

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**

**RAQUEL RODRIGUES GONÇALVES**

**DIVERSIDADE E POTENCIAL DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO  
DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE  
PALMA FORRAGEIRA**

**RECIFE**

**2023**

Raquel Rodrigues Gonçalves  
Engenheira Agrônoma

**Diversidade e potencial de promoção de crescimento de bactérias endofíticas de diferentes genótipos de palma forrageira**

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

Orientador: Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

**Recife  
2023**

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

---

G635d

Gonçalves, Raquel Rodrigues  
Diversidade e potencial de promoção de crescimento de bactérias endofíticas de diferentes genótipos de palma forrageira / Raquel Rodrigues Gonçalves. - 2023.  
72 f.

Orientador: Mario de Andrade Lira Junior.  
Coorientadora: Giselle Gomes .  
Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, 2023.

1. Opuntia. 2. . Nopalea. 3. BOX-PCR. 4. 16S rDNA. 5. Bactéria promotora de crescimento de plantas. I. Junior, Mario de Andrade Lira, orient. II. , Giselle Gomes, coorient. III. Título

CDD 631.4

---

RAQUEL RODRIGUES GONÇALVES

**Diversidade e potencial de promoção de crescimento de bactérias endofíticas de diferentes genótipos de palma forrageira**

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

Aprovada em 31 de julho de 2023

---

Prof. Dr. Mario de Andrade Lira Junior

Orientador

Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Eric Xavier de Carvalho

Instituto Agronômico de Pernambuco

---

Profa. Dra. Giselle Gomes Monteiro Fracetto

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico as pessoas que são minha base em tudo, minha mãe Francisca e as minhas irmãs Raianny e Vanusa.

A fé é o firme fundamento das coisas  
que se esperam, e a prova das coisas  
que não se vê. (Hebreus 11:1)

## AGRADECIMENTOS

Nessa caminhada aprendi que nada se constrói sozinho, mas sim com esforço e dedicação de muitos.

Agradeço primeiramente a Deus que esteve à frente de tudo em todos os momentos.

Ao meu marido, Marcelo por todo apoio e dedicação durante esse processo.

A minha mãe Francisca que desde cedo me incentivou a questionar o motivo de tudo e, através desse questionamento, buscar respostas.

As minhas irmãs Vanusa e Raianny, por sempre estarem ao meu lado em qualquer decisão e em todos os momentos bons e ruins.

A minha querida amiga e companheira de trabalho, Pâmella, cuja presença iluminada, amorosa e paciente tornou esta jornada mais leve. Agradeço por tudo.

Ao meu orientador, Professor Mário, cuja paciência e bom humor diante das adversidades me fez acreditar que todas as coisas podem ser resolvidas.

A minha coorientadora Professora Giselle por toda ajuda nesse processo.

As minhas queridas amigas Isabel e Rafaela, vocês são incríveis, independente do que acontece sempre estão com um sorriso no rosto, vocês são luz.

Ao meu amigo Alysson, você me ajudou do primeiro ao último dia, sempre com uma paciência inabalável, meu muito obrigada por tudo.

Aos meus amigos vindos da faculdade para o mestrado, Nino e Sávio.

A Cintia e Petrônio por toda a paciência em ensinar tantas coisas dentro do laboratório.

As estagiárias que fizeram parte desse processo, Priscila, Mariana e Jéssica.

Aos demais estagiários do laboratório, Diogo, Maria Eduarda, Gabriela Melo e Gabriela, pelos momentos de descontração em tantos momentos tensos.

Aos meus colegas de laboratório, Nayara Rose, Midouim, Vitória e Flávia, vocês são incríveis.

Aos meus colegas de turma Verônica, Crissogno, Joyce e Taila.

A Vânia e Verinha, por toda dedicação no trabalho de vocês.

Aos meus professores, Felipe, Jean e Brivaldo por todo o conhecimento que transmitiram.

Ao técnico do laboratório de Solos Eudes por toda a ajuda nas análises de solo.

Ao laboratório inseto-toxico na pessoa do técnico Marcos e Professor Hebert por terem me ajudado nos momentos de análises, além de elucidado várias dúvidas desse processo.

Ao laboratório de bacteriologia na pessoa do professor Marco Gama, Fabíola e Lucas por estar sempre com as portas do laboratório abertas.

A equipe do IPA na pessoa do Dr. Erick e Dra. Maria do Carmo, por toda a ajuda em momentos cruciais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão de bolsa e o Programa de Apoio a Pós-Graduação – PROAP CAPES, financiando os demais itens da pesquisa.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE e ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo – PPGCS, por toda a infraestrutura disponível.

A todos os que não foram citados aqui, mas que fizeram parte direta ou indiretamente, meu muito obrigada a todos.

## Diversidade e potencial de promoção de crescimento de bactérias endofíticas de diferentes genótipos de palma forrageira

### RESUMO GERAL

As bactérias endofíticas são encontradas em todas as espécies vegetais. Plantas em regiões secas, como as cactáceas, abrigam microrganismos endofíticos benéficos que podem ser uma solução promissora, pois têm o potencial de aliviar o estresse. Desse modo, o trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade e o potencial de bactérias endofíticas isoladas de diferentes genótipos da palma forrageira para promoção de crescimento de plantas. Foram avaliados seis cultivares de palma, IPA-20 (*Opuntia ficus-indica*), orelha de elefante africana (*O. undulata Griffiths*), orelha de elefante mexicana (*O. stricta Haw*), miúda de nopalea, IPA Sertânia, F 21 (todas *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). Foram isolados 241 estirpes, usando o BOX-PCR para análise de diversidade, culminando em 186 grupos a 100% de similaridade. O sequenciamento do gene 16S rRNA foi feito para bactérias que apresentavam o gene *acdS*, que codifica para a enzima ACC deaminase. Os grupos formados pelo BOX, foram testados para os mecanismos de promoção de crescimento. A presença do gene *acdS* e *nifH* foi detectada por PCR. A quantificação da produção de AIA se deu pelo enriquecimento do meio com L-triptofano e usando reagente Salkowski para coloração e espectrometria para leitura. A solubilização de fosfato foi indicada pelo surgimento de um halo em meio contendo fosfato insolúvel. A produção de sideróforos foi feita em meio sem ferro, utilizando o reagente CAS para coloração e análise por espectrometria. A adaptação osmótica foi testada em três níveis de estresse (10%, 20% e 30% de PEG<sub>8000</sub>) e analisada por densidade óptica. 24 isolados foram positivos para o gene *acdS* e enviadas para o sequenciamento. 15 estirpes mostraram 95,04% - 99,76% de similaridade com estirpes descritas no BLAST, identificados em, 3 filos, 4 classes, 7 ordens, 9 famílias e 10 gêneros: *Ralstonia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Desertihabitans*, *Stenotrophomonas*, *Priestia*, *Citrobacter*, *Micrococcus* e *Acinetobacter*. Na avaliação *in vitro*, 41 estirpes amplificaram para o gene *nifH*. 30 estirpes foram produtores de AIA, 15 estirpes conseguiram solubilizar fosfato de cálcio, 75 estirpes produziram sideróforos e 66 isolados suportaram estresse osmótico em ao menos um nível. As estirpes foram agrupadas pela quantidade de mecanismos que produziram, 75 produziram apenas um mecanismo, 55 tinham dois mecanismos, 17 tinham três mecanismos e apenas 4 apresentaram 4 mecanismos. Os testes estatísticos demonstram não haver diferença significativa entre a quantidade de isolados dos gêneros da palma. Entretanto, o gênero *Opuntia* teve mais isolados produtores de mecanismo que o gênero *Nopalea*, além de que das 15 estirpes classificadas ao nível de gênero 14 são *Opuntia*. As bactérias isoladas da palma forrageira demonstraram *in vitro* terem capacidade de serem promotoras de crescimento. Entretanto, é necessário ainda realizar testes *in vivo* para comprovar a eficiência em diferentes situações.

Palavras-chave: *Opuntia*. *Nopalea*. BOX-PCR. 16S rDNA. Bactéria promotora de crescimento de plantas.

## Diversity and growth promotion potential of endophytic bacteria from different genotypes of forage palm

### GENERAL ABSTRACT

Endophytic bacteria are found in all plant species. Plants in dry regions, such as cacti, harbor beneficial endophytic microorganisms that can be a promising solution as they have the potential to alleviate stress. Thus, the study aimed to evaluate the diversity and potential of endophytic bacteria isolated from different genotypes of forage palm for plant growth promotion. Six cultivars of palm were evaluated: IPA-20 (*Opuntia fucus-indica*), African elephant ear (*O. undulata* Griffiths), Mexican elephant ear (*O. stricta* Haw), small nopalea, IPA Sertânia, and F 21 (all *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). A total of 241 strains were isolated using BOX-PCR for diversity analysis, resulting in 186 groups at 100% similarity. Gene sequencing of the 16S rRNA gene was performed for bacteria containing the *acdS* gene, which encodes the ACC deaminase enzyme. The groups formed by BOX were tested for growth promotion mechanisms. The presence of the *acdS* and *nifH* genes was detected by PCR. IAA production was quantified by enriching the medium with L-tryptophan and using the Salkowski reagent for coloration and spectrometry for reading. Phosphate solubilization was indicated by the appearance of a halo in a medium containing insoluble phosphate. Siderophore production was conducted in an iron-free medium using the CAS reagent for coloration and analysis by spectrometry. Osmotic adaptation was tested at three stress levels (10%, 20%, and 30% PEG<sub>8000</sub>) and analyzed by optical density. Twenty-four isolates were positive for the *acdS* gene and sent for sequencing. Fifteen strains showed 95.04% - 99.76% similarity with strains described in the BLAST, identified in 3 phyla, 4 classes, 7 orders, 9 families, and 10 genera: *Ralstonia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Desertihabitans*, *Stenotrophomonas*, *Priestia*, *Citrobacter*, *Micrococcus*, and *Acinetobacter*. In the in vitro evaluation, 41 strains amplified the *nifH* gene. Thirty strains were IAA producers, 15 strains were able to solubilize calcium phosphate, 75 strains produced siderophores, and 66 isolates withstood osmotic stress at least at one level. The strains were grouped based on the number of mechanisms they produced: 75 produced only one mechanism, 55 had two mechanisms, 17 had three mechanisms, and only 4 presented 4 mechanisms. Statistical tests showed no significant difference in the quantity of isolates among palm genera. However, the genus *Opuntia* had more isolates producing mechanisms compared to the genus *Nopalea*, and out of the 15 strains classified at the genus level, 14 were *Opuntia*. The bacteria isolated from forage palm demonstrated in vitro capacity to promote growth. However, further in vivo tests are necessary to confirm their efficiency in different situations.

Keywords: *Opuntia*. *Nopalea*. BOX-PCR. 16S rDNA. Plant growth-promoting bacteria.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Dendrograma de similaridade BOX-PCR dos isolados dos cladódios da palma forrageira do gênero *Opuntia* e *Nopalea*. ..... 38
- Figura 2** - Árvore filogenética determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro Jukes Cantor e teste de bootstrap com 1000 repetições das sequências do gene 16S rRNA dos isolados da palma forrageira. ....41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Genótipos da palma forrageira e suas características .....	33
<b>Tabela 2</b> - Análise química e física do solo.. .....	34
<b>Tabela 3</b> - Primers, sequências e condições das reações para as técnicas de PCR, BOX-PCR, gene acdS e 16S rRNA.....	37
<b>Tabela 4</b> - Médias e desvio padrão das unidades formadoras de colônias (UFC) e isolados dos cladódios da palma forrageira dos gêneros Opuntia e Nopalea. ....	39
<b>Tabela 5</b> - Médias e desvio padrão dos isolados agrupados pela técnica BOX-PCR e índices de diversidade, dos diferentes gêneros da palma forrageira.. .....	39
<b>Tabela 6</b> - Identificação genética dos isolados com base na similaridade das sequências de nucleotídeos. ....	44
<b>Tabela 7</b> - Correlação das estirpes classificadas a nível de gênero e mecanismos associados a promoção de crescimento.....	44
<b>Tabela 8</b> - Análise química e física do solo.. .....	62
<b>Tabela 9</b> - Teste de qui-quadrado (X <sup>2</sup> ) para os mecanismos de promoção de crescimento em plantas, com as estirpes isoladas dos gêneros Opuntia e Nopalea na palma forrageira.....	61
<b>Tabela 10</b> - Teste de qui-quadrado (X <sup>2</sup> ) para a quantidade de estirpes por mecanismos, dos isolados provenientes da palma forrageira do gênero Opuntia e Nopalea.....	62
<b>Tabela 11</b> - Estirpes isoladas da palma forrageira com maiores quantidades de mecanismos de promoção de crescimento em plantas. ....	65

