaque como agentes no biocontrole de doenças e pestes agrícolas e como biofertilizantes. O objetivo do trabalho foi isolar e avaliar o potencial de promoção de crescimento de plantas por rizobactérias de Guavira (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg). Amostras da rizosfera de *C. adamantium* foram utilizadas para o isolamento das rizobactérias, e posteriormente identificadas por meio do sequenciamento da região 16S do rRNA. Os isolados foram inicialmente testados quanto a sua capacidade de inibição de fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina*). As rizobactérias que apresentaram ação inibitória foram avaliadas em teste semiquantitativo. Testes para atividades de promoção de crescimento foram conduzidos: inoculação em meio Nfb semissólido para a fixação biológica de nitrogênio e em meio fosfato insolúvel para a solubilização de fosfato, além do teste colorimétrico com o reagente de Salkowski para a síntese de ácido indolacético (AIA). *Lysinibacillus* RCA3 e *Pseudomonas* RCA8, além de um consórcio entre elas, foram testadas *in vivo* em rabanete. Os fitopatógenos utilizados foram parcialmente inibidos por rizobactérias do gênero *Bacillus*. As rizobactérias isoladas apresentaram capacidade de promoção de crescimento *in vitro* por meio da disponibilização de nutrientes como fixação de nitrogênio atmosférico e solubilização de fosfato e da produção de AIA. *Lysinibacillus* RCA3 e *Bacillus* RCA18 apresentaram resultados promissores para pesquisas futuras como bioinoculantes na agricultura, uma vez que são bactérias pertencentes a gêneros já utilizados em pesquisas de promoção de crescimento.

Palavras chave: Bioinsumos; Biocontrole; rizosfera; fungos fitopatogênicos;

Introdução

Anualmente a produção global de alimentos do setor agrícola sofre perdas severas que ultrapassam US\$500 bilhões. Mais da metade das perdas pelo mundo são ocasionadas por invertebrados, ervas-daninhas e pelas condições meteorológicas. O restante do impacto é causado por doenças microbianas, com destaque aos fungos fitopatogênicos, capazes de infligir danos significativos a importantes culturas (Watkinson et al., 2015). No século passado, a agricultura experimentou um imenso desenvolvimento com a implementação de diversos recursos: a revolução verde. Tal processo trouxe a abordagem do uso de agroquímicos sintéticos que permitiram alavancar a produção agrícola. Em contrapartida, o seu uso trouxe consequências danosas à saúde do ambiente (Basu et al., 2021), tornando a agricultura uma das principais atividades humanas poluentes pelo uso de fertilizantes e pesticidas químicos (Vejan et al. 2016).

A rizosfera de uma planta consiste em uma região do solo diretamente acima da superfície das raízes. É caracterizada por ser fortemente influenciada pela planta, além de ser habitat de diversos microrganismos que se beneficiam dessa influência, com destaque as rizobactérias (Bibi et al. 2023). Algumas dessas rizobactérias são capazes de melhorar o desenvolvimento e crescimento da planta por meio de diversos mecanismos, sendo, portanto denominadas rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP)(Oleńska et al. 2020). Tais mecanismos podem ser diretos, em que a RPCP melhora o desenvolvimento vegetal por meio da disponibilização de algum nutriente ou molécula de importância a planta, como as formas solúveis de nitrogênio e fosfato, além de fitohormônios como ácido indolacético e ácido giberélico, ou até mesmo pela redução dos níveis de etileno. A via indireta envolve a proteção da planta contra fitopatógenos por meio da secreção de compostos como antibióticos, cianeto de hidrogênio, pela competição por nutrientes e até mesmo pela indução da defesa sistêmica da planta (Danish et al. 2024).

O Cerrado brasileiro possui uma flora imensa com mais de 12000 espécies, sendo 33% endêmicas, e uma delas amplamente encontrada nesse bioma é a guavira ou guabiroba (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O.Berg) (Crispim et al. 2021). É uma planta de grande importância na medicina popular por apresentar diversas propriedades terapêuticas como anti-inflamatória, antidiarreica, antirreumática e hipocolesterolêmica (de Araújo et al. 2023).

Por conta dos efeitos danosos dos pesticidas e fertilizantes químicos ao ambiente e até mesmo ao ser humano, as RPCP têm ganhado destaque como biocontroladores de doenças e pragas agrícolas, além de melhorar a qualidade e fertilidade do solo como biofertilizantes. O objetivo do presente trabalho envolve o isolamento de bactérias rizosféricas de *Campomanesia adamantium* e a avaliação do potencial de antagonismo contra fitopatógenos fúngicos e disponibilização de nutrientes.

Metodologia

Isolamento Das Bactérias Rizosféricas

Amostras da rizosfera de *C. adamantium* foram obtidas retirando cuidadosamente pedaços da raiz com solo rizosférico aderido a ela e os armazenando em tubos falcon estéreis. A coleta foi conduzida no Centro de

Pesquisa e Capacitação da AGRAER (CEPAER), em Campo Grande, MS (537 m de altitude; 20° 27' S; 54° 37' W).

As amostras de solo acondicionadas em tubos falcon foram misturadas em 2 mL de solução tampão salina tamponada com fosfato (PBS) (em g/L: NaCl, 8,0 g; KCl, 0,2 g; Na₂HPO₄, 1,44g; KH₂PO₄, 0,24g; água destilada) e agitadas com auxílio de agitador vórtex por 30 segundos. Em seguida efetuou-se uma diluição seriada com fator 10⁶. Ao final, 20 µL da diluição final foram adicionados em meio de cultura sólido Ágar Triptona de Soja (TSA) espalhados com alça de Drigalski pelo meio. As placas foram incubadas a 28°C por 24 horas em incubadora D.B.O para purificação posterior das colônias isoladas. As colônias bacterianas foram purificadas por meio da técnica de esgotamento por estrias composta. As colônias puras obtidas foram preservadas a -20 em congelador em após serem cultivadas em Caldo Triptona de Soja (TSB) e misturadas com glicerol em uma proporção de 1:1. Repique contínuo em TSB também foi realizado.

Identificação Molecular Dos Isolados Bacterianos

Extração de DNA Bacteriano

Todos os isolados bacterianos obtidos após a purificação foram cultivados em 5 mL Caldo de Lisogenia (LB/Luria-Bertani), e incubados por 24 horas a 28°C em incubadora D.B.O sob constante agitação. Após a incubação, 500 µL de cada cultura bacteriana foram centrifugadas a 10000 g por 2 minutos após a adição 200 µL de tampão A (Triton x-100 0,4 mL; Dodecil sulfato de sódio 10% 2 mL; NaCl 5M 0,4 mL; Tampão TRIS 0,2 mL; EDTA 0,04 mL; !6,960 mL), 200 µL de fenol e 0,5 g de sílica (0,1 mm). Em seguida, as amostras foram agitadas com agitador vórtex por 3 minutos, e em seguida, foram adicionados 200 µL de tampão TE.

A solução obtida foi centrifugada por 10 minutos a 12000, 400 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde adicionou-se 1 mL de álcool absoluto. A solução foi novamente centrifugada sob as mesmas condições; O sobrenadante foi inteiramente descartado e adicionou-se 1 mL de álcool absoluto, 10 µL de acetato de amônio e 400 µL de Tampão TE. Novamente as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartado; As amostras foram postas para secagem em temperatura ambiente. Por fim, 40 µL de água ultrapura foram adicionados e as amostras foram acondicionadas em refrigerador a -20°C.

Amplificação da região 16S e identificação

A amplificação da região 16S rRNA foi efetuada por meio das reações de PCR que utilizaram os iniciadores fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'), e a reação foi realizada nas seguintes condições: 2 µL de MgCl₂, 0,5 µL de dNTP, 1 µL de cada iniciador, 0,3 µL de Taq DNA polimerase, 2,5 µL de Tampão, 2 µL de DNA e por fim, água ultrapura para completar o volume final de 25 µL. A região 16S rRNA foi amplificado com desnaturação inicial de 10 minutos a 94° C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94° C; 1 minuto a 62,5° C; 1 minuto a 72° C, e uma extensão final de 7 minutos a 72° C em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems).

O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer equipado com capilares de 50 cm e polímero POP7 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas por meio da ferramenta Blastn com as sequências depositadas nas bases de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a fim de identificar os isolados rizosféricos ao menos em nível de gênero.

Teste De Antagonismo

As rizobactérias isoladas foram testadas quanto a sua capacidade de inibição de fungos fitopatogênicos (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp. e *Macrophomina phaseolina*). Os fungos utilizados são provenientes do Laboratório de Microrganismos Endofíticos da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB). Inicialmente, um teste preliminar qualitativo foi feito a fim de triar rizobactérias potencialmente antagonistas. Em placas de Petri contendo Ágar Batata Dextrose (BDA), um pedaço de 0,5 cm de micélio dos fitopatógenos, previamente cultivados em meio BDA por 7 dias a 24°C, foram inoculados no centro, além disso os isolados rizosféricos foram inoculados de maneira a formar uma reta em pólos opostos da placa (Fig. 1)

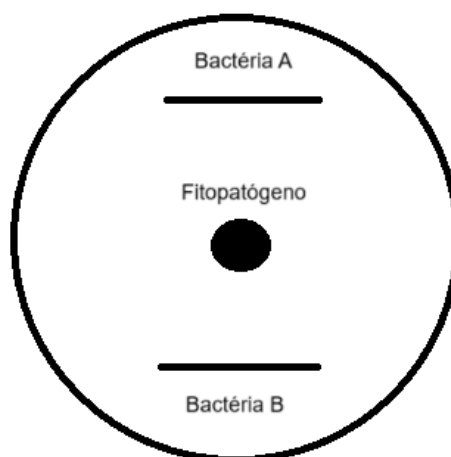


Fig. 2 Delineamento do teste qualitativo de antagonismo contra fitopatógenos

As rizobactérias que apresentaram capacidade de antagonismo, ou seja, inibiram de alguma forma o crescimento do fungo, foram selecionadas para um teste semiquantitativo. As rizobactérias selecionadas foram cultivadas em caldo LB por 24 horas a 28°C. Com auxílio da escala de McFarland, 10 µl da solução com concentração bacteriana de 10⁸ células/ml foi inoculada a 1,5 cm de distância da borda de da placa de Petri de 9 cm contendo BDA, e ao centro da placa foi posto 0,5 cm de micélio do fitopatógeno. Os microrganismos foram mantidos em incubadora D.B.O a 28 °C por sete dias. O índice de antagonismo (IA) foi calculado conforme a seguinte fórmula:

$$IA = 100 - \{X1/[(X2 + X2' + X2'')/3] \times 100\}$$

Em que X1 corresponde à distância do centro de crescimento do fitopatógeno até o isolado bacteriano e X2 corresponde ao crescimento para a direção oposta e para as laterais do fitopatógeno.