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	15
1.1 Hipóteses.....	16
1.2 Objetivos.....	16
1.2.1 <i>Objetivo Geral</i> .....	16
1.2.2 <i>Objetivos Específicos</i> .....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
2.1 Escassez de água para a agricultura .....	17
2.2 Bactérias endofíticas .....	17
2.3 Mecanismos de promoção de crescimento .....	18
2.4 Diversidade de bactérias endofíticas associadas a plantas de regiões semiáridas .....	20
2.5 Palma forrageira.....	20
2.6 Influência do genótipo de plantas na comunidade microbiana.....	21
2.7 Análise de diversidade .....	22
Referências Bibliográficas .....	23
3 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS AOS DIFERENTES GENÓTIPOS DA PALMA FORRAGEIRA .....	28
Resumo .....	28
Abstract.....	29
3.1 Introdução .....	30
3.2 Material e métodos.....	32
3.2.1 <i>Local de coleta</i> .....	32
3.2.2 <i>Caracterização química e física do solo</i> .....	33
3.2.3 <i>Isolamento das bactérias</i> .....	33
3.2.4 <i>Extração de DNA</i> .....	33
3.2.5 <i>BOX-PCR</i> .....	33
3.2.6 <i>Índice de diversidade</i> .....	34

3.2.7 Amplificação do gene ACC Deaminase .....	35
3.2.8 Sequenciamento dos fragmentos dos 16S rRNA .....	35
3.2.9 Análise comparativa das sequências dos 16S rRNA.....	35
3.2.10 Análises estatística .....	36
3.3 Resultados .....	37
3.3.1 Estimativa de UFC.....	37
3.3.2 Análise BOX-PCR.....	37
3.3.3 Índices de diversidade.....	39
3.3.4 Amplificação do gene ACC deaminase .....	39
3.3.5 Sequenciamento 16S rRNA.....	39
3.3.6 Relações filogenéticas dos isolados bacterianos .....	41
3.4 Discussão .....	42
3.5 Conclusões .....	45
Referências Bibliográficas .....	46
4 ANÁLISE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE PALMA FORRAGEIRA .....	52
Resumo.....	52
Abstract .....	53
4.1 Introdução .....	54
4.2 Material e métodos.....	56
4.2.1 Local de coleta .....	56
4.2.2 Caracterização química e física do solo.....	56
4.2.3 Isolamento das bactérias .....	56
4.2.4 Extração de DNA .....	57
4.2.5 BOX-PCR.....	57
4.2.6 Amplificação do gene ACC Deaminase .....	57
4.2.7 Amplificação gene <i>nifH</i> .....	57

<i>4.2.8 Produção de ácido indol acético</i> .....	58
<i>4.2.9 Produção de sideróforos</i> .....	58
<i>4.2.10 Solubilização de fosfato de cálcio</i> .....	59
<i>4.2.11 Teste de eficiência de crescimento por estresse osmótico</i> .....	59
<i>4.2.12 Análises estatísticas</i> .....	60
4.3 Resultados .....	61
<i>4.3.1 Compilação dos mecanismos testados para os isolados da palma</i> .....	62
4.4 Discussão .....	63
4.5 Conclusões .....	66
Referências Bibliográficas .....	67
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71



## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A demanda global por alimentos está em constante crescimento, o que exerce uma pressão sobre o setor agrícola para aumentar a produtividade, que tem acarretado impactos ecológicos significativos, como a perda de biodiversidade e a diminuição do estoque de carbono no solo. Ao mesmo tempo, o aquecimento global deverá levar a desafios para aumentar a produtividade de alimentos, como o déficit hídrico na estação de cultivo que reduzem a produção final.

Muitos microrganismos têm sido alvo de estudos devido ao seu potencial em promover o crescimento das plantas em diferentes situações. Dentro desse grupo de microrganismos, destacam-se as bactérias endofíticas, assim chamadas por viverem predominantemente ou durante toda a vida dentro das plantas, sem causar danos aos seus hospedeiros. As bactérias endofíticas estabelecem uma relação simbiótica com as plantas, colonizando tecidos vegetais como caules, folhas, raízes e sementes. Ao contrário das bactérias patogênicas, que causam doenças nas plantas, as bactérias endofíticas coexistem com seus hospedeiros, promovendo efeitos benéficos.

Uma das principais vantagens das bactérias endofíticas é sua capacidade de estimular o crescimento das plantas. Elas podem produzir hormônios vegetais, como auxinas, que estimulam o desenvolvimento radicular e o crescimento vegetativo. Além disso, algumas bactérias endofíticas possuem a habilidade de fixar o nitrogênio atmosférico, convertendo-o em uma forma utilizável pelas plantas. Isso melhora a nutrição nitrogenada das culturas, reduzindo a dependência de fertilizantes químicos. Esses microrganismos também podem produzir substâncias antibióticas e antifúngicas que inibem o crescimento de organismos prejudiciais às plantas, oferecendo proteção contra patógenos.

Recentemente, muitos estudos têm se concentrado em isolar bactérias endofíticas presentes em ambientes secos, onde as bactérias estão adaptadas a condições de escassez de água ou alto teor de salinidade. Com o crescente interesse em estudar plantas adaptadas a regiões semiáridas, como as cactáceas, muitos microrganismos com alto potencial biotecnológico têm sido isolados.

Essas bactérias endofíticas representam uma área de pesquisa promissora, uma vez que oferecem uma série de benefícios não apenas para as plantas hospedeiras, mas também para a agricultura na totalidade.

## **1.1 Hipóteses**

A diversidade dos microrganismos endofíticos na palma forrageira é influenciada pelos seus genótipos.

Os genótipos da palma forrageira apresentam diferentes proporções de bactérias endofíticas com mecanismos de promoção de crescimento e estresse abiótico.

## **1.2 Objetivos**

### ***1.2.1 Objetivo Geral***

Avaliar a diversidade e o potencial de bactérias endofíticas isoladas de diferentes genótipos da palma para promoção de crescimento de plantas e estresse abiótico.

### ***1.2.2 Objetivos Específicos***

1. Isolar bactérias endofíticas de seis genótipos da palma.
2. Avaliar a diversidade das populações de bactérias endofíticas entre os genótipos da palma.
3. Classificar as bactérias a nível de gênero.
4. Avaliar as bactérias *in vitro*, quanto a fixação biológica de nitrogênio, ACC deaminase, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, AIA e crescimento sob estresse hídrico.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Escassez de água para a agricultura**

As mudanças climáticas têm um impacto significativo na produção de alimentos em todo o mundo, afetando a maioria da população mundial. (WILHITE; SIVAKUMAR; PULWARTY, 2014; FAWOLE; OZKAN; AYANRINDE, 2016). A escassez de água está prejudicando o rendimento das colheitas em mais de 70 % das terras aráveis da Terra, que resulta em uma cascata de desastres interligados, como quebra de safra na agricultura, redução do suprimento de alimentos e insegurança alimentar, levando à fome, desnutrição, agitação social e deslocamento interno de populações (KISSINGER, 2016).

O estresse da seca é um fator inevitável que dificulta a produção, qualidade e quantidade da biomassa vegetal. O estresse ocorre devido à dinâmica da temperatura, intensidade da luz e baixa pluviosidade e afeta severamente os atributos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares das plantas com impacto na produtividade (SELEIMAN et al., 2021).

Com esse problema, novas técnicas agrícolas emergentes são necessárias incluindo a exploração de bactérias endofíticas, que estabelecem uma relação simbiótica com a planta hospedeira e síntese de nutrientes que oferecem condições favoráveis para resistir ao estresse hídrico nas plantas (FOUDA et al., 2021).

### **2.2 Bactérias endofíticas**

Bactérias endofíticas são microrganismos que residem no tecido vegetal sem causar doenças e estabelecem uma relação sinérgica com suas plantas hospedeiras (PASSARI et al., 2020) e habitam principalmente as raízes, caules, folhas e sementes (ISHIDA; FURUYA, 2021). Embora as bactérias endofíticas ocupem principalmente os espaços intercelulares devido à abundância de carboidratos, aminoácidos e outros nutrientes, algumas também são capazes de colonização intracelular (PINSKI et al., 2019). Algumas bactérias endofíticas permanecem próximas ao seu ponto de entrada, enquanto outras são capazes de se espalhar sistemicamente para outras partes da planta (PINSKI et al., 2019).

As bactérias endofíticas desempenham um papel importante ao fornecer uma variedade de metabólitos secundários ao hospedeiro, incluindo antioxidantes, que desempenham um papel essencial na proteção das plantas contra condições adversas (GULCIN, 2020). Elas reduzem os riscos de diferentes fontes de estresse, aumentando o suprimento de nutrientes e a resistência

da planta hospedeira e melhorando e sua capacidade de competir contra patógenos (LI et al., 2018). As funções benéficas atribuídas às bactérias endofíticas incluem a promoção do crescimento das plantas, fornecendo nutrientes, proteção contra estresses bióticos e abióticos, desintoxicação de compostos nocivos e a produção de compostos bioativos (HARDOIM et al., 2015).

Zhang et al. (2019) destacam que vários estudos têm demonstrado a relevância de bactérias endofíticas no crescimento e aptidão de culturas como milho, soja e trigo. As bactérias endofíticas já foram encontradas em muitas plantas estudadas, com uma gama de isolados com grande potencial agrícola, em diferentes tipos de solo, clima e plantas (AFZAL et al., 2019). O uso de bactérias associadas a plantas de regiões áridas e semiáridas parece ter um maior potencial para aliviar os efeitos negativos do estresse hídrico em plantas não desérticas estressadas por déficit hídrico (FOUDA et al., 2020).

As bactérias *Pseudomonas* sp. e *Pantoea agglomerans* foram isoladas de *Stipagrostis pennata*, uma espécie de planta pioneira no deserto, e inoculadas em duas cultivares de trigo, (Sirvan, resistente à seca, e Sivand, sensível à seca) sob condições de déficit hídrico, e foi demonstrado a eficiência das cepas no alívio do estresse (NADERI et al., 2022). Bactérias endofíticas isoladas de plantas nativas de uma região árida demonstraram grande eficiência na promoção de crescimento do milho (*Zea mays*), submetido a estresse hídrico (FOUDA et al., 2020). Bactérias endofíticas isoladas de um cacto do deserto (*Euphorbia trigonas* Mill) foram capazes de conferir tolerância à seca e induzir a promoção do crescimento em tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (EKE et al., 2019).

### **2.3 Mecanismos de promoção de crescimento**

A promoção de crescimento das plantas por bactérias pode ser por mecanismos diretos e indiretos (SANTOYO et al., 2016). O efeito benéfico pode ser diretamente relacionado ao metabolismo microbiano, como fixação de nitrogênio, solubilização de fosfato e supressão de patógenos ou indiretamente, pela estimulação de atividades específicas da planta hospedeira, levando a um aumento da catálise enzimática e aumento da absorção de água e nutrientes ou respostas de defesa (PACIFICO et al., 2019).

A fixação biológica de N pode ocorrer por associações simbióticas, através do desenvolvimento de nódulos radiculares (OLDROYD, 2013), ou por associações não nodulares, com as bactérias podendo viver dentro dos tecidos vegetais (CARVALHO et al., 2016). Bactérias isoladas de cultivares de mandioca (*Manibot esculenta* Crantz), identificadas

como *Curtobacterium*, foram inoculadas em outras cultivares de mandioca e foi demonstrado que a biomassa de raízes, caules e folhas de mandioca inoculadas com essa cepa aumentaram 17,6 %, 12,6 % e 10,3 %, respectivamente, em relação à testemunha, e atribuíram à alta atividade de nitrogenase ( $95,81 \text{ nmol mL}^{-1}$ ), sendo considerada uma bactéria fixadora de nitrogênio (ZHANG et al., 2022).

A solubilização de fosfato é um outro mecanismo importante, pois apesar da quantidade de fósforo no solo ser geralmente alta, a maior parte é pouco disponível para absorção das plantas (GLICK, 2012). Bactérias endofíticas podem aumentar a disponibilidade do fósforo indisponível para as plantas, solubilizando fosfatos precipitados, usando mecanismos como acidificação e quelação (AFZAL et al., 2019). Duas bactérias altamente solubilizadoras de fosfato foram selecionadas de biblioteca de endófitos para testes de eficiência em estufa, demonstrando que *Pseudomonas psychrotolerans* e *Bacillus subtilis* promovem significativamente o crescimento de tomate e apresentam atividades de solubilização de fosfato pela redução do pH causada pela produção de ácido glucônico (MEI et al., 2021).

A produção de sideróforos é outro mecanismo relevante, no qual os endófitos sintetizam pequenos compostos moleculares quelantes e disponibilizam o ferro para uso das plantas (YADAV et al., 2015). A quelação de ferro não é o único benefício proporcionado às plantas pelas bactérias produtoras de sideróforos (AFZAL et al., 2019). Elas também auxiliam na defesa contra patógenos, através da produção de metabólitos secundários e espessamento da parede celular (AZNAR; DELLAGI, 2015). Cepas de *Bacillus* spp., isoladas de plantas oriundas da Caatinga, foram inoculadas em milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*), com ótimas respostas para o crescimento das plantas, acúmulo de nitrogênio e presença de sideróforos (AQUINO et al., 2019).

Os endófitos produzem também fitohormônios que aumentam a promoção do crescimento das plantas e alteram a morfologia e a estrutura da planta como o ácido indol acético (AIA) (FADIJI; BABALOLA, 2020). Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* foram inoculadas em plantas de arroz em condições de estresse salino, em que o AIA afetou positivamente o desenvolvimento radicular, propiciando o estabelecimento mais rápido das mudas (GREETATORN et al., 2019). Resultados semelhantes foram encontrados ao inocular uma cepa de *Bacillus subtilis* altamente produtora de AIA em tomate, o que aumentou significativamente a biomassa da parte aérea, radicular e os teores de clorofila (KHAN et al., 2016). Outro exemplo é a inoculação de uma cepa de *Enterobacter cloacae* em amendoim (*Arachis hypogaea*) em condições de estresse hídrico, resultando no maior índice de germinação e aumento radicular, atribuídos ao AIA (PANIGRAHI, MOHANTY; RATH,

2020).