Fixação Biológica De Nitrogênio

A capacidade de fixação de nitrogênio das rizobactérias de acordo com Araújo et al. (2010), com modificações, utilizando o meio Nfb semissólido, de composição em g/L: ácido málico, 5 g; K_2HPO_4 , 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; NaCl, 0,1 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,02 g; solução de micronutrientes ($CuSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,02 g; $7nSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,6 g; H_3BO_3 , 0,7 g; $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$, 0,5 g $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,5875 g; Água destilada), 2 mL; solução de azul de bromotimol (Azul de bromotimol, 0,25 g; etanol, 25 mL; água destilada, 25 mL), 2 mL; 4M FeEDTA (1,64%), 4 mL; solução de vitaminas (biotina, 0,05 g; pirodoxina, 0,01 g; água destilada), 1 mL; KOH - 4,50 g; Ágar - 1,80 g; pH - 6.8 (ajustado com NaOH). As rizobactérias foram incubadas em 5 mL do meio em triplicatas e mantidas em incubadora D.B.O por 72 horas a 28 °C. A leitura dos resultados foi feita levando em consideração a alteração da cor inicial do meio de verde para azul e a formação de um anel de crescimento bacteriano na parte superior do meio.

Solubilização De Fosfato

A avaliação qualitativa da capacidade de solubilização de fosfato foi realizada com um meio fosfato insolúvel de composição de g/L: glicose, 10 g; NH_4Cl , 5 g; NaCl, 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g; $CaHPO_4$, 0,8 g; ágar, 15 g; pH, 7,2, ajustado com uso de NaOH e HCl. As rizobactérias foram inoculadas em quadruplicatas incubadas a 28°C por 24 horas. O índice de solubilização (IS) foi obtido por meio da razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia: $IS = \text{diâmetro do halo} / \text{diâmetro da colônia}$.

Síntese de AIA

Para averiguar a síntese bacteriana de ácido indolacético (AIA), um teste colorimétrico foi realizado utilizando o reagente de Salkowski. As rizobactérias foram testadas tanto na presença quanto na ausência de triptofano, utilizado como um precursor de AIA. Os isolados foram cultivados em caldo de triptona soja (TSB), com e sem suplementação de 5mM de L-triptofano, por 72 horas a 37 °C sob constante agitação.

Após o cultivo, as amostras foram centrifugadas a 12000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e misturado com reagente de salkowski (Gordon e Weber 1951), em uma proporção de 1:2, e mantido no escuro por 30 minutos. A coloração rosa da solução indicou a produção de AIA. A quantificação de AIA produzido foi estimado pela leitura das amostras em espectrofotômetro com absorbância de 530nm, seguindo a equação: $x = (y + 0,069)/0,003$, em que x corresponde à concentração de AIA em mg/ml e y corresponde à absorbância.

Teste *in vivo* em hortaliça

Para o teste *in vivo*, foram utilizadas sementes de rabanete (*Raphanus sativus*) Feltrin Sementes®. O experimento foi conduzido em bandeja de poliestireno expandido, desinfetadas com álcool 70%, de 14 cm x 14 cm e 2 cm de altura, contendo 28 g de substrato para plantas Carolina Soil® classe interna LXXXVI. As rizobactérias RCA3 e RCA8 apresentaram resultados positivos nos testes anteriores, a primeira apresentou fixação de nitrogênio, síntese de AIA e solubilização de fosfato e a segunda demonstrou síntese de AIA e alta solubilização de fosfato, logo, foram selecionadas para o teste *in vivo*. Portanto, o delineamento experimental consiste em cinco repetições do controle e de três tratamentos; dois dos quais com as rizobactérias individualmente e um terceiro com um consórcio das duas.

As rizobactérias escolhidas foram inoculadas em caldo LB por 24 horas, até atingirem a concentração de 10^8 células bacterianas/mL na escala de McFarland. 6,75 g de semente por bandeja foram inoculados com a solução bacteriana durante meia hora. Em seguida, foram semeadas no substrato uniformemente e mantidas sob iluminação com fotoperíodo de 12 horas. As bandejas foram irrigadas com cerca de 60 ml de água duas vezes ao dia. Após sete dias, 10 exemplares de cada bandeja foram colhidos, totalizando 50 plantas por tratamento; a parte aérea e a raiz foram medidos e pesados separadamente. Em seguida, foram mantidos em incubadora D.B.O por sete dias para se obter o peso seco.

Análise de macro e micronutrientes

A fim de avaliar a concentração de macro e micronutrientes dos rabanetes cultivados do teste *in vivo*, 100 gramas da parte aérea de cada tratamento foram colhidos e analisados pela empresa Solos Laboratório de Análise de Solo e Consultoria LTDA (Tabela 1). Os nutrientes avaliados, juntamente com seus respectivos métodos, foram os seguintes:

Tabela 1 Nutrientes avaliados e os respectivos métodos empregados na análise

Nutriente	Método	Digestão
Nitrogênio	Destilação – titulação (Kjeldahl)	Digestão $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ (Kjeldahl)
Fósforo	Espectrofotometria – amarelo-de-vanadato	Digestão úmida $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (2:1)
Potássio	Determinação de potássio por fotometria de chama	Digestão úmida $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (2:1)
Cálcio e magnésio	Espectrofotometria de absorção atômica para cálcio e magnésio	Digestão úmida $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (2:1)
Enxofre	Turbimetria do sulfato de bário	Digestão úmida $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (2:1)
Boro	Colorimetria da azometina H	Digestão úmida $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$ (2:1)
Ferro	Espectrofotometria de absorção	Digestão úmida $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$

	atômica EAA	(2:1)
Manganês	Espectrofotometria de absorção atômica EAA	Digestão úmida HNO ₃ + HClO ₄ (2:1)
Cobre	Espectrofotometria de absorção atômica EAA	Digestão úmida HNO ₃ + HClO ₄ (2:1)
Zinco	Espectrofotometria de absorção atômica EAA	Digestão úmida HNO ₃ + HClO ₄ (2:1)

Estatística

Análise de variância (ANOVA) e teste Scott-Knott ($p < 0,005$) foram utilizados para a análise estatística e foram realizadas em R (Versão 4.2.3), com o pacote “ScottKnott”. Os dados analisados foram provenientes dos testes de IA, solubilização de fosfato, síntese de AIA e *in vivo*.

Resultados

Isolamento e Identificação Molecular Dos Isolados Bacterianos

Ao total 18 isolados bacterianos foram obtidos. O sequenciamento da região 16S do rRNA permitiu, por meio do algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) do banco de dados GenBank, identificar 18 isolados rizosféricos pertencentes a 6 gêneros (Tabela 2), em que *Bacillus*, *Priestia*, *Lysinibacillus*, *Sporosarcina* e *Paenibacillus* pertencem a ordem Bacillales (Bacilli: Bacillota) e *Pseudomonas* a Pseudomonadales (Gammaproteobacteria: Pseudomonadota). Os percentuais de identidade variaram entre 71,78 % a 97,48 %. Os isolados receberam o código RCA de 1 a 18.

Tabela 2 Identificação das rizobactérias isoladas de *C. adamantium* com base no banco de dados GenBank

Rizobactéria isolada	Linhagem mais próxima no GenBank	Percentual de identidade	Cobertura de consulta	Valor E	Código GenBank
RCA1	<i>Bacillus cereus</i>	88,46%	49%	9e-05	MF356911.1
RCA2	<i>Priestia megaterium</i>	95,81%	91%	0.0	KX495237.1
RCA3	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	84,37%	85%	0.0	LT601210.2
RCA4	<i>Sporosarcina luteola</i>	96,50%	94%	0.0	MN589774.1
RCA5	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	71,78%	85%	1e-112	OK178961.1

RCA6	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	86,19%	85%	0.0	KU360712.1
RCA7	<i>Bacillus</i> sp.	86,86%	85%	0.0	MT279327.1
RCA8	<i>Pseudomonas putida</i>	96,51%	92%	0.0	KF030902.1
RCA9	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	92,58%	93%	0.0	JQ579623.1
RCA10	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	94,23%	93%	0.0	DQ095888.1
RCA11	<i>Bacillus cereus</i>	85,92%	86%	0.0	MT814323.1
RCA12	<i>Bacillus</i> sp.	97,48%	97%	0.0	MG266313.1
RCA13	<i>Bacillus</i> sp.	95,57%	93%	0.0	MH093501.1
RCA14	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	94,57%	91%	0.0	MG778850.1
RCA15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	87,10%	94%	6e-117	JN999856.1
RCA16	<i>Bacillus</i> sp.	96,14%	86%	0.0	MW658004.1
RCA17	<i>Bacillus wiedmannii</i>	97,21%	92%	0.0	MF062955.1
RCA18	<i>Bacillus subtilis</i>	95,04%	95%	0.0	KU922432.1

Teste de antagonismo

Apenas seis isolados demonstraram atividade inibitória contra algum fitopatógeno e foram testadas semiquantitativamente (Fig. 3). Contra *C. gloeosporioides*, *Pseudomonas* RCA10, *Bacillus* RCA12, *Bacillus* RCA13, *Bacillus* RCA15, *Bacillus* RCA16 e *Bacillus* RCA18. Para *M. phaseolina*, *Bacillus* RCA12, *Bacillus* RCA13, *Bacillus* RCA15, *Bacillus* RCA16 e *Bacillus* RCA18. E por fim *Pseudomonas* RCA10, *Bacillus* RCA12, *Bacillus* RCA13, *Bacillus* RCA15, *Bacillus* RCA16 e *Bacillus* RCA18 contra *Fusarium* sp.

Os IA variaram de 25,94 a 77,23 (Tabela 3). Embora haja diferença significativa nos valores de IA, não houve diferença estatística para *C. gloeosporioides* e *M. phaseolina*, mantendo todas as rizobactérias no mesmo grupo estatístico do teste Scott-Knott ($p < 0,005$). Por outro lado, para *Fusarium* sp., a única rizobactéria que difere estatisticamente foi a que apresentou o menor IA, RCA10.

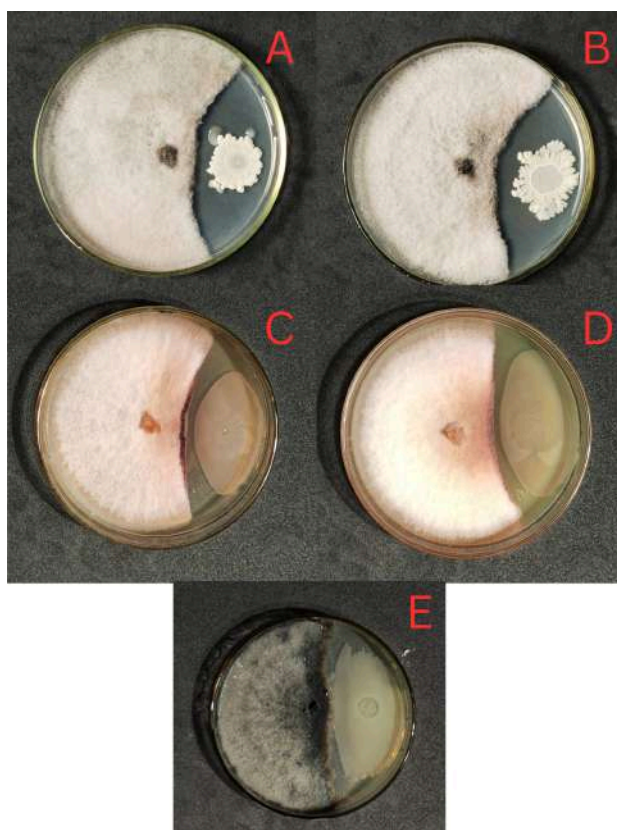


Fig. 3 Rizobactérias de *C. adamantium* contra fitopatógenos. A = *Bacillus* RCA12 contra *C. gloeosporioides*; B = *Bacillus* RCA18 contra *C. gloeosporioides*; C = *Bacillus* RCA15 contra *Fusarium* sp.; D = *Bacillus* RCA16 contra *Fusarium* sp.; E = *Bacillus* RCA16 contra *M. phaseolina*.

Tabela 3 Índices de antagonismo de rizobactérias de *C. adamantium* contra fitopatógenos

Rizobactérias	Fitopatógenos		
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Fusarium</i> sp.
<i>Pseudomonas</i> RCA10	50,33±6,95a	-	25,94±16,77b
<i>Bacillus</i> RCA12	61,61±31,73a	58,43±28,03a	67,96±4,42a
<i>Bacillus</i> RCA13	59,89±1,80a	68,87±5,67a	-
<i>Bacillus</i> RCA15	52,89±45,82a	67,46±6,74a	65,77±6,57a
<i>Bacillus</i> RCA16	45,50±31,76a	74,70±2,09a	67,70±1,60a
<i>Bacillus</i> RCA18	74,80±1,25a	77,23±5,11a	59,54±8,30a

Médias das triplicatas, seguidas pelo grupo estatístico do teste Scott-knott ($p < 0,05$). \pm Desvio padrão.

Fixação Biológica De Nitrogênio

A capacidade de fixação biológica de nitrogênio foi confirmada pela presença de um anel branco de crescimento bacteriano na parte superior do meio e pela alteração da cor original de meio de verde para azul (fig. 4). Dentre as 18 isolados, apenas as rizobactérias *Bacillus* RCA1 e *Lysinibacillus* RCA3 apresentaram essas alterações, sinalizando a fixação biológica de nitrogênio.

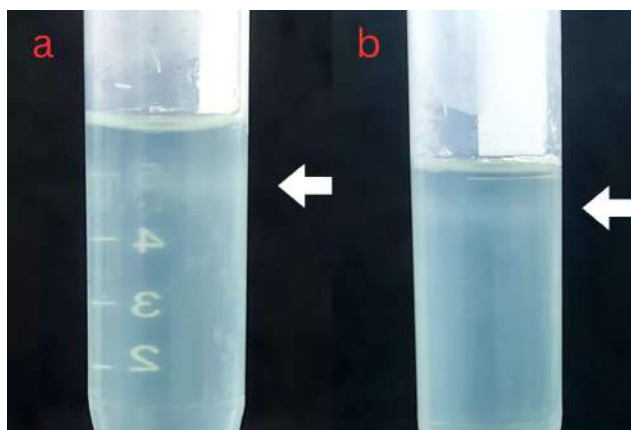


Fig. 4 Fixação biológica de nitrogênio indicada pelos anéis brancos de crescimento bacteriano (setas). A= *Bacillus* RCA1, B= *Lysinibacillus* RCA3

Solubilização De Fosfato

13 dos 18 isolados testados demonstraram capacidade de solubilização de fosfato (Tabela 3), com médias de solubilização que variaram de 1,15 a 1,56. Os índices obtidos foram separados em dois grupos estatísticos pelo teste Scott-Knoot ($p < 0,05$). O grupo que apresentou os maiores índices foi o dos isolados *Lysinibacillus* RCA5, *Pseudomonas* RCA8, *Pseudomonas* RCA10, *Bacillus* RCA12 e *Bacillus* RCA18 (Fig. 5).



Fig. 5 Solubilização de fosfato por rizobactérias de *C. adamantium*

Síntese de AIA

No teste colorimétrico para síntese bacteriana de AIA, utilizando o reagente de Salkowski, a mudança da cor natural do meio para rosa indica a produção para o fitormônio (Fig. 6). As rizobactérias que apresentaram tal alteração foram *Bacillus* RCA1, *Lysinibacillus* RCA3, *Sporosarcina* RCA4, *Lysinibacillus* RCA5, *Paenibacillus* RCA6, *Bacillus* RCA7, *Pseudomonas* RCA8 e *Paenibacillus* RCA9 (Tabela 4).

As sete bactérias que apresentaram produção de AIA foram capazes de produzir tanto com a presença quanto a ausência de triptofano. No meio enriquecido com triptofano, *Sporosarcina* RCA4 apresentou a maior concentração de AIA (310,06 mg/ml), já para o meio sem enriquecimento, *Lysinibacillus* RCA5 teve o maior resultado (197,1 mg/ml). *Bacillus* RCA1 apresentou os menores resultados para ambos os testes (99,37 e 72,47 mg/ml respectivamente).

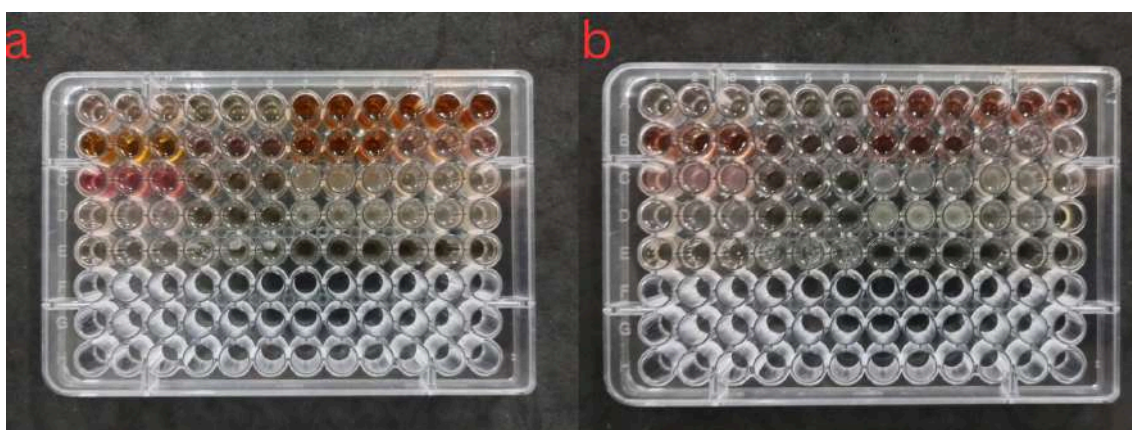


Fig. 6 Teste colorimétrico para síntese bacteriana de AIA. A = com Triptofano; B = sem triptofano. Triplicatas do meio de cultura das 18 rizobactérias, iniciando-se da esquerda para direita e de cima para baixo

Tabela 4 Testes de atividade de promoção de crescimento vegetal por rizobactérias de *C. adamantium*

Rizobactérias	Fixação N ₂	Solubilização PO ₄ ³⁻	Produção AIA	
			Trip+	Trip-
RCA 1	Positivo	*1,31b±0,12	99,37±0,12	72,47±0,28
RCA 2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
RCA 3	Positivo	1,27b±0,2	273,70±7,2	174,54±21,13
RCA 4	Negativo	1,15b±0,08	310,06±8,88	168,39±9,22
RCA 5	Negativo	1,45a±0,14	230,60±12,96	197,1±27,84
RCA 6	Negativo	1,17b±0,17	122,94±4,49	87,77±2,66
RCA 7	Negativo	1,23b±0,08	293,97±15,27	161,10±25,6
RCA 8	Negativo	1,52a±0,17	140,20±5,96	98,07±2,63
RCA 9	Negativo	1,26b±0,09	264,29±17,6	167,97±9,54
RCA 10	Negativo	1,39a±0,23	Negativo	Negativo
RCA 11	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
RCA 12	Negativo	1,39a±0,06	Negativo	Negativo
RCA 13	Negativo	1,29b±0,07	Negativo	Negativo
RCA 14	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
RCA 15	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
RCA 16	Negativo	1,33b±0,14	Negativo	Negativo
RCA 17	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
RCA 18	Negativo	1,56a±0,11	Negativo	Negativo

*Médias das quadruplicatas, seguidas pelo grupo estatístico do teste Scott-knott ($p < 0,05$). ± Desvio padrão.

Teste *in vivo*

O teste *in vivo* apresentou resultados positivos de promoção de crescimento em relação às variáveis analisadas (Fig. 7). O comprimento da parte aérea com o tratamento de RCA3 foi maior que os demais (Fig. 8). Os tratamentos com *Pseudomonas* RCA8 e com o consórcio não diferiram estatisticamente do controle. O comprimento das raízes não apresentou diferenças significativas, sendo o controle a menor média. Em relação ao peso úmido, o peso úmido da parte aérea apresentou diferença estatística entre os tratamentos e o controle, já para o peso úmido das raízes apenas o tratamento com *Lysinibacillus* RCA3 diferiu estatisticamente. Em relação ao peso seco, não houve diferença estatística significativa.