Outro mecanismo muito importante é a produção do 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase que cliva o ACC, um precursor imediato do etileno (MAHESHWARI; BHUTANI; SUNEJA, 2020). A atividade enzimática da ACC deaminase evita aumentos excessivos na síntese de etileno sob várias condições de estresse e é um dos mecanismos mais eficientes para induzir a tolerância das plantas a condições de estresse (OROZCO-MOSQUEDA; CLICK; SANTOYO, 2020). Bactérias inoculadas em plantas de ervilha (*Pisum sativum*), do gênero *Bacillus* spp. submetidas a estresse salino, comprovando a atividade da ACC desaminase por ensaio enzimático, com as cepas demonstrando melhorar o crescimento da planta de ervilha, incluindo comprimento de raiz e parte aérea e peso fresco e seco de um a quatro vezes em comparação com o controle (MAHESHWARI; BHUTANI; SUNEJA, 2020).

#### **2.4 Diversidade de bactérias endofíticas associadas a plantas de regiões semiáridas**

As plantas que habitam regiões semiáridas enfrentam desafios tanto de natureza biótica quanto abiótica, o que resulta na presença de microrganismos capazes de promover o crescimento vegetal mesmo em condições estressantes (NAYLOR; COLEMAN-DERR, 2018). Zonas semiáridas apresentam uma alta diversidade de microrganismos, cuja atividade, abundância e composição das populações bacterianas são influenciadas por vários fatores bióticos e abióticos (RILLING et al., 2019).

Muitas plantas de regiões semiáridas já foram estudadas, como gramíneas perenes de áreas desérticas, que isolaram cepas de *Bacillus* e *Enterobacter*, que quando inoculadas na rizosfera de plântulas de trigo e milho, atrasaram o aparecimento de sintomas de estresse hídrico (JOCHUM et al., 2019). Além de cepas de *Streptomyces* que já foram isoladas de Cactáceas e posteriormente, testado a eficiência plântulas de trigo submetidas a estresse hídrico, com a cepa conseguindo conferir resistência ao estresse hídrico e promover o crescimento (GOVINDASAMY et al., 2022). Bactérias isoladas da rizosfera de cactáceas do semiárido brasileiro, principalmente do gênero *Bacillus*, também já demonstraram potencial no alívio do estresse em milho causado por déficit hídrico (KAVAMURA et al., 2013).

#### **2.5 Palma forrageira**

A palma é uma cactácea, de grande importância para a alimentação humana e de rebanhos nas regiões secas de todo o Brasil e do mundo, devido, principalmente, a sua

resistência à falta de água, a rusticidade e elevada produtividade. No Brasil, o cultivo da palma é destinado em quase sua totalidade à produção de forragem utilizada na alimentação animal, diferentemente de outros países onde o seu cultivo é feito para alimento humano (NEVES *et al.*, 2020).

Os palméis situados no estado de Pernambuco foram quase dizimados pela cochonilha do carmim, e em função disto, o Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) vem estudando a muitos anos dois gêneros de palma, *Opuntia* com as cultivares, IPA-20 (*Opuntia fucus-indica*), orelha de elefante africana (*O. undulata Griffiths*), Orelha de Elefante Mexicana (*O. stricta Haw*), e *Nopalea*, com os genótipos miúda de Nopalea IPA Sertânia, F 21 (todas *Nopalea cochenillifera*), as quais são resistentes a esta praga e são indicadas para o plantio em todo o estado do Pernambuco (LIRA, 2016).

O Gênero *Opuntia* possui plantas de porte bem desenvolvido e caule pouco ramificado, o que lhes transmite um aspecto ereto e crescimento vertical pouco frondoso com raquetes maiores, sendo plantas mais produtiva e resistente às regiões secas, no entanto é menos palatável para os animais e de menor valor nutricional. Já a *Nopalea* tem plantas de porte pequeno e caule bastante ramificado e raquetes menores, sendo o gênero mais nutritivo e palatável, porém apresenta menor resistência à seca (SILVA; SAMPAIO, 2015). Vale salientar que o gênero *Nopalea* passou por uma mudança taxonômica e agora é conhecida como *Opuntia cochenillifera* Kast (HALSSLER, 2022). No entanto, existem grandes diferenças fenotípicas entre os genótipos da palma (SILVA; SAMPAIO, 2015).

Alguns estudos já foram conduzidos no intuito de isolar bactérias endofíticas da palma forrageira de ambos os gêneros sendo isolados bactérias fixadoras de nitrogênio dos gêneros *Azospirillum* e *Methylobacterium*, de cladódios de palma forrageira, que apresentaram grande potencial biotecnológico (SILVA *et al.*, 2014). Diferentes cultivares de palma demonstraram apresentar diferentes microrganismos, como algumas cepas de *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Azotobacter* e *Gluconacetobacte*, com grande potencial para a promoção de crescimento em plantas (LYRA *et al.*, 2013).

## **2.6 Influência do genótipo de plantas na comunidade microbiana**

O genótipo pode afetar a diversidade de microrganismos endofíticos na planta, através dos exsudatos radiculares liberados (FAVELA *et al.*, 2021). Por exemplo, diferentes cultivares de alfafa (*Medicago sativa*) possuem distintos grupos de microrganismos (KANG *et al.*, 2019). Foram isoladas bactérias promotoras de crescimento de cinco espécies de cana-de-açúcar

(*Saccharum officinarum*, *S. barberi*, *S. robustum*, *S. spontaneum* e *S. sinense*), sendo encontrado diferentes cepas de *Enterobacter* em cada espécie, e quase todas as cepas exibiram características de promoção de crescimento, atividade de biocontrole, bem como tolerância a condições ambientais (GUO et al., 2020). Em outro trabalho estudando a cana-de-açúcar, foram isoladas duas cepas bacterianas, *Kosakonia arachidis* e *Pantoea cyripedii* em duas espécies distintas de cana-de-açúcar que propiciaram a fixação biológica de nitrogênio (SINGH et al., 2021).

## 2.7 Análise de diversidade

Para plena compreensão da diversidade, é necessário realizar uma análise de diversidade dos microrganismos presentes em uma amostra (ERCOLE et al., 2021). A análise de diversidade pode ser realizada por meio de diversas técnicas moleculares, como a técnica de PCR-BOX. Esta técnica é baseada na análise de perfis de DNA que identificam regiões repetitivas e altamente conservadas localizadas no cromossomo bacteriano, isso impede que estirpes distintas apresentem o mesmo perfil de bandas, tornando-a uma técnica eficaz para detectar a diversidade bacteriana (EL-BADAWY et al., 2020).

Vários estudos têm utilizado essa técnica e tem sido observado uma alta diversidade intraespecífica entre isolados com base nos perfis PCR-BOX (ERCOLE et al., 2021). Entretanto, entre as várias técnicas e abordagens utilizadas na análise da diversidade bacteriana, a técnica de sequenciamento de genes é um dos métodos mais comuns. O sequenciamento de genes bacterianos, como o gene 16S rRNA, permite identificar e comparar as sequências genéticas, proporcionando informações mais precisas sobre a diversidade bacteriana (SCHMIDT; DELONG; PACE, 1991).

## Referências Bibliográficas

AFZAL, I.; KHAN, Z.; SIKANDAR, S.; SHAHZAD, S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological Research Journal**, v. 221, n. April 2018, p. 36–49, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>

AZNAR, A.; DELLAGI, A. New insights into the role of siderophores as triggers of plant immunity: what can we learn from animals? **Journal of Experimental Botany**, v. 66, n. 11, p. 3001–3010, 2015. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv155>

BECHTAOUI, N.; RABIU, M. K.; RAKLAMI, A.; OUTDOU, K. .; HAFIDI, M.; JEMO, M. Phosphate-Dependent Regulation of Growth and Stresses Management in Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.679916>

CARVALHO, T.L.G.; BALLESTEROS, H.G.F.; THIEBAUT, F.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Pleased to meet you: Genetic, epigenetic, and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-legume plants. **Plant Molecular Biology**, v. 90, p. 561–574, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11103-016-0435-1>

CHEN, F.; SONG, Y.; LI, X.; CHEN, J.; MO, L.; ZHANG, X.; LIN, Z.; ZHANG, L. Genome sequences of horticultural plants: Past, present, and future. *Horticulture Research*, v. 6 p. 112, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0195-6>

AQUINO, J. P. A.; DE MACEDO JUNIOR, F. B.; ANTUNES, J. E. L.; FIGUEIREDO, M.V. B.; NETO, F. A. Plant growth-promoting endophytic bacteria on maize and sorghum1. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v. 49, p. 1–9, 2019. <https://doi.org/10.1590/1983-40632019v4956241>

EL-BADAWY, M. F.; EL-FAR, S. W.; ALTHOBAITI, S. S.; ABOU-ELAZM, F. I.; SHOHAYEB, M. M. The First Egyptian Report Showing the Co-Existence of blaNDM25, blaOXA-23, blaOXA-181, and blaGES-1 Among Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae* Clinical Isolates Genotyped by BOX-PCR. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 1237-1250, 2020. <https://doi.org/10.2147/IDR.S244064>

ERCOLE, T.G.; SAVI, D.C.; ADAMOSKI, D.; KAVA, V. M.; HUNGRIA, M.; GALLITERASAWA, L. V. Diversity of maize (*Zea mays* L.) rhizobacteria with potential to promote plant growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, p. 1807–1823, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00596-y>

EKE, P.; KUMAR, A.; SAHU, K. P.; WAKAM, L. N.; SHEORAN, N.; ASHAJYOTHI, M.; PATEL, A.; FEKAM, F. B. Endophytic bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigonas* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Microbiological Research**, v.228, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126302>

FADIJI, A. E.; BABALOLA, O. O. Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities with Multifunctional Prospects \_ Enhanced Reader.pdf. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. 2296–4185, p. 1–20, 2020.

<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00467>

FAVELA, A.; BOHN, M.; KENT, A.; KENT, A. Maize germplasm chronosequence shows crop breeding history impacts recruitment of the rhizosphere microbiome. **The ISME Journal**, v. 15, p. 2454–2464, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00923-z>

FAWOLE, W.O.; OZKAN, B.; AYANRINDE, F.A. Measuring food security status among households in Osun State, Nigeria. **British Food Journal**, v. 118, p. 1554–1567, 2016. <https://doi.org/10.1108/BFJ-11-2015-0425>

FOUDA, A.; EID, A.M.; ELSAIED, A.; EL-BELELY, E.F.; BARGHOTH, M.G.; AZAB, E.; GOBOURI, A.A.; HASSAN, S.E. Plant Growth-Promoting Endophytic Bacterial Community Inhabiting the Leaves of *Pulicaria incisa* (Lam.) DC Inherent to Arid Regions. **Plants**, v. 10, p. 76, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10010076>

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica** (Cairo), v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

GOVINDASAMY, V.; GEORGE, P.; RAMESH, S. V.; SURESHKUMAR, P.; RANE, J.; MINHAS, P. S. Characterization of root-endophytic actinobacteria from cactus (*Opuntia ficus-indica*) for plant growth promoting traits. *Archives of Microbiology*, v. 204, p. 1–14, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02671-2>

GREETATORN, T.; HASHIMOTO, S.; MAEDA, T.; FUKUDOME, M.; PIROMYOU, P.; TEAMTISONG, K.; TITTABUTR, P.; BOONKERD, N.; KAWAGUCHI, M.; UCHIUMI, T.; TEAUMROONG, N. Mechanisms of Rice Endophytic Bradyrhizobial Cell Differentiation and Its Role in Nitrogen Fixation. **Microbes and Environments**, v. 35, 2020. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME20049>

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Arch Toxicol**, v. 94, p. 3, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

GUO, D. J.; SINGH, R. K.; SINGH, P.; SHARMA, A.; XING, Y. X.; SONG, X. P.; YANG, L.T.; Li, Y. R. Complete Genome Sequence of *Enterobacter roggenkampii* ED5, a Nitrogen Fixing Plant Growth Promoting Endophytic Bacterium with Biocontrol and Stress Tolerance Properties, Isolated from Sugarcane Root. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580081>

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M. SESSITSCH, A. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00050-14>

HASSLER, M. (2022). Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World. In O. BÁNKI, Y.; ROSKOV, M.; DÖRING, G.; OWER, L.; VANDEPITTE, D.; HOBERN, D.; REMSEN, P.; SCHALK, R. E.; DEWALT, M.; KEPING, J.; MILLER, T.; ORRELL, R.; AALBU, J.; ABBOTT, R.; ADLARD, E.; M.; ADRIAENSSENS, C.; AEDO, E.; AESCHT, N.; AKKARI, **Catalogue of Life Checklist**, 2022. <https://doi.org/10.48580/dfqt-3dd>

ISHIDA, A.; FURUYA, T. Diversity and characteristics of culturable endophytic bacteria from *Passiflora edulis* seeds. **MicrobiologyOpen**, v. 10, n. 4, p. 1–13, 2021.