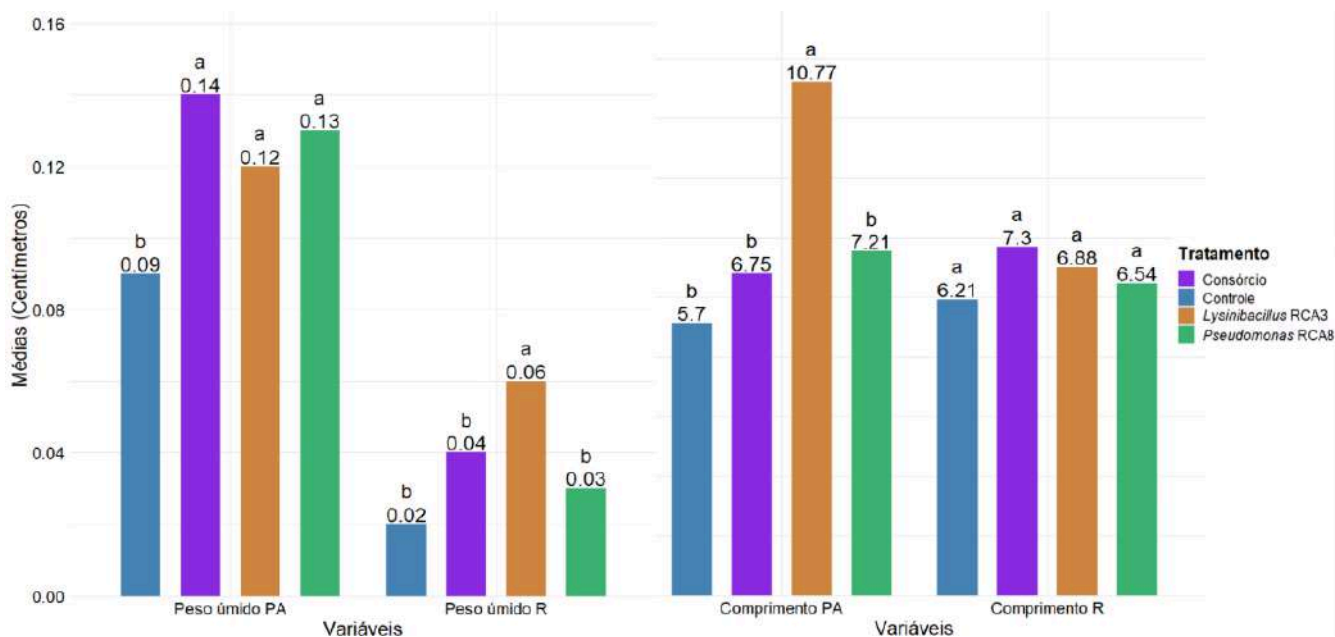


Fig. 7 Efeito dos tratamentos com rizobactérias selecionadas nas variáveis analisadas em plântulas de rabanete.

PA = Parte aérea; R = Raiz; Médias e grupo estatístico do teste Scott-Knott ($p < 0,05$)



Fig. 8 Promoção de crescimento em rabanete por *Lysinibacillus* RCA3 (A) em comparação com controle (B) do teste *in vivo*

Análise de Macro e micronutrientes

Para os seis macronutrientes testados não houve valores muito diferentes entre si, sugerindo que não há diferença entre os tratamentos (Fig. 9). Para os micronutrientes, entretanto, o ferro esteve elevado nos tratamentos do consórcio e *Pseudomonas* RCA8 (400,6 e 430,7 mg/kg respectivamente), apresentando o dobro da concentração do controle. Os demais micronutrientes também não apresentaram resultados significativos.

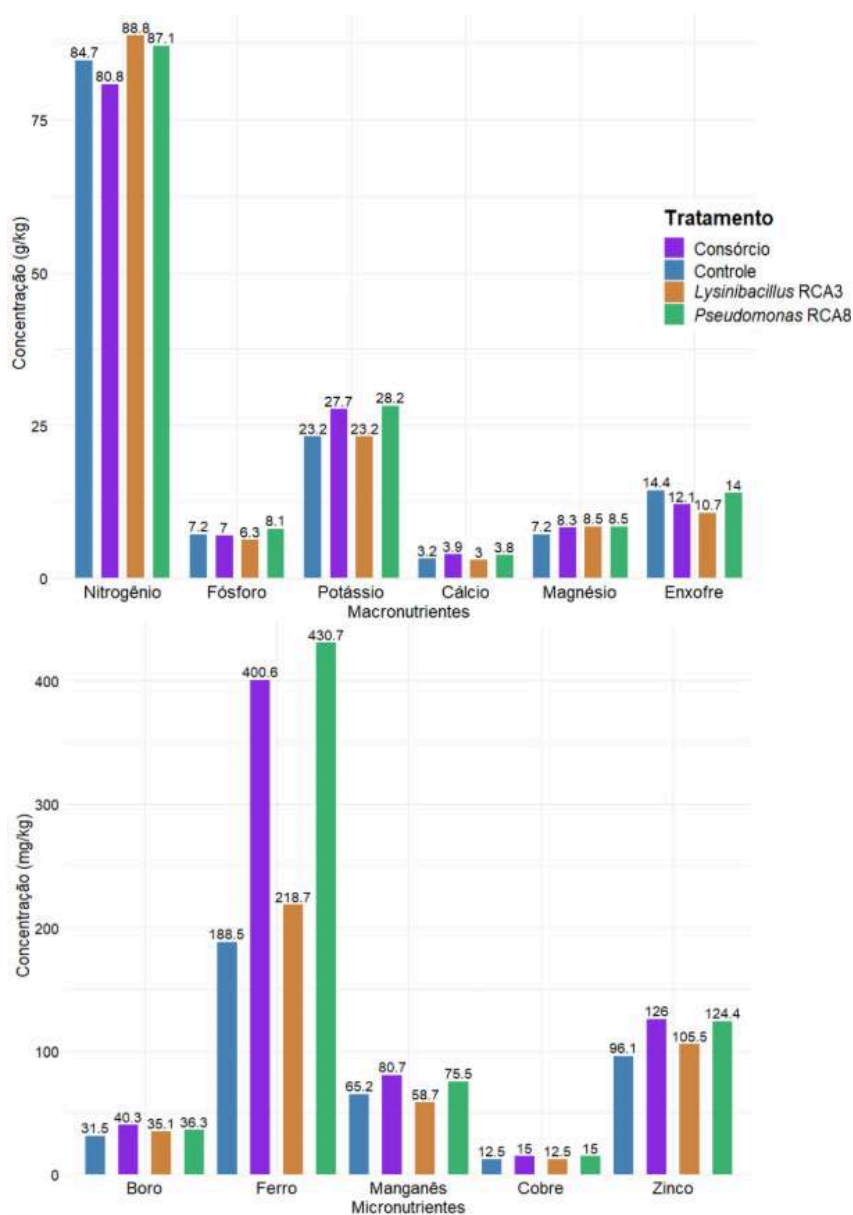


Fig. 9 Concentração de macro e micronutrientes do teste *in vivo* de promoção de crescimento. K = Consórcio; L = RCA3; P = RCA8

Discussão

As rizobactérias são uma parte importante do bem estar das lavouras, uma vez que estão associadas intrinsecamente ao desenvolvimento da planta e à sua relação com o ambiente, especialmente o solo. Os benefícios providos por esses organismos são provenientes de diversos mecanismos diretos e indiretos que viabilizam a absorção de nutrientes cruciais e oferecem proteção contra fatores abióticos e bióticos (Mohanty et al. 2021). A diversidade rizosférica associada à planta está adaptada às condições adversas por ela enfrentada, fornecendo auxílio na obtenção de nutrientes escassos e contra fatores abióticos como salinidade, pH, acidez e alcalinidade e umidade do solo. Essa interação é tão íntima a ponto de haver alteração nos processos de

sinalização e de transcrição de genes relacionados a essas adversidades (Verma et al. 2024). No presente estudo, a rizosfera de *C. adamantium* foi escolhida pelo estudo, visto que é uma planta nativa do Cerrado e pode se desenvolver em diferentes tipos de solos (da Silva et al. 2023). Portanto, os organismos associados a ela podem ser potenciais inoculantes para uso na agricultura, a fim de trazer resistência às culturas produzidas no Cerrado.

Identificação das rizobactérias

O solo rizosférico difere do não rizosférico em grande parte pelas diferenças físico-químicas, influenciando a composição microbiana (Ling et al., 2022). Tais alterações podem ser de pH, nutrientes disponíveis e oxigenação, decorrentes das secreções radiculares e de sua microbiota associada (Vives-Peris et al. 2020).

O isolamento de rizobactérias provenientes de *C. adamantium* forneceu informações importantes para a compreensão da comunidade bacteriana cultivável do solo que interage com essa espécie no Cerrado brasileiro. No presente estudo, houve predominância de bactérias da ordem Bacillales, 16 dos 18 isolados, representada por *Bacillus* spp., *Lysinibacillus* spp., *Paenibacillus* spp., *Sporosarcina luteola* e *Priestia megaterium*. As bactérias restantes são *Pseudomonas* spp. (Pseudomonadales).

A ordem Bacillales é muito bem documentada no ambiente rizosférico em diversas condições. O gênero *Bacillus* demonstra várias atividades promotoras de crescimento como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de AIA, além de demonstrar potencial de biocontrole (Kumar et al. 2012).

Várias espécies de *Bacillus* já foram isoladas da rizosfera de diversas plantas pelo mundo inteiro como em feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e chá (*Camellia sinensis* (L) O. Kuntze e *Camellia assamica* (Mast) Kitam) cultivados no Himalaia (Pandey e Palni 1997; Kumar et al. 2012), de batata (*Solanum tuberosum* L.) no Andes (Calvo et al. 2010), de soja (*Glycine max* L. Merrill) na Indonésia (Wahyudi et al. 2011) e de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Kalam et al 2020).

Os demais gêneros encontrados no presente trabalho também já foram isolados do ambiente rizosférico e apresentaram atividade de promoção *in vitro* e/ou *in vivo*: *Lysinibacillus* (Jyolsna et al. 2021; Pantoja-Guerra et al. 2023; Pan et al. 2024), *Paenibacillus* (Brito et al. 2020; Li et al. 2021), *Sporosarcina* (Bushra et al. 2023) e *Priestia* (Abiala et al. 2023).

Pseudomonas constitui um grupo capaz de ocupar diversos nichos e de apresentar uma variedade metabólica considerável (Clarke 1982), sendo também muito bem adaptado à colonização da rizosfera, além de possuir características promissoras para rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (Dorjey et al., 2017). Essas características abrangem desde atividades promotoras de crescimento em plantas ao biocontrole de agentes fitopatogênicos (Shen et al., 2013).

Tendo em vista a microbiota rizosférica do Cerrado brasileiro, outros autores também exploraram o potencial das RPCP desse domínio. Rizobactérias de diversos gêneros foram isoladas e demonstraram potencial de promoção de crescimento como *Paenibacillus polymyxa* (da Mota et al. 2002), isolados de *Brevibacillus* (Fiuza et al. 2022) e *Bacillus* e *Burkholderia* (Lisboa et al. 2021), além de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens* (Braga et al. 2018) e *Bacillus cereus* e *Pseudomonas putida* (Vitorino et al. 2020). Esses grupos taxonômicos também são encontrados em outras abordagens, como a detecção de genes relacionados à fixação de nitrogênio em Coelho et al. (2012), que levou a detecção de principalmente *Paenibacillus durus* em

amostras de rizosfera de sorgo. Análises metagenômicas também detectaram os dois filos encontrados no presente estudo, Firmicutes e Pseudomonadota (Proteobacteria), em diferentes fitofisionomias do Cerrado em solos nativos e alterados por lavoura (de Castro et al. 2016; Souza et al. 2016).

Teste de antagonismo

Devido às enormes perdas agrícolas anuais causadas por fitopatógenos, as RCPs ganharam espaço no biocontrole desses organismos por conta de sua versatilidade de trabalho e de sua diversidade nos agrossistemas, além de estarem associados diretamente com a planta (Saraf et al. 2014).

A maior parte das rizobactérias que apresentaram resultados no controle de fitopatógenos pertencem ao gênero *Bacillus*. Esse táxon é constantemente empregado no biocontrole devido a uma variedade de metabólitos secundários produzidos como fengicina, iturina, surfactina (Khan et al., 2021). Isso corrobora com os resultados encontrados, em que a maior parte das inibições foram a distância, ou seja não houve contato entre as rizobactérias e os fitopatógenos, sugerindo a produção de aleloquímicos por parte das rizobactérias testadas. Uma espécie de *Bacillus* com grande destaque é *B. subtilis*, suas características de formação de endósporos, diversidade de antibióticos sintetizados e variedade de plantas hospedeira a tornam uma espécie promissora para a sua utilização como agente de biocontrole (Khomyak et al. 2016). No presente estudo, *Bacillus* RCA18 apresentou resultados expressivos contra *C. gloeosporioides* e *M. phaseolina*, IA de 74,80 e 77,23 respectivamente (Tabela 3).

C. gloeosporioides já foi controlada em laboratórios por rizobactérias como em Magallón-Andalón et al., (2024) com *B. pumilus* e três cepas de *B. thuringiensis*, em Jamal et al. (2015) com *B. amyloliquefaciens* e por *B. subtilis* em Ashwini e Srividya (2014). *Bacillus* spp. também demonstraram atividade inibitória em *Fusarium* spp. (Khan et al. 2018; Baard et al. 2023; Boulahouat et al. 2023), além do fitopatógeno do solo *M. phaseolina* (Bojórquez-Armenta et al., 2021; Castaldi et al., 2021; Rangel-Montoya et al. 2022).

C. gloeosporioides é um fitopatógeno conhecido por causar a antracnose em diversas espécies vegetais. O alvo desse patógeno é a parte aérea da planta, especialmente os frutos e as folhas (Peralta-Ruiz et al., 2023). Embora as bactérias do presente estudo sejam rizosféricas, elas podem ser exploradas como biopesticidas de outras formas, como análise de seus metabólitos secundários. Por outro lado, tanto o gênero *Fusarium* quanto *M. phaseolina* são fitopatógenos transmitidos pelo solo (Okungbowa e Shittu 2012; Ghosh et al. 2018), portanto, o ataque à planta inicia-se no sistema radicular, sendo obrigado a transpor a linha de defesa da rizosfera.

Os resultados obtidos nos testes de antagonismo entre rizobactérias isoladas de *C. adamantium* contra três importantes fitopatógenos, estão de acordo com o que já é registrado na literatura científica, evidenciando principalmente os isolados *Bacillus* spp. como promissores em seu uso como biopesticidas.

Fixação Biológica De Nitrogênio

Dentre os principais nutrientes essenciais para o desenvolvimento da planta está o nitrogênio (N_2), entretanto, sua disponibilidade no solo não é suficiente para atender a demanda da planta. Em contrapartida, as plantas se beneficiam de bactérias de vida livre capazes de fixar biologicamente o N_2 disponibilizando-o no solo (Shabanamol et al. 2018). No presente trabalho, rizobactérias de vida livre *Bacillus* RCA1 e *Lysinibacillus* RCA3 fixaram biologicamente o N_2 .

A capacidade de fixação de nitrogênio por *Bacillus* spp. já é conhecida (Solani et al. 2016). Em relação a *B. cereus*, vários trabalhos descrevem essa atividade como em Nafisah et al. (2022) em que uma cepa de *B. cereus* isolada de um lago na indonésia fixou nitrogênio em forma de amônia. Na co-inoculação com *Rhizobium* sp. em guandu (*Cajanus cajan*) *B. cereus* aumentou a fixação de nitrogênio em comparação a inoculação com apenas *Rhizobium* (Tilak, Ranganayaki e Manoharachari 2006).

Os resultados obtidos de *Lysinibacillus* RCA3 vão ao encontro de outros estudos que descrevem as atividades promotoras de crescimento em plantas dessa espécie. Shabanamol et al. (2018) obtiveram resultados positivos de *L. sphaericus* na fixação de nitrogênio, maior do que outras bactérias diazotróficas testadas no mesmo estudo.

Solubilização De Fosfato

Rizobactéria podem disponibilizar fosfato no solo por diversas formas, que se dividem em solubilização de compostos inorgânicos e degradação enzimática de compostos orgânicos. Ambos os processos resultam em fosfato mono e dibásico (H_2PO_4 e HPO_4^{-2}). O meio utilizado no presente estudo é a base do composto inorgânico fosfato bicálcico ($CaHPO_4$), portanto, as rizobactérias foram restringidas a apenas esta via de solubilização.

As rizobactérias que apresentaram os maiores índices de solubilização pertencem aos gêneros *Bacillus*, *Lysinibacillus* e *Pseudomonas*. O maior índice foi de 1,56 e pertence a *Bacillus* RCA18. O gênero *Bacillus* já foi relatado como solubilizadora de fosfato (Ahmad et al. 2021; Li et al. 2023). *Pseudomonas* spp. já apresentaram atividade de solubilização de fosfato (Adhikari et al. 2021; Dasila et al. 2023; López-Hernández et al. 2023) além de *Pseudomonas putida* (Przemieniecki et al. 2019) e *Pseudomonas plecoglossicida* (Astrian et al. 2020). Vitorino et al. (2024) testaram uma cepa de *L. fusiformis* e registraram a capacidade de solubilização de fosfato, em especial por meio de vias de fitase e de ácidos orgânicos.

Síntese de AIA

AIA é uma auxina de suma importância no desenvolvimento da planta, influenciando a divisão e a diferenciação celular, além de regular o crescimento primário e secundário da raízes (Reed 2001), sendo sintetizada a partir de via dependente ou independente de triptofano (Mohite 2013).

Apenas sete rizobactérias produziram AIA tanto na presença quanto na ausência de triptofano, indicando uma maior versatilidade na síntese desse composto por parte das bactérias isoladas. Os resultados obtidos possuem respaldo na literatura científica em relação ao registro de produção de AIA: no maior filo encontrado no presente estudo, Firmicutes, há *Bacillus cereus* (Kulkova et al. 2023); *Lysinibacillus sphaericus* (Naureen et al. 2017, Shabanamol et al. 2018, Pantoja-Guerra et al. 2023); *Bacillus* sp. (Swain, Naskar, Ray 2007, Shao et al. 2015, Wagi e Ahmed 2019) *Paenibacillus illinoisensis* (Kudoyarova et al. 2017); *Lysinibacillus fusiformis* (Hanh e Mongkolthanaruk 2017, Pantoja-Guerra et al. 2023). Além disso, também há *Sporosarcina luteola* (Franchi et al. 2017) e *Pseudomonas putida* (Meliani et al. 2017).

A biossíntese de AIA pela via dependente de triptofano é muito bem descrita na literatura. Utilizando o triptofano como precursor, a bactéria podem sintetizar AIA utilizando algumas vias como a do ácido indol-3-pirúvico, da triptamina, da indol-3-acetonitrila e a do indol-3-acetamida (Zhang et al. 2024). Entretanto

a via independente permanece pouco elucidada (Di et al, 2016). O fato das rizobactérias isoladas no presente estudo terem apresentado positivo nos dois testes de AIA, atrapalha a determinação da via utilizada, uma vez que não há confirmação se elas de fato utilizam as duas vias ou se utilizada ou apenas uma delas.

Teste *in vivo* e análise de Macro e micronutrientes

Segundo os resultados obtidos no teste *in vivo* com rabanete, pode se perceber que houve promoção de crescimento ocasionado pelos tratamentos com *Bacillus* RCA 3 (Fig 7), *Pseudomonas* RCA8 e com o consórcio das duas rizobactérias. Com exceção do peso seco, o controle apresentou os menores valores nas demais variáveis. Contudo, o crescimento promovido não foi uniforme, o tratamento com *Lysinibacillus* RCA 3 foi o maior em comprimento da parte aérea, embora, entre os tratamentos, apresentou o menor peso de parte aérea, e apresentou as raízes mais pesadas. Os tratamentos com consórcio e com *Pseudomonas* RCA8 não demonstraram diferença significativa entre si.

Possivelmente os resultados apresentados por *Lysinibacillus* RCA3 se devem à sua produção de AIA, registrada no presente trabalho. O AIA é um fitormônio de vital importância para o desenvolvimento da planta, pois induz o alargamento e divisão celular (Licea-Herrera et al. 2020). Além disso, o AIA promove o desenvolvimento do sistema radicular primário e secundário, aumentando o seu peso, ramificação área superficial das raízes e seu tamanho (Raheem et al., 2018), podendo explicar o peso maior para *Lysinibacillus* RCA3, mas não necessariamente o seu comprimento.

Outros fatores que poderiam ter auxiliado *Lysinibacillus* RCA3 são a solubilização de fosfato e a fixação de nitrogênio, dando vantagem a *Lysinibacillus* RCA3 em comparação com *Pseudomonas* RCA8, tendo em vista que a última não foi capaz apenas de fixar nitrogênio, além de apresentar uma produção de AIA inferior a de *Lysinibacillus* RCA3. Contudo, segundo a análise de macronutrientes, aparentemente não houve diferença significativa em relação ao controle na concentração de nitrogênio e fósforo, apresentando resultados insatisfatórios quando comparados a outros trabalhos como em Singh et al. (2024) e em Jensen et al. (2024).