<https://doi.org/10.1002/mbo3.1226>

KANG, W.; XIU, L.; JIANG, Z.; SHI, S.; Genetic diversity and symbiotic efficiency difference of endophytic rhizobia of *Medicago sativa*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 65, p. 68–83, 2019. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0158>

KAVAMURA, V.N.; SANTOS, S.N.; SILVA, J.L.; PARMA, M.M.; AVILA, L.A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T.D.; TAKETANI, R.G.; ANDREOTE, F.D.; MELO, I.S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v.168, p. 183-191, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.micres>

KHAN, A. L.; HALO, B.A.; ELYASSI, A.; ALI, S.; AL-HOSNI, K.; HUSSAIN, J.; AL-HARRASI, A.; LEE, J. Indole acetic acid and ACC deaminase from endophytic bacteria improves the growth of *Solanum lycopersicum*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 58-64, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.001>

KISSINGER, G. Pulse crops and sustainability: A framework to evaluate multiple benefits. Rome, Italy: **FAO**, 2016.

LI, Y.; LIU, K.; WANG, Y.; ZHOU, Z.; CHEN, C.; YE, P.; YU, F. Improvement of cadmium phytoremediation by centella asiatica l. after soil inoculation with cadmium-resistant enterobacter sp. fm-1. **Chemosphere**, V, 202, P. 280-288,2018.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.097>

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

LIRA, M. A. Palma Forrageira: Cultivo e Usos. **Cadernos do Semiárido: Riquezas & oportunidades / Conselho Regional de Engenharia e Agronomia de Pernambuco**, v. 2, n. 2526–2556, p. 1–62, 2016.

MAHESHWARI, R.; BHUTANI, N.; SUNEJA, P. Isolation and Characterization of ACC Deaminase Producing Endophytic *Bacillus mojavensis* PRN2 from *Pisum sativum*. **Iranian Journal Biotechnology**, v. 18, p. 539–547, 2020.

<https://doi.org/10.30498/IJB.2020.137279.2308>

MEI, C.; CHRETIEN, R. L.; AMARADASA, B. S.; TURNER, A.; LOWMAN, S. Characterization of Phosphate Solubilizing Bacterial Endophytes and Plant Growth Promotion *In Vitro* and in Greenhouse. **Microorganisms**, v. 9, p. 1–11, 2021.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms9091935>

NADERI, K.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A.; ARANI, A.M. Potential use of endophytic and rhizosphere bacteria from the desert plant *Stipagrostis pennata* as biostimulant against drought in wheat cultivars. **Rhizosphere**, v.24, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100617>

NAYLOR, D.; COLEMAN-DERR, D. Drought stress and root-associated bacterial communities. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1–16, 2018. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02223>

NEVES, F.P.; SPÍNOLA A. M.; CHAGAS, M.C. M.; NEVES, J. D. C.; KUSTER, I. S.; FIGUEIREDO, M. E. P.; OLIVEIRA, F. S.; OLIVEIRA, E. F.; PEREIRA, S. L. Palma forrageira: Opção e potencialidades para alimentação animal e humana em propriedades rurais do estado do Espírito Santo. **Incaper, Documentos**, v. 276, p. 52, 2020.

OLDROYD, G. E. D. Talk, Make Friends, and Between: Signaling Systems That Promote Beneficial Symbiotic Associations in Plants. **Nature Reviews Microbiology**, v.11, p. 252–263, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>

OROZCO-MOSQUEDA, M. C.; CLICK, B. R.; SANTOYO, G. ACC deaminase in plant growth-promoting bacteria (PGPB): An efficient mechanism to counter salt stress in crops. **Microbiological Research**, v. 235, p. 1–10, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126439>

PACIFICO, D.; SQUARTINI, A.; CRUCITTI, D.; BARIZZA, E.; LO SCHIAVO, F.; MURESU, R.; CARIMI, F.; ZOTTINI, M. The Role of the Endophytic Microbiome in the Grapevine Response to Environmental Triggers. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1–15, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01256>

PANIGRAHI, S.; MOHANTY, C.C.; RATH, S. Characterization of endophytic bacteria *enterobacter cloacae* mg00145 isolated from *ocimum sanctum* with indole acetic acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities against selected crops. **South african journal of botany**, v. 134, p. 17-26, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.09.017>

PASSARI, A. K.; VINEETH, L. V SINGH, G.; SAMANTA, L.; RAM, H.; SIDDAIAH, C. N.; HASHEM, A.; AL-ARJANI, AL B. F.; ALQARAWI, A. A ABD\_ALLAH, E. F.; SINGH, B. P. In vivo studies of inoculated plants and in vitro studies utilizing methanolic extracts of endophytic *streptomyces* sp. Strain dbt34 obtained from *mirabilis jalapa* L. exhibit ROS-scavenging and other bioactive properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 19, p. 1–26, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21197364>

PINSKI, A.; BETEKHTIN, A.; HUPERT-KOCUREK, K.; MUR, L.A.J.; HASTEROK, R. Defining the Genetic Basis of Plant-Endophytic Bacteria Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1–32, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20081947>

RILLING, J.J.; ACUÑA, P.; NANNIPIERI, F.; CASSAN, F.; MARUYAMA, M.A.; JORQUERA, J.I. Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 130, p. 205-219, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.012>

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

SELEIMAN, M.F.; AL-SUHAIBANI, N.; ALI, N.; AKMAL, M.; ALOTAIBI, M.; REFAY, Y.; DINDAROGLU, T.; ABDUL-WAJID, H.H.; BATTAGLIA, M.L. Drought stress impacts on plants and different approaches to alleviate its adverse effects. **Plants**, v.10, p. 259, 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10020259>

SCHMIDT, T.M.; DELONG, E. F.; PACE, N.R. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. **Journal of bacteriology**, v. 173, p. 4371–4378, 1991. <https://doi.org/10.1128/jb.173.14.4371-4378.1991>

SILVA, M. L. R. B.; MERGULHÃO, A. C. E. S.; FIGUERÔA, C. S.; CORDEIRO, D. S.; LYRA, M. C. C. P. Diversidade da microbiota endofítica na cultura da palma (*Opuntia spp. e Nopalea spp.*) no Semiárido de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 19, n. 1, p. 3–10, 2014. <https://doi.org/10.12661/pap.2014.002>

SILVA, R.R, SAMPAIO, E. V.S.B. Palmas forrageiras *Opuntia ficus-indica* e *Nopalea cochenillifera*: Sistemas de produção e usos. **GEAMA**, v.1, p. 151-161, 2015

SINGH, R. K.; SINGH, PR.; GUO, D. J.; SHARMA, A.; LI, D. P.; LI, X.; VERMA, K. K.; MALVIYA, M. K.; SONG, X. P.; LAKSHMANAN, P.; YANG, L. T.; LI, Y. R. Root-derived endophytic diazotrophic bacteria *pantoea cypripedii* af1 and *kosakonia arachidis* ef1 promote nitrogen assimilation and growth in sugarcane. **Frontiers in microbiology**, v. 12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.774707>

WILHITE, D.A.; SIVAKUMAR, M.V.K.; PULWARTY, R. Managing drought risk in a changing climate: The role of national drought policy. **Weather and climate extremes**, v. 3, p. 4-13, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.wace.2014.01.002>

YADAV, A. N.; VERMA, P.; KUMAR, M.; PAL, K. K.; DEY, R.; GUPTA, A.; PADARIA, J. C.; GUJAR, G. T.; KUMAR, S.; SUMAN, A.; PRASANNA, R.; SAXENA, A. K. Diversity and phylogenetic profiling of niche-specific *Bacilli* from extreme environments of India. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 611–629, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-0897-9>

ZHANG, Q.; ACUÑA, J. J.; INOSTROZA, N. G. MORA, M. L.; RADIC, S.; SADOWSKY, M. J.; JORQUERA, M. A. Endophytic Bacterial Communities Associated with Roots and Leaves of Plants Growing in Chilean Extreme Environments. **Scientific Reports**, v. 9, n. March, p. 1–12, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41160-x>

ZHANG, X.; TONG, J.; DONG, M.; AKHTAR, K.; HE, B.. Isolation , identification and characterization of nitrogen fixing endophytic bacteria and their effects on cassava production . **PEERJ**, v. 25, 2022. <https://doi.org/10.7717/peerj.12677>

### 3 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS ASSOCIADAS AOS DIFERENTES GENÓTIPOS DA PALMA FORRAGEIRA

#### Resumo

O estresse hídrico prejudica o desenvolvimento radicular das plantas devido ao aumento da síntese de etileno. Plantas de zonas áridas e semiáridas abrigam microrganismos capazes de mitigar os efeitos decorrentes do déficit hídrico. Portanto, este estudo visa selecionar e identificar bactérias endofíticas isoladas da palma forrageira que possuam o gene *acdS*, que desempenha um papel fundamental no contexto investigado. Foram avaliados seis cultivares de palma, IPA-20 (*Opuntia fucus-indica*), orelha de elefante africana (*O. undulata Griffiths*), orelha de elefante mexicana (*O. stricta* Haw), miúda de nopalea, IPA Sertânia, F 21 (todas *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). Foram isoladas 241 estirpes e analisadas usando o BOX-PCR para avaliar a diversidade. Isso resultou em 186 grupos que eram 100% semelhantes, que foram submetidos a análise dos índices de diversidade de Shannon e Simpson, apresentando uma comunidade microbiana equitativa e diversa. Procedeu-se então à avaliação da presença do gene *acdS* que codifica a ACC deaminase. As estirpes positivas para este gene foram amplificadas para o 16S rRNA e enviadas para sequenciamento. Das estirpes isoladas, 11 % (24) foram positivas para o gene *acdS*, sendo 20 estirpes isoladas de *Opuntia*. 15 estirpes foram classificadas ao nível de gênero tendo 95,04 % a 99,76 % de similaridade com estirpes descritas no BLAST, sendo classificados em 3 filos, 4 classes, 7 ordens, 9 famílias e 10 gêneros: *Ralstonia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Desertihabitans*, *Stenotrophomonas*, *Priestia*, *Citrobacter*, *Micrococcus* e *Acinetobacter*. Cinco estirpes não puderam ser classificadas ao nível de gênero devido à similaridade insuficiente (76,35 % - 89,71 %), e quatro estirpes não tinham informações genéticas suficientes para a classificação. A variedade de gêneros encontrada nas estirpes sequenciadas revela que a palma forrageira abriga estirpes promissoras com grande potencial para aliviar o estresse em outras plantas.

Palavras-chave: *acdS*. Genótipo. *Opuntia*. *Nopalea*. Estresse hídrico.

## DIVERSITY OF ENDOPHYTIC BACTERIA ASSOCIATED WITH DIFFERENT GENOTYPES OF FORAGE PALM

### Abstract

Water stress impairs the root development of plants due to an increase in ethylene synthesis. Plants from arid and semiarid zones harbor microorganisms capable of mitigating the effects resulting from water deficit. Therefore, this study aims to select and identify endophytic bacteria isolated from forage cacti that possess the *acdS* gene, which plays a pivotal role in the investigated context. Six cultivars of cacti were evaluated: IPA-20 (*Opuntia fucus-indica*), African elephant ear (*O. undulata* Griffiths), Mexican elephant ear (*O. stricta* Haw), miúda de nopalea, IPA Sertânia, F 21 (all *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). 241 strains were isolated and analyzed using BOX-PCR to assess diversity. This resulted in 186 groups that were 100% similar, which underwent analysis of Shannon and Simpson diversity indices, demonstrating an equitable and diverse microbial community. The evaluation of the presence of the *acdS* gene, encoding ACC deaminase, was then conducted. Strains positive for this gene were amplified for 16S rRNA and sent for sequencing. Out of the isolated strains, 11% (24) tested positive for the *acdS* gene, with 20 strains isolated from *Opuntia*. 15 strains were classified at the genus level, with 95.04% to 99.76% similarity to strains described in BLAST, categorized into 3 phyla, 4 classes, 7 orders, 9 families, and 10 genera: *Ralstonia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Desertihabitans*, *Stenotrophomonas*, *Priestia*, *Citrobacter*, *Micrococcus*, and *Acinetobacter*. Five strains couldn't be classified at the genus level due to insufficient similarity (76.35% - 89.71%), and four strains lacked sufficient genetic information for classification. The range of genera found in the sequenced strains reveals that the forage cacti harbor promising strains with significant potential to alleviate stress in other plants.

Keywords: *acdS*. Genotype. *Opuntia*. *Nopalea*. Water stress.

### 3.1 Introdução

O estresse causado pela seca representa uma ameaça significativa à produção agrícola sustentável em escala global (HUSSAIN et al., 2018). Uma das consequências do déficit hídrico é o aumento na síntese de etileno a partir do seu precursor imediato, o 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), que é secretado pelas plantas como exsudatos radiculares (ABIRI et al., 2017). Níveis de etileno muito altos prejudicam o desenvolvimento radicular e afetam e a eficiência ao interagir com outras vias de sinalização (FAHAD et al., 2021).