Apesar do consórcio ter sido composto por duas rizobactérias com resultados positivos nos testes *in vitro*, ele não foi estatisticamente diferente dos outros tratamentos. Isso se deve possivelmente por não ter havido, entre as rizobactérias, sinergismo ou colonização adequada quando inoculadas na planta, uma vez que o sinergismo depende de vários fatores presentes na rizosfera (Singh et al. 2023).

Considerações finais

As RPCP são uma alternativa sustentável ao uso de fertilizantes e pesticidas químicos, tradicionalmente utilizados, por promoverem o crescimento vegetal e consequentemente aumentarem os rendimentos das colheitas por meio de mecanismos simbióticos com a planta hospedeira. Esses mecanismos são amplamente descritos na literatura científica, entretanto o crescimento vegetal nem sempre é observado.

As rizobactérias testadas apresentaram resultados positivos para as principais atividades de promoção de crescimento *in vitro*, além de demonstrarem potencial antagonista contra fitopatógenos fúngicos. Os resultados obtidos revelam um pouco da diversidade microbiana rizosférica de *C. adamantium* e servem como

base para futuros estudos que buscam aplicar a microbiologia agrícola na diminuição dos impactos da agricultura ao ambiente e a sociedade.

Referências

- Abiala M, Sadhukhan A, Muthuvel J, Shekhawat RS, Yadav P, Sahoo L (2023) Rhizosphere *Priestia* species altered cowpea root transcriptome and enhanced growth under drought and nutrient deficiency. *Planta* 257(1): 11. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-04047-2>
- Adhikari P, Jain R, Sharma A, Pandey A (2021) Plant growth promotion at low temperature by phosphate-solubilizing *Pseudomonas* spp. isolated from high-altitude Himalayan soil. *Microb ecol* 82(3):677-687. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01702-1>
- Ahmad I, Ahmad M, Hussain A, Jamil M (2021) Integrated use of phosphate-solubilizing *Bacillus subtilis* strain IA6 and zinc-solubilizing *Bacillus* sp. strain IA16: a promising approach for improving cotton growth. *Folia Microbiologica* 66(1):115-125. <https://doi.org/10.1007/s12223-020-00831-3>
- Aloo BN, Mbega ER, Tumuhairwe JB, Makumba BA (2021) Advancement and practical applications of rhizobacterial biofertilizers for sustainable crop production in sub-Saharan Africa. *Agric Food Secur* 10(1):57. <https://doi.org/10.1186/s40066-021-00333-6>
- Araújo WL et al (2010) Guia prático: isolamento e caracterização de microrganismos endofíticos. Piracicaba, Copiadora "Luiz de Queiroz".
- Ashwini N, Srividya S (2014) Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech* 4(2): 127-136. <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0134-4>
- Astriani M, Zubaidah S, Abadi AL, Suarsini E (2020) *Pseudomonas plecoglossicida* as a novel bacterium for phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid-producing from soybean rhizospheric soils of East Java, Indonesia. *Biodiversitas J Biol Divers* 21(2). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210220>
- Baard V, Bakare OO, Daniel AI, Nkomo M, Gokul A, Keyster M, Klein A (2023) Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus tequilensis* against four *Fusarium* species. *Pathog* 12(2):254. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020254>
- Basu A, Prasad P, Das SN, Kalam S, Sayyed RZ, Reddy MS, El Enshasy H (2021) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. *Sustain* 13(3):1140. <https://doi.org/10.3390/su13031140>
- Bojórquez-Armenta YDJ, Mora-Romero GA, López-Meyer M, Maldonado-Mendoza IE, Castro-Martínez C, Romero-Urias CDLA ... Martínez-Álvarez JC (2021) Evaluation of *Bacillus* spp. isolates as potential biocontrol agents against charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on common bean. *J Gen Plant Pathol* 87:377-386. <https://doi.org/10.1007/s10327-021-01019-4>
- Boulahouat S, Cherif-Silini H, Silini A, Bouket AC, Luptakova L, Alenezi FN, Belbahri L (2023) Biocontrol efficiency of rhizospheric *Bacillus* against the plant pathogen *Fusarium oxysporum*: a promising approach for sustainable agriculture. *Microbiol Res* 14(3):892-908. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14030062>
- Braga LF, Oliveira FAD, Couto EAPD, Santos KFDEN, Ferreira EPDB, Martin-Didonet CCG (2018) Polyphasic characterization of bacteria obtained from upland rice cultivated in Cerrado soil. *Braz j microbiol* 49:20-28. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.04.004>
- Brito LF, López MG, Straube L, Passaglia LM, Wendisch VF (2020) Inorganic phosphate solubilization by rhizosphere bacterium *Paenibacillus sonchi*: gene expression and physiological functions. *Frontiers microbiol* 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.588605>

- Bushra R, Uzair B, Manzoor S, Ahmed I (2023) Draft genome of *Sporosarcina* sp. NCCP-2222T isolated from rhizosphere of mangrove plant *Ceriops tagal* reveals its potential as a plant biostimulant and constitutes a novel species. *Biocatal Agric Biotechnol* 47. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102543>
- Calvo P, Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E, Zúñiga D (2010) Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Braz J Microbiol* 41:899-906. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400008>
- Castaldi S, Petrillo C, Donadio G, Piaz FD, Cimmino A, Masi M, ... Istatico R. (2021) Plant growth promotion function of *Bacillus* sp. strains isolated from salt-pan rhizosphere and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina*. *Int j mol sci* 22(7), 3324. <https://doi.org/10.3390/ijms22073324>
- Clarke PH (1982) The metabolic versatility of pseudomonads. *Antonie Van Leeuwenhoek* 48:105-130. <https://doi.org/10.1007/BF00405197>
- Coelho MRR, Carneiro NP, Marriel IE, Seldin L (2009) Molecular detection of *nifH* gene-containing *Paenibacillus* in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown in Cerrado soil. *Lett appl microbiol* 48(5), 611-617. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02578.x>
- Crispim BDA, Fernandes JDS, Bajay MM, Zucchi MI, Batista CEDA, Vieira MDC, Barufatti A (2021) Genetic diversity of *campomanesia adamantium* and its correlation with land use and land cover. *Divers* 13(4):160. <https://doi.org/10.3390/d13040160>
- da Mota FF, Nóbrega A, Marriel IE, Paiva E, Seldin L (2002) Genetic diversity of *Paenibacillus polymyxa* populations isolated from the rhizosphere of four cultivars of maize (*Zea mays*) planted in Cerrado soil. *Appl Soil Ecol* 20(2), 119-132. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00016-1](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00016-1)
- da Silva ELM, Steiner F, Zuffo AM (2023) Caracterização morfológica de frutos e sementes de guavira [*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg.]. *Revista em Agronegócio e Meio Ambiente* 16(1): 1-19. DOI:10.17765/2176-9168.2023v16n1e10121
- Danish M, Shahid M, Altaf M, Tyagi A, Ali S (2024) Plant growth-promoting rhizobacteria and biocontrol agents triggered plant defence responses against phytopathogenic fungi and improved rice growth. *Physiol Mol Plant Pathol*. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102337>
- Dasila H, Sah VK, Jaggi V et al (2023) Cold-tolerant phosphate-solubilizing *Pseudomonas* strains promote wheat growth and yield by improving soil phosphorous (P) nutrition status. *Frontiers in microbiol* 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1135693>
- de Araújo LCA, Leite NR, da Rocha PDS et al (2023) *Campomanesia adamantium* O Berg. fruit, native to Brazil, can protect against oxidative stress and promote longevity. *Plos one* 18(11), e0294316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0294316>
- de Castro AP, Sartori da Silva MRS, Quirino BF, da Cunha Bustamante MM, Krüger RH (2016) Microbial diversity in Cerrado biome (neotropical savanna) soils. *PloS one* 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148785>
- Di DW, Zhang C, Luo P, An CW, Guo GQ (2016) The biosynthesis of auxin: how many paths truly lead to IAA?. *Plant growth regulation* 78:275-285. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0103-5>
- Dorjey S, Dolkar D, Sharma R (2017) Plant growth promoting rhizobacteria *Pseudomonas*: A review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 6(7):1335-1344. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2017.602.160>
- Franchi E, Rolli E, Marasco R et al (2017) Phytoremediation of a multi contaminated soil: mercury and arsenic phytoextraction assisted by mobilizing agent and plant growth promoting bacteria. *J soils and sediments* 17:1224-1236. <https://doi.org/10.1007/s11368-015-1346-5>
- Fiuza DAF, Vitorino LC, Souchie EL, Neto MR, Bessa LA, Silva CFD, Trombela NT (2022) Effect of Rhizobacteria Inoculation via Soil and Seeds on *Glycine max* L. Plants Grown on Soils with Different Cropping History. *Microorg* 10(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040691>

Ghosh T, Biswas, MK, Guin C, Roy P (2018) A review on characterization, therapeutic approaches and pathogenesis of *Macrophomina phaseolina*. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol* 19(3-4):72-84.

Gordon SA, Weber RP (1951) Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiol* 26(1):192.

Hanh HTT, Mongkolthanaruk W (2017) Correlation of growth and IAA production of *Lysinibacillus fusiformis* UD 270. *J Appl Physical Sci* 3(3):98-106.

Jamal Q, Lee YS, Jeon HD, Park YS, Kim KY (2015) Isolation and biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* Y1 against fungal plant pathogens. *Korean J Soil Sci Fertil* 48(5):485-491. <https://doi.org/10.7745/KJSSF.2015.48.5.485>

Jensen, C. N. G., Pang, J. K. Y., Gottardi, M., Kračun, S. K., Svendsen, B. A., Nielsen, K. F., ... & Schulz, A. (2024). *Bacillus subtilis* promotes plant phosphorus (P) acquisition through P solubilization and stimulation of root and root hair growth. *Physiologia Plantarum* 176(3). <https://doi.org/10.1111/ppl.14338>

Jyolsna KS, Bharathi N, Ali LR, Paari KA (2021) Impact of *Lysinibacillus macroides*, a potential plant growth promoting rhizobacteria on growth, yield and nutritional value of tomato plant (*Solanum lycopersicum* L. F1 hybrid Sachriya). *Plant Sci Today* 8(2), 365-372. <https://doi.org/10.14719/pst.2021.8.2.1082>

Kalam S, Basu A, Podile AR (2020) Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere. *Heliyon* 6(8). DOI: 10.1016/j.heliyon.2020.e04734

Khan N, Martínez-Hidalgo P, Ice TA, Maymon M, Humm EA, Nejat N, ... Hirsch AM (2018) Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers microbiol* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>

Khan, M., Salman, M., Jan, S. A., & Shinwari, Z. K. (2021). Biological control of fungal phytopathogens: A comprehensive review based on *Bacillus* species. *MOJ Biol Med* 6:90-92.

Khomyak AI, Asaturova AM, Sidorova TM (2016) Materialy II nauchno-prakticheskoi konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh «Sovremennye aspekty proizvodstva i pererabotki sel'skokhozyaistvennoi produktsii». In Proc. II Conf. of students, graduate students and young scientists «Food stuffs—modern aspects of production and processing]. Krasnodar (pp. 216-224).

Kudoyarova GR et al (2017) Effect of auxin producing and phosphate solubilizing bacteria on mobility of soil phosphorus, growth rate, and P acquisition by wheat plants. *Acta physiologiae plantarum* 39:1-8. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2556-9>

Kulkova I, Dobrzyński J, Kowalczyk P, Bełżeczki G, Kramkowski K (2023) Plant growth promotion using *Bacillus cereus*. *Int J Mol Sci*, 24(11). <https://doi.org/10.3390/ijms24119759>

Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK (2012) *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiol res* 167(8), 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>

Li H, He Y, Yan Z, Yang Z, Tian F, Liu X, Wu Z (2023) Insight into the microbial mechanisms for the improvement of spent mushroom substrate composting efficiency driven by phosphate-solubilizing *Bacillus subtilis*. *J Environl Management* 336. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117561>

Li Y, Li Q, Chen S (2021) Diazotroph *Paenibacillus triticisoli* BJ-18 drives the variation in bacterial, diazotrophic and fungal communities in the rhizosphere and root/shoot endosphere of maize. *Int J Mol Sci* 22(3). <https://doi.org/10.3390/ijms22031460>

Licea-Herrera JI, Quiroz-Velásquez JD, Hernández-Mendoza JL (2020) Impact of *Azospirillum Brasilense*, a rhizobacterium stimulating the production of indole-3-acetic acid as the mechanism of improving plants' grow in agricultural crops. *Revista Boliviana de Química* 37(1):34-39. DOI:10.34098/2078-3949.37.1.5

- Ling N, Wang T, Kuzyakov Y (2022) Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nature commun* 13(1), 836. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28448-9>
- Lisboa PHG, de Andrade PHM, Machado PC, de Sousa CP, Lacava PT (2021) Isolation and in vitro screening of plant growth-promoting rhizobacteria from *Solanum lycocarpum* St. Hil., an endemic plant of the Brazilian tropical savannah. *Afri J Microbiol Res* 15(5):253-261. <https://doi.org/10.5897/AJMR2021.9524>
- López-Hernández J, García-Cárdenas E, López-Bucio JS et al (2023) Screening of phosphate solubilization identifies six *Pseudomonas* species with contrasting phytostimulation properties in *Arabidopsis* seedlings. *Microbial Ecol* 86(1):431-445. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-02080-y>
- Magallón-Andalón CG, Calderón-Santoyo M, Balois-Morales R, Ochoa-Jiménez VA, Casas-Junco PP, López-Guzmán GG, ... Bautista-Rosales PU (2024) Antagonistic potential of *Bacillus* spp. for the control of *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado (*Persea americana* Mill.) 'Hass'. *J Plant Dis Prot* 1-12. <https://doi.org/10.1007/s41348-024-00959-1>
- Martínez SA, Dussán J (2018) *Lysinibacillus sphaericus* plant growth promoter bacteria and lead phytoremediation enhancer with *Canavalia ensiformis*. *Environ Prog Sustain Energy* 37(1):276-282. <https://doi.org/10.1002/ep.12668>
- Meliani A, Bensoltane A, Benidire L, Oufdou K (2017) Plant growth-promotion and IAA secretion with *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Res Rev: J Botanical Sci*, 6(2):16-24.
- Mohanty P, Singh PK, Chakraborty D, Mishra S, Pattnaik R (2021) Insight into the role of PGPR in sustainable agriculture and environment. *Frontiers Sustain Food Syst* 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.667150>
- Mohite B (2013) Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *J soil sci plant nutrition* 13(3), 638-649. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162013005000051>
- Nafisah W, Prabaningtyas S, Witjoro A, Saptawati RT, Rodiansyah A (2022) Exploration non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria from several lakes in East Java, Indonesia. *Biodiversitas J Biol Divers* 23(4). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230405>
- Naureen Z, Rehman NU, Hussain H (2017) Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. *Front microbiol* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01477>
- Odoh CK (2017) Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a bioprotectant bioinoculant for sustainable agrobiolgy. A review. *Int J Adv Res Biol Sci* 4(5):123-142. : <http://dx.doi.org/10.22192/ijarbs.2017.04.05.014>
- Okungbowa FI, Shittu HO (2012) *Fusarium* wilts: An overview. *Environ. Res. J*, 6(2):83-102.
- Pan L, Xu Q, Wei Q, Kong Y, Zhu L, Tian W, ... Zhu C (2024) Isolation of the inorganic phosphorus-solubilizing bacteria *Lysinibacillus sphaericus* and assessing its role in promoting rice growth. *Int Microbiol* 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10123-024-00538-2>
- Pandey A, Palni LMS (1997) *Bacillus* species: the dominant bacteria of the rhizosphere of established tea bushes. *Microbiol res* 152(4):359-365. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(97\)80052-3](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80052-3)
- Pantoja-Guerra M, Burkett-Cadena M, Cadena J, Dunlap CA, Ramírez CA (2023) *Lysinibacillus* spp.: An IAA-producing endospore forming-bacteria that promotes plant growth. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 116(7):615-630. <https://doi.org/10.1007/s10482-023-01828-x>
- Peralta-Ruiz Y, Rossi C, Grande-Tovar CD, Chaves-López C (2023) Green management of postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *J fungi* 9(6)623. <https://doi.org/10.3390/jof9060623>
- Przemieniecki SW, Kurowski TP, Kotlarz K (2019) Bacteria isolated from treated wastewater for biofertilization and crop protection against *Fusarium* spp. pathogens. *J Soil Sci Plant Nutrition* 19:1-11. <https://doi.org/10.1007/s42729-018-0001-9>

R Core Team. (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>

Rafique M, Sultan T, Ortas I, Chaudhary HJ (2017) Enhancement of maize plant growth with inoculation of phosphate-solubilizing bacteria and biochar amendment in soil. *Soil sci plant nutrition*, 63(5):460-469. <https://doi.org/10.1080/00380768.2017.1373599>

Raheem A, Shaposhnikov A, Belimov AA, Dodd IC, Ali B (2018) Auxin production by rhizobacteria was associated with improved yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought stress. *Archives of Agron Soil Sci*, 64(4):574-587. <https://doi.org/10.1080/03650340.2017.1362105>

Rangel-Montoya, E. A., Delgado-Ramírez, C. S., Sepulveda, E., & Hernández-Martínez, R. (2022). Biocontrol of *Macrophomina phaseolina* using *Bacillus amyloliquefaciens* strains in cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *Agron* 12(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy12030676>

Reed JW (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends plant sci* 6(9):420-425.

Saraf M, Pandya U, Thakkar A (2014) Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiol res* 69(1):18-29. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.08.009>

Shabanamol S, Divya K, George TK, Rishad KS, Sreekumar TS, Jisha MS (2018) Characterization and in planta nitrogen fixation of plant growth promoting endophytic diazotrophic *Lysinibacillus sphaericus* isolated from rice (*Oryza sativa*). *Physiol Mol Plant Pathol* 102:46-54. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.11.003>

Shao J, Xu Z, Zhang N, Shen Q, Zhang R (2015) Contribution of indole-3-acetic acid in the plant growth promotion by the rhizospheric strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Biol Fertility Soils* 51:321-330. <https://doi.org/10.1007/s00374-014-0978-8>

Singh A, Yadav VK, Chundawat RS, Soltane R, Awwad NS, Ibrahim HA, ... Vicas SI (2023) Enhancing plant growth promoting rhizobacterial activities through consortium exposure: a review. *Frontiers Bioengineering Biotechnol* 11. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1099999>

Singh P, Singh RK, Li HB, Guo DJ, Sharma A, Verma KK, ... Li YR (2024) Nitrogen fixation and phytohormone stimulation of sugarcane plant through plant growth promoting diazotrophic *Pseudomonas*. *Biotechnol Gen Engineering Revi* 40(1):5-35. <https://doi.org/10.1080/02648725.2023.2177814>

Souza RC, Mendes IC, Reis-Junior FB, Carvalho FM, Nogueira MA, Vasconcelos ATR, ... Hungria M (2016) Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: How fragile is the Brazilian Cerrado?. *Bmc Microbiol* 16:1-15. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0657-z>

Swain MR, Naskar SK, Ray RC (2007) Indole-3-acetic acid production and effect on sprouting of yam (*Dioscorea rotundata* L.) minisetts by *Bacillus subtilis* isolated from culturable cowdung microflora. *Pol J Microbiology* 56(2):103.

Tilak KVBR, Ranganayaki N, Manoharachari C (2006) Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Europ Jf Soil Sci* 57(1):67-71. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2389.2006.00771.x>

Vejan P, Abdullah R, Khadiran T, Ismail S, Nasrulhaq Boyce A (2016) Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Mol* 21(5):573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>

Verma KK, Joshi A, Song XP, Liang Q, Xu L, Huang HR, ... Li YR (2024) Regulatory mechanisms of plant rhizobacteria on plants to the adaptation of adverse agroclimatic variables. *Frontiers Plant Sci* 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1377793>

Vitorino LC, da Silva EJ, Oliveira MS (2024) Effect of a *Bacillus velezensis* and *Lysinibacillus fusiformis*-based biofertilizer on phosphorus acquisition and grain yield of soybean. *Front Plant Sci* 15, 1433828. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1433828>

Vitorino LC, Silva FOD, Cruvinel BG, Bessa LA, Rosa, M Souchie EL, Silva FG (2020) Biocontrol potential of *Sclerotinia sclerotiorum* and physiological changes in soybean in response to *Butia archeri* palm rhizobacteria. *Plants*, 9(1):64. <https://doi.org/10.3390/plants9010064>

Vives-Peris V, De Ollas C, Gómez-Cadenas A, Pérez-Clemente RM (2020) Root exudates: from plant to rhizosphere and beyond. *Plant cell rep* 39(1):3-17. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02447-5>

Wagi S, Ahmed A (2019) *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ* 7, e7258. <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>

Wahyudi AT, Astuti RP, Widyawati A, Meryandini A, Nawangsih AA (2011) Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *J Microbiol Antimicrob*, 3(2):34-40.