O uso de bactérias endofíticas surge como uma opção viável para mitigação desse problema, pois elas são conhecidas por produzir uma enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase (ACCD) que cliva 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) (MAHESHWARI; BHUTANI; SUNEJA, 2020). A atividade do ACC é controlada pelo gene *acdS*, que é amplamente encontrado em diferentes espécies bacterianas, especialmente em condições adversas de crescimento (SAGHAFI; LAJAYER; GHORBANPOUR, 2020).

Presume-se que as bactérias de plantas de ambientes áridos são muito eficientes como promotoras de crescimento em plantas, no entanto, as pesquisas nesse campo ainda são incipientes (EKE et al., 2019). Mesmo assim, já existem estudos nesse sentido que comprovam o efeito positivo das bactérias isoladas desses locais como, por exemplo, o isolamento de bactérias da rizosfera de plantas de cactáceas, principalmente do gênero *Bacillus*, que demonstraram grande redução desse estresse (KAVAMURA et al., 2013), o que resultou em um produto comercial amplamente utilizado em culturas anuais. Bem como estudos com solo rizosférico de *mimosa bimucronata* em uma lagoa temporária do semiárido, que demonstrou efeitos inéditos de *Staphylococcus edaphicus* e *Streptomyces alboflavus* em promover o crescimento de plantas sob estresse hídrico (ARAÚJO et al., 2020).

Outra planta de regiões semiáridas que demonstra grande potencial é a palma forrageira, que se distribuía em dois gêneros, *Opuntia* e *Nopalea*, devido suas origens e diferenças fenotípicas, mas recentemente houve uma alteração no gênero *Nopalea* que passou a ser *Opuntia cochenillifera* Karst (HASSLER, 2022), entretanto, existem grandes diferenças entre os gêneros, principalmente na rusticidade, com a gênero *Opuntia* sendo mais adaptado ao estresse hídrico do que o gênero *Nopalea* (SILVA; SAMPAIO, 2015). Alguns estudos já foram realizados isolando bactérias desses gêneros de palma, contudo o objetivo dos trabalhos era encontrar bactérias diazotróficas, usando meios de culturas que direcionaram o isolamento (SILVA et al., 2014). Entretanto, nenhum estudo observou a capacidade das bactérias isoladas em promover alívio ao estresse hídrico.

Portanto levantamos a hipótese que a diversidade dos microrganismos endofíticos na palma forrageira é influenciada pelos seus genótipos. Objetivando assim identificar de bactérias endofíticas, isoladas a partir da palma forrageira.

## 3.2 Material e métodos

### 3.2.1 Local de coleta

A palma foi coletada no Banco Ativo de Germoplasma, na Estação Experimental de Arcoverde do IPA. O clima é classificado em BSh segundo Köppen e Geiger (1923), com pouca pluviosidade ao longo do ano e temperatura média anual de 23,5 °C (CLIMA-DATE, 2022).

Foram coletadas três raquetes de cada um de seis genótipos de palma forrageira dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea* (Tabela 1). Vale salientar que recentemente houve uma mudança taxonômica para o gênero *Nopalea*, que passou a ser *Opuntia cochenillifera* Karst (HALSSLER, 2022). Contudo, nesse trabalho os genótipos continuarão a ser agrupados em *Opuntia* e *Nopalea*, considerando as diferenças fenotípicas entre os mesmos.

**Tabela 1** - Genótipos da palma forrageira e suas características

Genótipo	Nome Científico	Características	Autor	Foto Genótipo
<b>Orelha de Elefante Africana</b>	<i>Opuntia undulata</i> <i>Griffiths</i>	Alta resistência a seca, alta produtividade, muito espinhosa, pouco palatável e susceptível a Cochonilha do Carmim	SENAR, 2018	
<b>Orelha de Elefante Mexicana</b>	<i>Opuntia stricta</i> <i>Haw</i>	Resistência a seca, alta produtividade, pouco palatável e resistente a Cochonilha do Carmim	SENAR, 2018	
<b>IPA 20</b>	<i>Opuntia fucus-indica</i>	Resistente a seca, alta produtividade, poucos espinhos.	Silva; Sampaio, 2015	
<b>Miúda de Nopalea</b>	<i>Nopalea cochenillifera</i> Salm Dyck	Pouca resistência a seca, boa produtividade, alta palatabilidade e resistente a Cochonilha do Carmim	Silva; Sampaio, 2015	
<b>F21</b>	<i>Nopalea cochenillifera</i>	Boa produtividade e pouca resistência a seca	SENAR, 2018	
<b>IPA Sertânia</b>	<i>Nopalea cochenillifera</i>	Boa produtividade, pouca resistência a seca	SENAR, 2018	

### 3.2.2 Caracterização química e física do solo

Foram coletadas amostras de solos da camada 0-20 cm, para caracterização física e química do solo (Tabela 2).

**Tabela 2** - Análise química e física do solo.

pH água	Ca	Mg	Al	Na	K	P	M.O.	H+Al	Classificação
1:2,25	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>				mg dm <sup>-3</sup>		g kg <sup>-1</sup>	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	<b>Textural</b>
4,17	1,1	0,9	0,98	0,14	0,25	73,3	9,03	4,77	Areia Franca

M.O.-Matéria orgânica; H- Hidrogênio.

### 3.2.3 Isolamento das bactérias

Para o isolamento das bactérias, as raquetes foram lavadas com detergente em água corrente, depois imersas em etanol 70 % durante 30s, seguido por imersão em hipoclorito de sódio 2,5 % durante 5 minutos, e por último, tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Após a higienização, foi pesado 10g de palma e triturado com 90 mL de solução salina 0,85 %, seguido por diluições em séries de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Cada diluição foi inoculada no meio TSA em triplicata utilizando a alíquota de 100 µl, em seguida foram incubados a 28 °C. O crescimento foi acompanhado após 24h da incubação.

### 3.2.4 Extração de DNA

Para a extração do DNA foi usado o método de bancada Bead Beating (CULLEN; HIRSCH, 1998), os isolados foram cultivados em 5mL do meio TSA líquido por cinco dias, sob agitação constante a 150 Rotação Por Minuto (RPM). Após esse tempo foi realizado a extração do DNA para os isolados que cresceram bem. O DNA extraído foi corado com Sybr Green® e precipitados com Ladder Buffer (LB), sendo submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,5 %, a 100 volts por 30min e visualizados em transiluminador sob luz UV.

### 3.2.5 BOX-PCR

A diversidade genética das amostras foi avaliada por meio da técnica de BOX-PCR (Tabela 3) e os produtos foram corados com Sybr Green® e precipitados com LB, sendo então submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,7% a 65 volts durante 6 horas. Um marcador de peso molecular de 100 pb (Sinapse) foi utilizado como referência. O gel de agarose foi visualizado utilizando um transiluminador sob luz ultravioleta e registrado por meio de um

fotodocumentador. Foram utilizados dendrogramas gerados por meio do programa Geljv2 para analisar a similaridade entre as amostras. Essa análise foi realizada utilizando o coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA, conforme Heras et al. (2015) e Delamuta et al. (2017).

**Tabela 3** - Primers, sequências e condições das reações para as técnicas de PCR, BOX-PCR, gene *acdS* e 16S rRNA.

Primers	Sequência	Condições da reação
<b>BOX-A1R<sup>1</sup></b>	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	95°C por 6 min, 35 ciclos, a 94 °C por 2 min, 52° por 2 min, 8 min a 72°C, e a 72°C por 16 min.
<b>DegACCF<sup>2</sup></b>	GGBGGVAAYAARMYVMGSAAGCTYGA	95°C por 3 min, 35 ciclos a 95 °C por 30s, 46°C por 1 min, 72°C por 1 min, e 72°C por 5 min
<b>DegACCr<sup>2</sup></b> (ACC Deaminase)	TTDCCHKYRTANACBGGRTC	
<b>27F<sup>3</sup></b>	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	94°C por 4 min, 30 ciclos A 94°C por 1 min, 60°C por 45s, 72°C por 5 min, e a 72°C por 7 min.
<b>1492R<sup>3</sup></b> (16S rRNA)	TACGGTTAACCTTGTTACGACTT	

<sup>1</sup>Versalovic et al. (1994);<sup>2</sup>Nikolic; Schwab; Sessitsch (2011); <sup>3</sup>Weisburg et al. (1991).

### 3.2.6 Índice de diversidade

A partir dos isolados que foram amplificados pelo BOX-PCR, determinou-se o índice de diversidade de Shannon (H) pela fórmula:

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

S= O somatório de espécies (agrupamento BOX)

N= O número de total de indivíduos

n<sub>i</sub>= O número de indivíduos de cada espécie

ln= logaritmo de base neperiana

Outro índice determinado foi o índice de Simpson (D), sendo calculado com a fórmula a seguir.

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

N= O número de total de indivíduos

n= O número de indivíduos de cada espécie

### **3.2.7 Amplificação do gene ACC Deaminase**

Todas as estirpes foram avaliadas quanto à presença do gene que codifica a ACC deaminase (Tabela 3). Os produtos resultantes dessa amplificação foram corados com Sybr Green® e precipitados com LB, sendo então submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1 %, à 100 volts por 30 minutos. Um marcador de peso molecular de 100 pb fornecido pelo fabricante Sinapse foi utilizado como referência.

Após a eletroforese, o gel de agarose foi visualizado utilizando um transiluminador sob luz ultravioleta, sendo então fotografado por meio de um fotodocumentador. A presença do gene que codifica a ACC deaminase foi identificada como positiva pela presença de fragmentos de bandas com aproximadamente 450 pb, conforme os padrões descritos por Poly, Monrozier e Bally (2001).

Foi estabelecido que as bactérias selecionadas para sequenciamento seriam aquelas que apresentassem o gene *acdS*, devido à sua associação conhecida com o alívio de estresse.

### **3.2.8 Sequenciamento dos fragmentos dos 16S rRNA**

Foi realizada a amplificação do 16S para 24 bactérias que amplificaram para o gene da ACC deaminase (Tabela 3). Os produtos obtidos da PCR foram corados com Sybr Green® e precipitados com LB, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 %, 100 volts, por 30 min, utilizando marcador de 100 pb do fabricante Sinapse. Posteriormente foi utilizado transiluminador sob luz UV, fotografado em fotodocumentador e identificando como positivo fragmentos de aproximadamente 1400 pb (NEILAN et al., 1997).

### **3.2.9 Análise comparativa das sequências dos 16S rRNA**

As sequências recebidas passaram por uma série de etapas de análise de qualidade e identificação molecular. Inicialmente, utilizou-se o software BioEdit 7.2 para realizar uma análise de qualidade das sequências recebidas, avaliando sua integridade e confiabilidade. Em seguida, as sequências foram comparadas ao banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para determinar sua identidade molecular.

Posteriormente, as sequências dos isolados foram submetidas a uma análise de similaridade individual por meio do algoritmo MEGABLAST, que é capaz de identificar sequências altamente similares. Em seguida, as sequências foram comparativamente analisadas quanto à porcentagem de identidade molecular. Essa análise foi realizada utilizando o método de múltipla progressão de Clustal W, utilizando o programa MEGA11.

Além disso, foram construídas árvores gênicas para cada isolado com base nessas sequências. Para isso, foi utilizado o método de junção de vizinhos Juke-Cantor para determinar o valor de similaridade e a matriz de distância entre as sequências. A significância das ramificações dentro das árvores foi avaliada por meio da análise bootstrap, utilizando 1.000 repetições geradas por computador.

### ***3.2.10 Análises estatística***

Para comparar as médias entre os isolados de ambos os gêneros, foram conduzidos testes t bilaterais. Esses testes avaliaram as médias de UFC, os isolados amplificados para o BOX e os índices de diversidade.

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Estimativa de UFC

Não houve diferença significativa para população bacteriana entre os diferentes gêneros da palma forrageira (tabela 4), pelo teste t a 10%.