Watkinson SC, Boddy L, Money N (2015) *The fungi*. Academic Press.

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

Considerações finais

As RPCP são alvo de diversas pesquisas, sendo consideradas como uma alternativa sustentável ao uso de fertilizantes e pesticidas químicos tradicionalmente utilizados. São capazes de promover o crescimento vegetal e consequentemente aumentar os rendimentos das colheitas por meio de mecanismos simbióticos com a planta hospedeira. Esses mecanismos são altamente diversificados, oferecendo um grande leque de estratégias e focos para o uso desses organismos na agricultura.

As rizobactérias foram isoladas de *Campomanesia adamantium*, uma planta nativa do Cerrado brasileiro, e testadas para alguns dos principais mecanismos de promoção de crescimento de plantas. Apresentaram resultados positivos para as principais atividades de disponibilização de nutrientes *in vitro*, além de demonstrarem potencial antagonista contra fitopatógenos fúngicos. Os resultados obtidos revelam um pouco da diversidade microbiana rizosférica de *C. adamantium* e servem como base para futuros estudos que buscam aplicar a microbiologia agrícola na diminuição dos impactos da agricultura ao ambiente e a sociedade, além de estudo sobre a diversidade microbiana do Cerrado.

Este trabalho representa um esforço em tornar a agricultura mais sustentável e inteligente, explorando as já existentes relações entre planta e microrganismo. Os

achados também contribuem para fortalecer a pesquisa a respeito da riqueza dos recursos naturais, da ecologia, da biodiversidade e da biotecnologia do Cerrado brasileiro, especialmente no estado de Mato Grosso do Sul.

Normas da revista Journal of Soil Science and Plant Nutrition

Instructions for Authors

Graphical Abstract

We strongly encourage authors to include graphical abstracts in their submissions.

Types of papers

The journal considers for publication Original Articles, Short Communications, Reviews, Technical Notes, and Letters to the Editor.

Original paper

These are full-length papers describing original research (up to 4000 words) with the following sections:

- Abstract (no more than 250 words divided in: purpose, methods, results and conclusions)
- Introduction
- Material and methods
- Results
- Discussion
- Conclusions
- References

It is important to highlight that articles presenting results and discussion in the same section will be returned to author or rejected if needed.

Short communication

A straightforward manuscript reporting novel results that do not warrant a full-length article but that stand on their own (not a preliminary work). Length: up to 2500 words. The manuscript should present the following sections:

- Abstract (no more than 250 words divided in: purpose, methods, results and conclusions)
- Introduction
- Results and discussion
- Conclusions
- References

These are the only articles that can present results and discussion in the same section.

Review

Reviews cover topics of current and broad interest to the readership of the journal and provide important new insights based on critical and comprehensive literature synthesis. The Editor-in-Chief is pleased to consider inquiries from authors concerning the appropriateness of a review topic and receive manuscripts.

Technical Note

Technical notes report new developments, significant advances and novel aspects of experimental and theoretical methods and techniques which are relevant for scientific investigations within the journal scope. Usually, Technical Notes do not report results. Manuscripts of this type should be short (a few pages only).

Letter to the editor

Letters to the editor may be a substantial re-analysis of an article previously published in the Journal of Soil Science and Plant Nutrition or in another journal or a brief report of research findings adequate for the journal's scope and of particular interest to the community.

Manuscript Submission

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

The name(s) of the author(s)

The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country

A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

Large Language Models (LLMs), such as ChatGPT, do not currently satisfy our authorship criteria. Notably an attribution of authorship carries with it accountability for the work, which cannot be effectively applied to LLMs. Use of an LLM should be properly documented in the Methods section (and if a Methods section is not available, in a suitable alternative part) of the manuscript. The use of an LLM (or other AI-tool) for "AI assisted copy editing" purposes does not need to be declared. In this context, we define the term "AI assisted copy editing" as AI-assisted improvements to human-generated texts for readability and style, and to ensure that the texts are free of errors in grammar, spelling, punctuation and tone. These AI-assisted improvements may include wording and formatting changes to the texts, but do not include generative editorial work and autonomous content creation. In all cases, there must be human accountability for the final version of the text and agreement from the authors that the edits reflect their original work.

Abstract

Please provide a structured abstract of 150 to 250 words which should be divided into the following sections:

Purpose (stating the main purposes and research question)
Methods
Results
Conclusion

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration for prospectively registered trials
Trial registration number and date of registration followed by “retrospectively registered”, for retrospectively registered trials

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Statements and Declarations

The following statements should be included under the heading "Statements and Declarations" for inclusion in the published paper. Please note that submissions that do not include relevant declarations will be returned as incomplete.

Competing Interests: Authors are required to disclose financial or non-financial interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Please refer to “Competing Interests and Funding” below for more information on how to complete this section.

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
Use italics for emphasis.
Use the automatic page numbering function to number the pages.
Do not use field functions.
Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
Use the equation editor or MathType for equations.
Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using [Springer Nature's LaTeX template](#).

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

References

Citation

Cite references in the text in alphabetical order first, and chronological order second. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).
3. This effect has been widely studied (Abbott 2002; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1990; Medvec et al. 1999, 2000).

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Please alphabetize according to the following rules: 1) For one author, by name of author, then chronologically; 2) For two authors, by name of author, then name of coauthor, then chronologically; 3) For more than two authors, by name of first author, then chronologically.

If available, please always include DOIs as full DOI links in your reference list (e.g. "https://doi.org/abc").

Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of "et al" in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Doe J (1999) Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. Available via DIALOG. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document).

Accessed 15 Jan 1999

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

[ISSN.org LTWA](http://www.issn.org/LTWA)

If you are unsure, please use the full journal title.

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

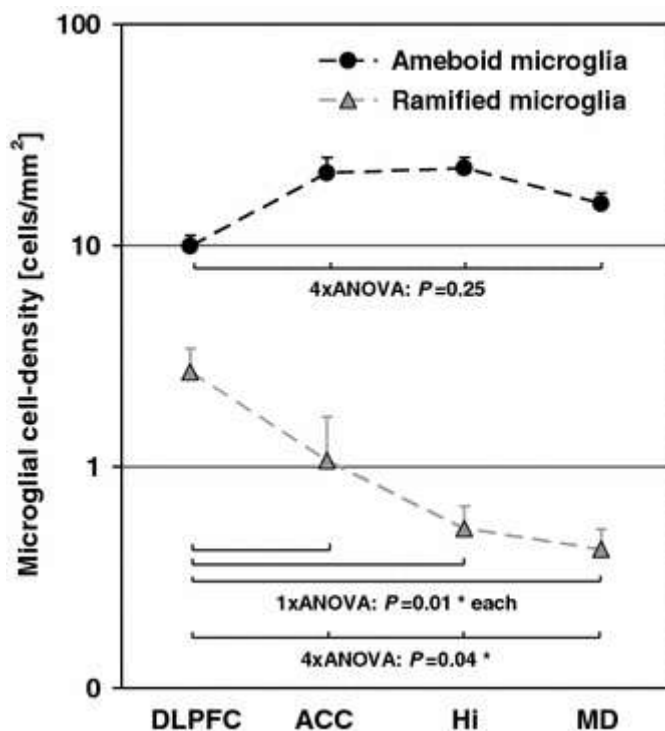
For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format.

MSPublisher files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



Definition: Black and white graphic with no shading.

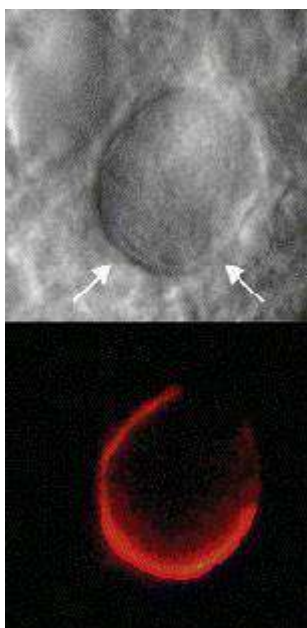
Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

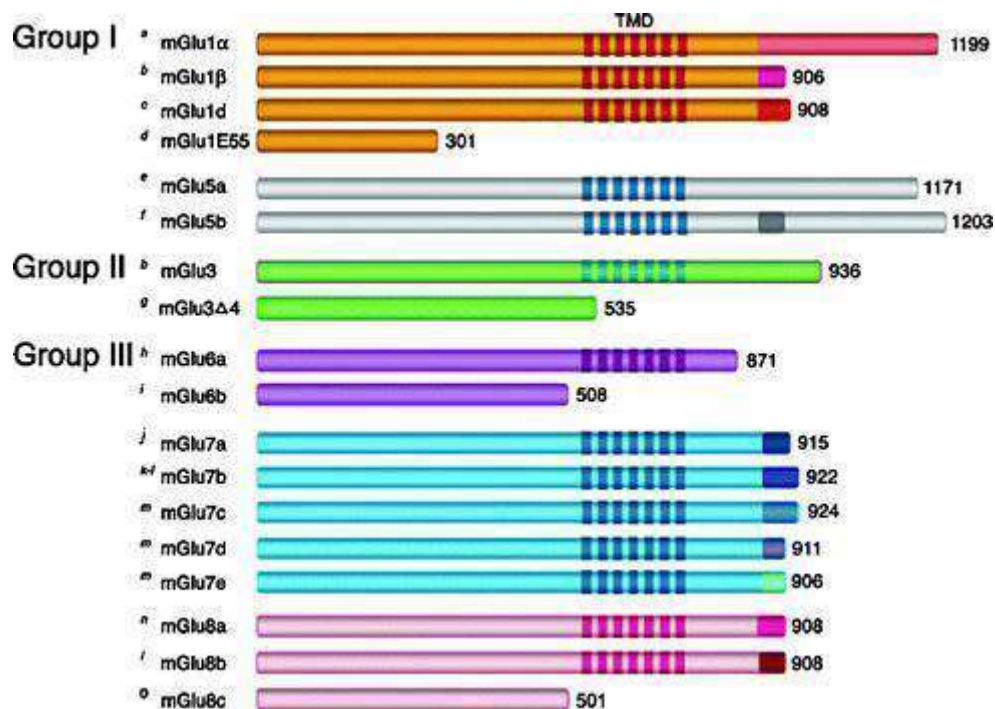
Halftone Art



Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.
If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.
Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted within the body of the text. Only if the file size of the manuscript causes problems in uploading it, the large figures should be submitted separately from the text.
When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.
For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.