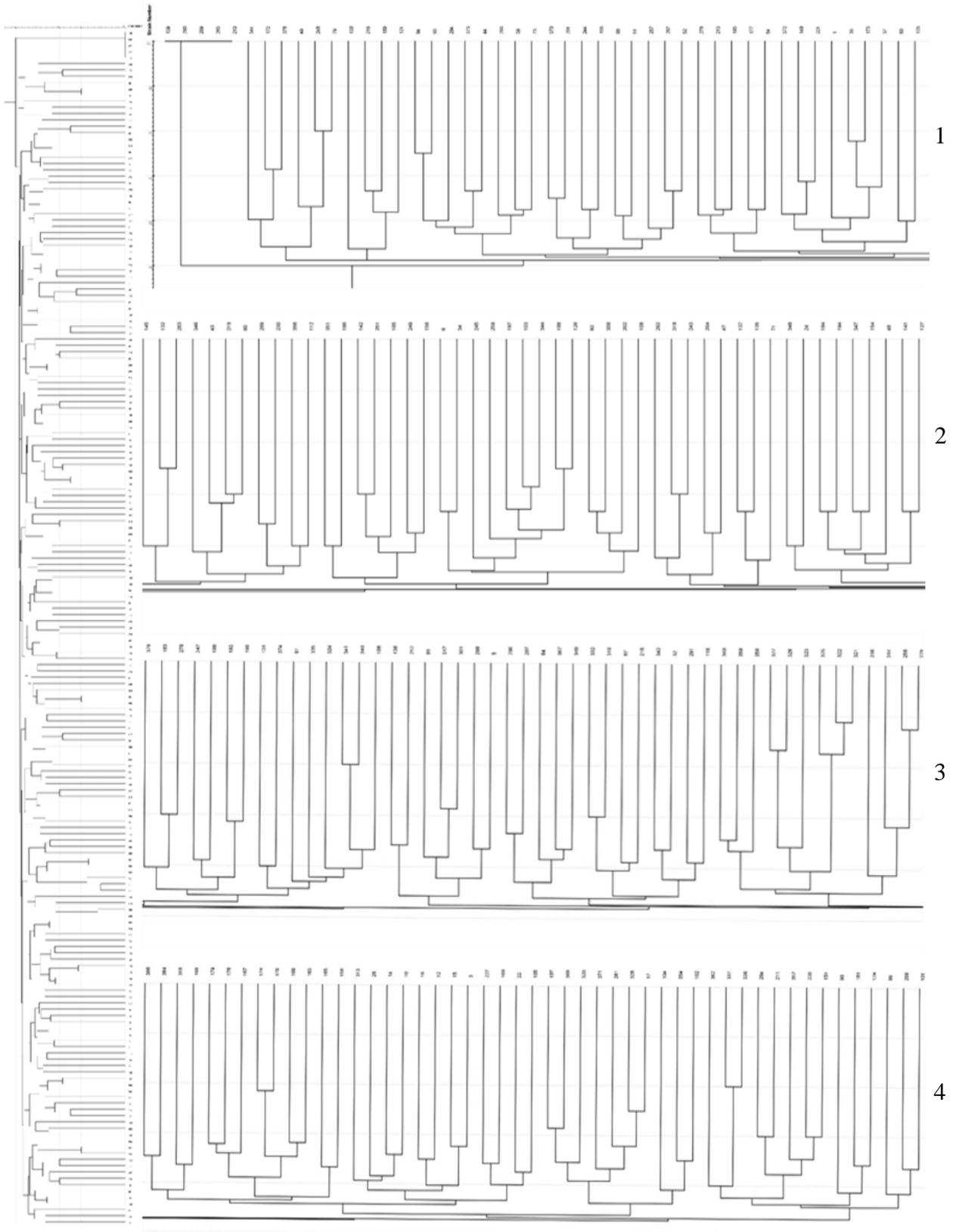
**Tabela 4** - Médias e desvio padrão das unidades formadoras de colônias (UFC) e isolados dos cladódios da palma forrageira dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*.

	<i>Opuntia</i>	<i>Nopalea</i>	Pr>t
<b>População</b>	3,29*10 <sup>5</sup> – 9,8*10 <sup>3</sup>	2,68*10 <sup>5</sup> – 2*10 <sup>5</sup>	0,35
<b>Isolados</b>	144 – 17,7	97 – 16,04	0,21

#### 3.3.2 Análise BOX-PCR

Dos 241 isolados analisados, 190 mostraram amplificação dos elementos BOX, indicando uma eficiente produção de bandas, com tamanhos variando de 200 a 1500 pb. Foram formados 186 grupos a 100 % de similaridade, sendo 185 estirpes monofiléticas (Figura 1), sugerindo uma alta diversidade genética entre os isolados estudados.

**Figura 1** - Dendrograma de similaridade BOX-PCR dos isolados dos cladódios da palma forrageira do gênero *Opuntia* e *Nopalea*. A esquerda dendrograma completo e a direita as partes divididas do dendrograma numeradas na ordem.



### 3.3.3 Índices de diversidade

O teste t aplicado aos resultados dos índices de Shannon (H') e Simpson (D) não apresentaram diferenças significativas a 10% de significância (Tabela 5).

**Tabela 5** - Médias e desvio padrão dos isolados agrupados pela técnica BOX-PCR e índices de diversidade, dos diferentes gêneros da palma forrageira.

	<i>Opuntia</i>	<i>Nopalea</i>	Pr>t
<b>Isolados BOX</b>	110 – 18,2	76 – 15,6	0,27
<b>Shannon (H')</b>	0,3 – 0,05	0,25 – 0,07	0,24
<b>Simpson (D)</b>	0,040 – 0,041	0,024- 0,025	0,31

### 3.3.4 Amplificação do gene ACC Deaminase

24 estirpes amplificaram para o gene *acdS*, que codifica para a ACC deaminase.

### 3.3.5 Sequenciamento 16S RRNA

O sequenciamento parcial do gene 16S rRNA revelou que 15 das 24 estirpes apresentaram similaridade com estirpes previamente descritas no BLAST, e foram classificadas no nível de gênero, com uma similaridade variando entre 95,04 % e 99,76 % (Tabela 6). No entanto, cinco bactérias não apresentaram similaridade suficiente para uma classificação taxonômica ao nível de gênero, apresentando uma variação de similaridade entre 76,35 % e 89,71 %, e quatro não demonstraram similaridade com nenhuma sequência genética disponível no banco de dados do GenBank, pois as sequências não apresentavam pares de bases suficientes para o reconhecimento.

No total, foram identificados 3 filos, 4 classes, 7 ordens, 9 famílias e 9 gêneros, conforme os dados obtidos do NCBI. O filo com o maior número de representantes foi o Proteobacteria, seguido pelo Bacillota. As classes dominantes foram  $\gamma$ -proteobacteria e Bacilli.

Os gêneros mais abundantes foram *Ralstonia* (20 %), seguido por *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* (13,33 %). Além disso, *Desertihabitans*, *Stenotrophomonas*, *Priestia*, *Citrobacter*, *Micrococcus* e *Acinetobacter* representaram cada um 6,66 % dos gêneros identificados.

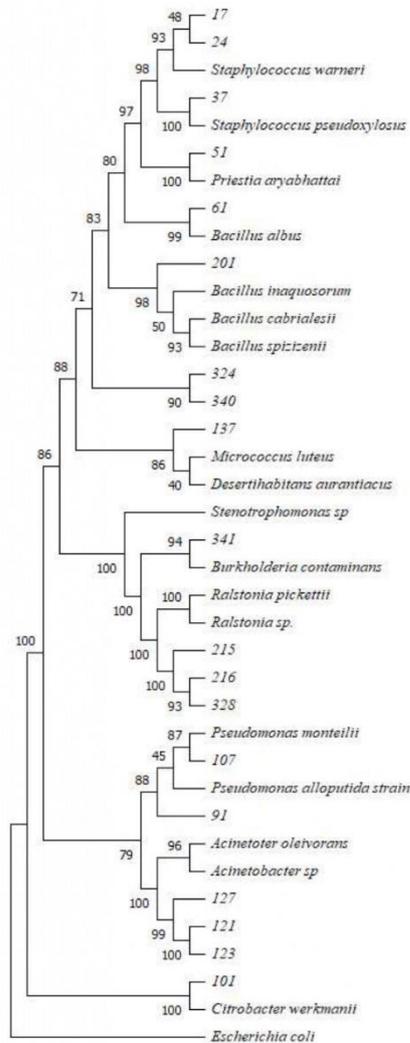
**Tabela 6** - Identificação genética dos isolados com base na similaridade das sequências de nucleotídeos.

Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie correlacionada	Estirpe	Erro	Similaridade	N° Acesso		
<b>Proteobacteria</b>	$\gamma$ -proteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	49	0	95,15%	NZ_LS483377.1		
		Enterobacterales	Enterobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter werkmanii</i>	101	0	97,98%	NZ_CP044101.1		
		Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas monteilii</i>	91	0	97,57%	NZ_CP022562.1		
					<i>Pseudomonas urmiensis</i>	107	0	95,21%	NZ_JAJSPR010000111.1		
		$\beta$ -proteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	<i>Ralstonia</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	127	0	96,07%	NC_014259.1
	<i>Ralstonia pickettii</i>					215	0	95,52%	NZ_CABKQE010000005.1		
	<i>Ralstonia pickettii</i>					216	0	95,02%	NZ_CABKQE010000004.1		
	<i>Ralstonia pickettii</i>					328	0	95,09%	NZ_CABKQE010000001.1		
	<i>Priestia</i>					<i>Priestia aryabhatai</i>	51	0	97,88%	NZ_CP024037.1	
	<b>Bacillota</b>	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus albuns</i>	61	0	95,33%	NZ_SDFS01000030.1	
<i>Bacillus subtilis</i>						201	0	98,80%	NC_000964.3		
Staphylococcaceae						<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	24	0	95,04%	NZ_QPKK01000496.1
							<i>Staphylococcus pseudoxylosus</i>	37	0	99,76%	NZ_CP075500.1
							<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	137	0	96,71%
<b>Actinomycetota</b>	Actinomycetes	Propionibacterales	Propionibacteriaceae	<i>Desertihabitans</i>	<i>Desertihabitans aurantiacus</i>	17	0	95,26%	NZ_QPKK01000496.1		
		Similaridade Insuficiente para classificação					121				
						123					
						324					
						340					
						341					
						71					
						104					
						105					
						112					
Quantidade de pares de bases insuficientes para a classificação											

### 3.3.6 Relações filogenéticas dos isolados bacterianos

Com base na árvore filogenética construída a partir do gene 16S rRNA (Figura 2), é possível observar os agrupamentos dos isolados que não puderam ser classificados adequadamente. As estirpes 121 e 123 foram agrupadas com o gênero *Acinetobacter*. As estirpes 324 e 340 foram agrupadas com o gênero *Bacillus*. Por fim, a estirpe 341 foi agrupada com o gênero *Burkholderia*.

**Figura 2** - Árvore filogenética determinada pelo método Neighbour-Joining gerada a partir do parâmetro Jukes Cantor e teste de bootstrap com 1000 repetições das sequências do gene 16S rRNA dos isolados da palma forrageira.



### 3.4 Discussão

A ausência de diferença significativa na população bacteriana entre os gêneros *Nopalea* e *Opuntia* (Tabela 4) corrobora os resultados anteriores para cana-de-açúcar e eucalipto (DASGUPTA et al., 2020; SINGH et al., 2022). Além disso, não foram encontradas diferenças significativas entre os isolados dos dois gêneros (Tabela 5), apesar de uma tendência de maior diversidade ser observada para *Opuntia*. No entanto, é necessário levar em consideração que a análise foi efetuada com apenas três genótipos para cada gênero, o que limita o seu poder estatístico e pode explicar parcialmente a falta de significância.

Os resultados deste estudo revelaram uma alta frequência de isolados positivos para a amplificação do gene para ACC deaminase na palma. Esses resultados são consistentes com um estudo anterior realizado por Govindasamy et al. (2022) em endofíticos de *Opuntia*, no qual 28 % das estirpes mostraram atividade de ACC deaminase. Por outro lado, em plantas menos adaptadas a condições de seca, como *Pisum sativum*, apenas 7,7 % dos isolados apresentaram o gene ACC deaminase, conforme relatado por Maheshwari et al. (2020). Isso sugere que plantas cultivadas em zonas áridas e semiáridas abrigam uma maior proporção de bactérias endofíticas produtoras de ACC deaminase, como destacado por Glick (2012).

Entre as estirpes sequenciadas foi possível verificar a dominância do filo Proteobacteria, o que está em concordância com outros estudos que investigaram bactérias endofíticas em cactos, como mencionado por Fonseca-García et al. (2016). Neste estudo foi identificado estirpes pertencentes aos gêneros *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Citrobacter*, *Desertihabitans*, *Micrococcus*, *Priestia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* e *Ralstonia*, que são comumente encontrados em comunidades endofíticas de plantas em zonas áridas e semiáridas. (ESCOBAR RODRÍGUEZ et al., 2018; MASHIANE et al., 2018; EKE et al., 2019; LIU et al., 2019; LIMA et al., 2020; AJMAL et al., 2022).

As estirpes analisadas neste estudo apresentaram uma maior proximidade com as cepas descritas na Tabela 7, e elas já foram previamente citadas na literatura como promotoras de crescimento de plantas, com algumas já bem estabelecidas nesse papel, como as pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Stenotrophomonas* e *Priestia*.

Importante destacar que outras cepas, como as pertencentes ao gênero *Desertihabitans* do filo Actinomycetota ainda não foram tão estudadas quanto ao seu papel na promoção de crescimento e ainda não haviam sido mencionadas como bactérias endofíticas de plantas. No entanto, microrganismos desse gênero, especificamente, *Desertihabitans aurantiacus*, foram descritos como tolerantes a NaCl e temperaturas de até 40 °C (SUN et al., 2019). As bactérias

pertencentes a este filo são bem estabelecidas como promotoras de crescimento (BOUKHATEM; MARABET; TSAKI, 2022).

É importante destacar que todas as estirpes que apresentaram alta similaridade com as identificadas neste estudo são consideradas endofíticas facultativas, ou seja, há relatos de sua presença tanto dentro das plantas quanto em outros habitats (ANAND et al., 2023).

Das estirpes isoladas e selecionadas, 93,33 % foram identificadas como pertencentes a *Opuntia*. Essa predominância de estirpes associadas a *Opuntia* pode ser atribuída à maior rusticidade e adaptação desse gênero às condições de seca. Esse achado é consistente com um resultado encontrado por Silva et al. (2014), que estudaram bactérias dos dois gêneros de palma forrageira e 91,66 % dos isolados classificados também pertenciam ao gênero *Opuntia*.

Além disso, a maioria das estirpes bacterianas analisadas neste estudo ainda não havia sido citadas como positivas para presença do gene para ACC deaminase, conforme apresentado na Tabela 8. Essa observação pode ser atribuída ao fato de que muitas dessas estirpes não foram isoladas de plantas conhecidas por sua resistência ao estresse hídrico (KAILASAN; VAMANRAO, 2015; HASHEM; TABASSUM; FATHI ABD\_ALLAH, 2019; NAGARAJU et al., 2021; TRINH; NGUYEN; NGUYEN, 2023).

**Tabela 7** - Correlação das estirpes classificadas a nível de gênero e mecanismos associados a promoção de crescimento.

Estirpe	Correlação	Similaridade	Mecanismos associados	Origem do isolado	Autor
127	<i>Acinetobacter oleivorans</i>	96,07%	Sideróforos, AIA e solubilização de fosfato	Azevém perene	Wang et al., 2022
201	<i>Bacillus subtilis</i>	98,80%	Sideróforos, fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato	<i>Oryza sativa</i>	Hashem; Tabassum; Fathi Abd_Allah, 2019; Nagaraju et al., 2021; Trinh; Nguyen; Nguyen, 2023
61	<i>Bacillus albus</i>	95,33%		<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Cicer arietinum</i> L. <i>Arachis hypogaea</i>	
101	<i>Citrobacter werkmanii</i>	97,98%	Estresse osmótico e fixação de nitrogênio	<i>Triticum aestivum</i>	Ajmal et al., 2022; Zhou et al., 2023
17	<i>Desertihabibans aurantiacus</i>	95,26%	Estresse osmótico	Areia do deserto	Sun et al., 2019; Liu et al., 2021
137	<i>Micrococcus luteus</i>	96,71%	Estresse osmótico	<i>Cyperus conglomeratus</i>	Lafi et al., 2017
51	<i>Priestia aryabhatai</i>	97,88%	Solubilização de fosfato, AIA, ACC Deaminase	<i>Triticum aestivum</i> L.	Shahid et al., 2022
91	<i>Pseudomonas monteilii</i>	97,57%	fixação de nitrogênio e AIA	<i>Triticum aestivum</i> L	Dharni et al., 2014; Zhou et al., 2022.
107	<i>Pseudomonas urmiensis</i>	95,21%		<i>Pelargonium graveolens</i>	
24	<i>Staphylococcus warningeri</i>	95,04%	Estresse osmótico	Azevém perene	Wang et al., 2022; Wang et al., 2023
37	<i>Staphylococcus pseudoxylosus</i>	99,76%		<i>Triticum aestivum</i>	
49	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	95,15%	Fixação de nitrogênio e AIA	<i>Arachis hypogaea</i>	Alexander et al., 2019
215		95,52%	Solubilização de fosfato, estresse osmótico	<i>Solanum lycopersicum</i>	Kailasan; Vamanrao, 2015.
216	<i>Ralstonia pickettii</i>	95,02%		<i>Oryza sativa</i>	
				<i>Anacardium occidentale</i>	
				<i>Cocos nucifera</i>	
				<i>Vitis vinifera</i>	
328		95,09%	<i>Artocarpus heterophyllus</i>		
			<i>Mangifera indica</i> L		
			<i>Punica granatum</i>		

### 3.5 Conclusões

A nossa hipótese é que existiria diferença significativa entre a diversidade dos isolados entre os dois genótipos, porém não foi confirmada, apesar de *Opuntia* apresentar um número de isolados superior aos apresentados por *Nopalea*.

A frequência de estirpes positivas para ACC deaminase foi significativamente superior em *Opuntia*, sendo potencialmente um dos mecanismos para a maior resistência a seca apresentada por este gênero.

Os gêneros predominantes na palma foram *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, *Desertihabitans*, *Stenotrophomonas*, *Priestia*, *Citrobacter*, *Micrococcus* e *Acinetobacter*, apresentando semelhança com espécies com ocorrência confirmada como promotoras de crescimento de plantas, indicando a validade do uso deste gene como identificador de bactérias para avaliação do potencial para promoção de crescimento.

Este trabalho foi o primeiro a relatar o gênero *Desertihabitans* como promotora de crescimento e endofítico de plantas.

## Referências Bibliográficas

- ABIRI, R.; SHAHARUDDIN, N.A.; MAZIAH, M.; YUSOF, Z.N.B.; ATABAKI, N.; SAHEBI, M.; VALDIANI, A.; KALHORI, N.; AZIZI, P.; HANAFI, M. M. Role of ethylene and the APETALA 2/ethylene response factor superfamily in rice under various abiotic and biotic stress conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 134, p. 33-44, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.10.015>
- AJMAL, A.W.; YASMIN, H.; HASSAN, M.N.; KHAN, N.; JAN, B.L.; MUMTAZ, S. Heavy Metal-Resistant Plant Growth-Promoting *Citrobacter werkmanii* Strain WWN1 and *Enterobacter cloacae* Strain JWM6 Enhance Wheat (*Triticum aestivum* L.) Growth by Modulating Physiological Attributes and Some Key Antioxidants Under Multi-Metal Stress. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.815704>
- ALEXANDER, A.; SINGH, V.K.; MISHRA, A.; JHA, B. Plant growth promoting rhizobacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 augments endurance against N2 starvation by modulating physiology and biochemical activities of *Arachis hypogea*. **Plos One**, v. 9, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.022240>
- ANAND, U.; PAL, T.; YADAV, N. SINGH, V. K.; TRIPATHI, V.; CHOUDHARY, K. K.; SHUKLA, A. K.; SUNITA, K.; KUMAR, A.; BONTEMPI, E.; MA, Y.; KOLTON, M.; SINGH, A.K. Current Scenario and Future Prospects of Endophytic Microbes: Promising Candidates for Abiotic and Biotic Stress Management for Agricultural and Environmental Sustainability. **Microbial Ecology**, 2023. <https://doi.org/10.1007/s00248-023-02190-1>
- ARAÚJO, V. L. V. P.; JUNIOR, M. A. L.; DE SOUZA JÚNIOR, V. S.; DE ARAÚJO FILHO, J. C.; FRACETTO, F. J. C.; ANDREOTE, F. D.; FRACETTO, G. G. M. (2020). Bacteria from tropical semiarid temporary ponds promote maize growth under hydric stress. **Microbiological Research**, v.240, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126564>
- BOUKHATEM, Z.F.; MERABET, C.; TSAKI, H. Plant Growth Promoting Actinobacteria, the Most Promising Candidates as Bioinoculants? **Frontiers in Agronomy**, v. 4, 2022. <https://doi.org/10.3389/fagro.2022.849911>
- CAVITE, H.J.M.; MACTAL, A.G.; EVANGELISTA, E.V.; CRUZ, J. A. Biochemical characteristics and inoculation effects of multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria on upland rice (*Oryza sativa* L. cv PSB Rc23) seedling growth. **Archives of Microbiology**, v. 203, p. 3533–3540, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02337-z>
- CLIMA-DATE. Clima e condições meteorológicas médias em Arcoverde no ano todo. Weatherspark, 2022 Disponível em: <https://pt.weatherspark.com/y/31187/Clima-caracter%C3%ADstico-em-Arcoverde-Brasil-durante-o-ano>. Acesso em 11/05/2023.
- COSTA, F.E.C.; MELO, I.S. Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **African Journal of Microbiology**, v. 6, p.1345-1353,2012. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1503>
- CULLEN, D.W.; HIRSCH, P.R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology and Biochemistry**, v.30: p. 983-993, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(98\)00001-7](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(98)00001-7)

DASGUPTA, M.G.; BURRAGONI, S.; AMRUTHA, S.; MUTHUPANDI, M.; PARVEEN, A.B.M.; SIVAKUMAR, V.; ULAGANATHAN, K. Diversity of bacterial endophyte in *Eucalyptus* clones and their implications in water stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 241, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micres>

DELAMUTA, J. R. M.; MENNA, P.; RIBEIRO, R. A.; HUNGRIA, M. Phylogenies of symbiotic genes of Bradyrhizobium symbionts of legumes of economic and environmental importance in Brazil support the definition of the new symbiovars pachyrhizi and sojae. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 254–265, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.04.005>

DHARNI, S.; SRIVASTAVA, AK, SAMAD, A.; PATRA, D.D. Impact of plant growth promoting *Pseudomonas monteilii* PsF84 and *Pseudomonas plecoglossicida* PsF610 on metal uptake and production of secondary metabolite (monoterpenes) by rose-scented geranium (*Pelargonium graveolens* cv. bourbon) grown on tannery sludge amended soil. **Chemosphere**. v.117, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere>

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. **AGROBIOLOGIA, E.-**. Embrapa-Agrobiologia 1995.

EKE, P.; KUMAR, A.; SAHU, K. P.; WAKAM, L. N.; SHEORAN, N.; ASHAJYOTHI, M.; PATEL, A.; FEKAM, F. B. Endophytic bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigonas* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Microbiological Research**, v.228, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126302>

FAHAD, S.; SONMEZ, O.; SAUD, S.; WANG, D.; WU, C.; ADNAN, M. E.; TURAN, V. Plant growth regulators for climate-smart agriculture. 2021. <https://doi.org/10.1201/9781003109013>

FONSECA-GARCÍA, C.; COLEMAN-DERR, D.; GARRIDO, E.; VISEL, A.; TRINGE, S. G.; PARTIDA-MARTÍNEZ, L. P. The Cacti Microbiome: Interplay between Habitat-Filtering and Host-Specificity. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00150>

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica (Cairo), v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

GOVINDASAMY, V.; GEORGE, P.; RAMESH, S.V.; SURESHKUMAR, P.; RANE, J.; MINHAS, P.S. Characterization of root-endophytic actinobacteria from cactus (*Opuntia ficus-indica*) for plant growth promoting traits. **Archives of Microbiology**, v.204, p.150, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02671-2>

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; FATHI ABD\_ALLAH, E. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v,6, p.1291-1297, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>

HASSLER, M. Synonymic Checklists of the Vascular Plants of the World. In O. BÁNKI, Y.; ROSKOV, M.; DÖRING, G.; OWER, L.; VANDEPITTE, D.; HOBERN, D.; REMSEN, P.; SCHALK, R. E.; DEWALT, M.; KEPING, J.; MILLER, T.; ORRELL, R.; AALBU, J.; ABBOTT, R.; ADLARD, E.; M.; ADRIAENSSENS, C.; AEDO, E.; AESCHT, N.; AKKARI, **Catalogue of Life Checklist**, 2022. <https://doi.org/10.48580/dfqt-3dd>

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

HUSSAIN, M.; FAROOQ, S.; HASAN, W.; UL-ALLAH, S.; TANVEER, M.; FAROOQ, M.; NAWAZ, A. Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives. **Agricultural Water Management**, v. 201, p. 152-166, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2018.01.028>

KAILASAN, N. S.; VAMANRAO, V. B. Isolation and characterization of *Ralstonia pickettii* - a novel phosphate solubilizing bacterium from pomegranate rhizosphere from Western India. **International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research**, v.4, p.1-9, 2015.

KAVAMURA, V.N.; SANTOS, S.N.; SILVA, J.L.; PARMA, M.M.; AVILA, L.A.; VISCONTI, A.; ZUCCHI, T.D.; TAKETANI, R.G.; ANDREOTE, F.D.; MELO, I.S. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. **Microbiological Research**, v.168, p. 183-191, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.micres>

KERSTERS, K.; DE VOS, P.; GILLIS, M., SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the Proteobacteria. **Springer**, v. 5, p.3-37, 2006. [https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1\\_1](https://doi.org/10.1007/0-387-30745-1_1)

KÖPPEN, W. P. Die Klimate der Erde: Grundriss der Klimakunde. **Walter de Gruyter & So**, 1923.

LAFI, F.F.; RAMIREZ-PRADO, J.S.; ALAM, I.; BAJIC, V.B.; HIRT, H.; SAAD, M.M. Draft Genome Sequence of Plant Growth-Promoting *Micrococcus luteus* Strain K39 Isolated from *Cyperus conglomeratus* in Saudi Arabia. **Genome Announcements**, v. 4, 2017. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01520-16>

LIRA, M. A. Palma Forrageira: Cultivo e Usos. **Cadernos do Semiárido: Riquezas & oportunidades / Conselho Regional de Engenharia e Agronomia de Pernambuco**, v. 2, n. 2526–2556, p. 1–62, 2016.

LIU, S.; WANG, T.; LU, Q.; LI, F.; WU, G.; JIANG, Z.; HABDEN, X.; LIU, L.; ZHANG, X.; LUKIANOV, D.A.; OSTERMAN, I.A.; SERGIEV, P.V.; DONTSOVA, O.A.; SUN, C. Bioprospecting of Soil-Derived Actinobacteria Along the Alar-Hotan Desert Highway in the Taklamakan Desert. **Frontiers in Microbiology**, v.12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.604999>

MAHDI, O.; EKLUND, B.; FISHER, N. Laboratory culture and maintenance of *Stenotrophomonas maltophilia*. **Current Protocols in Microbiology**, v. 32, 2017. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc06f01s32>

MAHESHWARI, R.; BHUTANI, N.; SUNEJA, P. Isolation and Characterization of ACC Deaminase Producing Endophytic *Bacillus mojavensis* PRN2 from *Pisum sativum*. **Iranian Journal Biotechnology.**, v. 18, p. 539–547, 2020. <https://doi.org/10.30498/IJB.2020.137279.2308>

NAGARAJU, Y.; MAHADEVASWAMY.; NAIK, N. M.; GOWDAR, S. B.; NARAYANARAO, K.; SATYANARAYANARAO, K. ACC Deaminase-Positive Halophilic Bacterial Isolates with Multiple Plant Growth-Promoting Traits Improve the Growth and Yield of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Under Salinity Stress. **Frontiers in Agronomy**, v. 3, 2021. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.681007>

NEILAN, B. A.; JACOBS, D.; DEL DOT, T.; BLACKALL, L. L.; HAWKINS, P. R.; COX, P. T.; GOODMAN, A. E. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *International Journal of Systematic microbiology*, v. 97, 1997. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-3-693>

NIKOLIC, N.; SCHWAB, H.; SESSITSCH, A. Metagenomic analysis of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene (acdS) operon of an uncultured bacterial endophyte colonizing *Solanum tuberosum* L. **Archives of Microbiology**, v. 193, p. 665–676, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0703-z>

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 95–103, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01172-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01172-4)

ROCHA, J.E.S. Palma forrageira no Nordeste do Brasil: o estado da arte. Dados eletrônicos. — Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2012. 40 p.: il. — (**Documentos / Embrapa Caprinos e Ovinos**, ISSN 1676-7659; 106).

SAGHAFI, D.; LAJAYER, B. A.; GHORBANPOUR, M. Engineering bacterial acc deaminase for improving plant productivity under stressful conditions. **Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture**, p. 259-277, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00022-5>

SANTOS, D. C.; FARIAS, I.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARRUDA, G. P.; COELHO, R. S. B.; DIAS, F. M.; MELO, J. N. Manejo e utilização da palma forrageira (*OpuntiaeNopalea*) em Pernambuco. Recife: IPA, p48, 2006 (IPA. Documentos, 30).

SENAR - Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. Palma forrageira: cultivo de palma forrageira no semiárido brasileiro / Serviço Nacional de Aprendizagem Rural. -- 3. ed. -- Brasília: SENAR, 2018. 52 p.: il. (Coleção SENAR).

SHAHID, M.; ZEYAD, M.T.; SYED, A.; SINGH, U.B.; MOHAMED, A.; BAHKALI, A.H.; ELGORBAN, A, M.; PICHTEL, J. Stress-Tolerant Endophytic Isolate *Priestia aryabhatai* BPR-9 Modulates Physio-Biochemical Mechanisms in Wheat (*Triticum aestivum* L.) for Enhanced Salt Tolerance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19,2022. <https://doi.org/10.3390/ijerph191710883>

SILVA, M. L. R. B.; MERGULHÃO, A. C. E. S.; FIGUERÔA, C. S.; CORDEIRO, D. S.; LYRA, M. C. C. P. Diversidade da microbiota endofítica na cultura da palma (*Opuntia spp. e Nopalea spp.*) no Semiárido de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 19, n. 1, p. 3–10, 2014. <https://doi.org/10.12661/pap.2014.002>

SINGH R.K.; SINGH. P.; LI, H.B.; SONG, Q.Q.; GUO, D.J.; SOLANKI, M.K.; VERMA, K.K.; MALVIYA, M.K.; SONG, X.P.; LAKSHMANAN, P.; YANG, L.T.; LI, Y.R. Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: a comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum spp.* **BMC Plant Biology**, v. 20, p. 220, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02400-9>

SIMONET, P.; GROSJEAN, M. C.; MISRA, A. K.; NAZARET, S.; COURNOYER, B.; NORMAND, P. *Frankia* genus specific characterization by polymerase chain reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 3278-3286, 1991. <https://doi.org/10.1128/aem.57.11.3278-3286.1991>

SUN, Y.; WANG, H.; ZHANG, T.; LIU, W.H.; LIU, H.Y.; YU, L.Y.; ZHANG, Y.Q. *Desertihabitans aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Propionibacteriaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.8, p.2486-2491,2019. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003519>

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. 3ª ed. Porto Alegre: **Artmed**, p. 720, 2004.

TRINH, L. L.; NGUYEN, A. M. L.; NGUYEN, H.H. Root-associated bacteria *Bacillus albus* and *Bacillus proteolyticus* promote the growth of peanut seedlings and protect them from the aflatoxigenic *Aspergillus flavus* CDP2. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 47, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102582>

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 1, n. 5, p. 25-40, 1994.

WALITANG, D. I.; KIM, C.G.; KIM, K.; KANG, Y.; KIM, Y. K.; SA, T. The influence of host genotype and salt stress on the seed endophytic community of salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars. **BMC Plant Biology**, v.18, p.51, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1261-1>

WANG, Y.; NARAYANAN, M.; SHI, X.; CHEN, X.; LI, Z.; NATARAJAN, D.; MA, Y. Plant growth-promoting bacteria in metal-contaminated soil: Current perspectives on remediation mechanisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.966226>

WANG, Y.; WANG, Y.; ZHANG, Q.; FAN, H.; WANG, X.; WANG, J.; ZHOU, Y.; CHEN, Z.; SUN, F.; CUI, X. Saline-Alkali Soil Property Improved by the Synergistic Effects of *Priestia aryabhatai* JL-5, *Staphylococcus pseudoxylosus* XW-4, *Leymus chinensis* and Soil Microbiota. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, 2023. <https://doi.org/10.3390/ijms24097737>

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J.; 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal Bacteriology*, v. 173, p. 697–703, 1991. <https://doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991>

ZHOU, G.; WANG, Y.S.; PENG, H.; LI, S.J.; SUN, T.L.; LI, C.L.; SHI, Q.S.; XIE, X.B. Ompx contribute to biofilm formation, osmotic response and swimming motility in *Citrobacter werkmanii*. *Gene*, v. 851, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.147019>

#### 4 ANÁLISE DE PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO *IN VITRO* DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS DE DIFERENTES GENÓTIPOS DE PALMA FORRAGEIRA

##### Resumo

A produção agrícola depende de fertilizantes, mas seu uso excessivo pode prejudicar o solo e o meio ambiente. Para aumentar a produtividade de forma sustentável, o uso de bactérias endofíticas isoladas de plantas de regiões semiáridas, como a palma forrageira, é uma abordagem promissora, pois elas podem estimular o crescimento das plantas por meio de mecanismos de promoção de crescimento. Nesse viés, o objetivo desse trabalho é a identificação *in vitro* dos mecanismos de promoção de crescimento de bactérias endofíticas isoladas de palma forrageira. Foram isoladas 186 estirpes endofíticas e todas foram avaliadas para *acdS*, *nifH*, AIA, solubilização de fosfato, produção de sideróforos e regulação osmótica. A presença do gene *acdS* e *nifH* foi detectada por PCR. A quantificação da produção de AIA se deu pelo enriquecimento do meio com L-triptofano e usando reagente Salkowski para coloração e espectrometria para leitura. A solubilização de fosfato foi determinada pelo surgimento de um halo em meio contendo fosfato insolúvel. A produção de sideróforos foi feita em meio sem ferro, utilizando o reagente CAS para coloração e análise por espectrometria. A adaptação osmótica foi testada em três níveis de estresse (10%, 20% e 30% de PEG<sub>8000</sub>) e analisada por densidade óptica. 24 estirpes amplificaram para o gene *acdS*, 20 do gênero *Opuntia* e 4 *Nopalea*. 41 estirpes amplificaram para o gene *nifH*, 31 eram do gênero *Opuntia* e 10 *Nopalea*. 30 estirpes produziram AIA, sendo 18 baixos produtores, todos eram do gênero *Opuntia*, 5 eram médios produtores, 4 *Opuntia* e 1 *Nopalea*. 3 foram altos produtores, 2 do gênero *Opuntia* e 1 *Nopalea* e 5 estirpes tiveram produção elevada, 4 do gênero *Opuntia* e 1 *Nopalea*. 75 isolados produziram sideróforos, 74 estirpes tiveram baixa produção, sendo 38 do gênero *Opuntia* e 36 *Nopalea*. E apenas 1 isolado teve alta produção de sideróforos, sendo ele do gênero *Opuntia*. 15 isolados foram produtores de fosfato, 14 foram baixos solubilizadores, sendo 7 do gênero *Opuntia* e 7 *Nopalea*. Enquanto apenas 1 foi médio solubilizador, sendo ele do gênero *Opuntia*. Para o estresse osmótico, 66 isolados foram osmoadaptativos a uma pressão osmótica de 10%, sendo 36 do gênero *Opuntia* e 30 *Nopalea*. Dentre os isolados osmoadaptativos a 10%, 55 osmoadaptativos a 20%, sendo 28 do gênero *Opuntia* e 27 *Nopalea*. Dos isolados osmoadaptativos a 20%, 44 foram osmoadaptativos a 30%, sendo 23 do gênero *Opuntia* e 21 *Nopalea*. As estirpes isoladas da palma demonstraram serem capazes de produzir mecanismos de promoção de crescimento, o gênero *Opuntia* se destacou por apresentar mais isolados com mecanismos.

Palavras-chave: *acdS*. *nifH*. AIA. Sideróforos. Solubilização de fosfato. Estresse osmótico.

## **IN VITRO GROWTH PROMOTION ANALYSIS OF ENDOFITIC BACTERIA FROM DIFFERENT GENOTYPES OF FORAGE CACTUS**

### **Abstract**

Agricultural production relies on fertilizers, but their excessive use can harm the soil and the environment. To increase productivity sustainably, the use of endophytic bacteria isolated from plants in semi-arid regions, such as forage cactus, is a promising approach as they can stimulate plant growth through growth-promoting mechanisms. In this study, the *in vitro* identification of growth promotion mechanisms of endophytic bacteria isolated from forage cactus was the objective. A total of 186 endophytic strains were isolated and all were evaluated for *acdS*, *nifH*, IAA, phosphate solubilization, siderophore production, and osmotic regulation. The presence of *acdS* and *nifH* genes was detected by PCR. Quantification of IAA production was done by enriching the medium with L-tryptophan and using the Salkowski reagent for coloration and spectrometry for reading. Phosphate solubilization was determined by the appearance of a halo in medium containing insoluble phosphate. Siderophore production was assessed in iron-free medium using the CAS reagent for coloration and analysis by spectrometry. Osmotic adaptation was tested at three stress levels (10%, 20%, and 30% PEG<sub>8000</sub>) and analyzed by optical density. Twenty-four strains amplified the *acdS* gene, with 20 from the *Opuntia* genus and 4 from *Nopalea*. Forty-one strains amplified the *nifH* gene, with 31 from the *Opuntia* genus and 10 from *Nopalea*. Thirty strains produced IAA, with 18 being low producers, all from the *Opuntia* genus; 5 were moderate producers, 4 from *Opuntia* and 1 from *Nopalea*; and 3 were high producers, 2 from *Opuntia* and 1 from *Nopalea*. Five strains had elevated production, with 4 from the *Opuntia* genus and 1 from *Nopalea*. 75 isolates produced siderophores, with 74 strains having low production, including 38 from the *Opuntia* genus and 36 from *Nopalea*. Only 1 isolate had high siderophore production, from the *Opuntia* genus. Fifteen isolates were phosphate producers, with 14 being low solubilizers, including 7 from the *Opuntia* genus and 7 from *Nopalea*. Only 1 was a moderate solubilizer, from the *Opuntia* genus. Regarding osmotic stress, 66 isolates were osmoadaptive to a 10% osmotic pressure, with 36 from the *Opuntia* genus and 30 from *Nopalea*. Among the osmoadaptive isolates at 10%, 55 were osmoadaptive to 20%, with 28 from the *Opuntia* genus and 27 from *Nopalea*. Among the osmoadaptive isolates at 20%, 44 were osmoadaptive to 30%, with 23 from the *Opuntia* genus and 21 from *Nopalea*. The isolated strains from the forage cactus demonstrated the ability to produce growth-promoting mechanisms, with the *Opuntia* genus standing out for having more isolates with such mechanisms.

Keywords: *acdS*. *nifH*. IAA. Siderophores. Phosphate solubilization. Osmotic stress.

## 4.1 Introdução

Atualmente, a produção agrícola está fortemente dependente do uso intensivo de fertilizantes químicos, que se tornaram os pilares fundamentais da agricultura moderna. No entanto, o uso excessivo desses fertilizantes pode acarretar efeitos ambientais graves e ter um impacto negativo nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, comprometendo sua fertilidade (WOŹNIAK et al., 2019).

Assim, a busca por aumentar a produtividade agrícola de forma sustentável é urgente, para suprir as necessidades humanas e preservar o equilíbrio do ecossistema. (MEHMET TUĞRUL, 2020) Uma abordagem promissora para alcançar esses objetivos é a utilização de inoculantes microbianos, como as bactérias endofíticas (OMOMOWO; BABALOLA, 2019).

As bactérias endofíticas podem estimular o crescimento das plantas por meio de vários mecanismos (SANTOYO et al., 2016), como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato, produção de sideróforos, produção de AIA (ácido indol acético) e ACC deaminase (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

Foi comprovado que isolados endofíticos do gênero *Bradyrhizobium* provocaram menor atividade de redução de acetileno, concentração de açúcar e fixação de nitrogênio em plantas de arroz (OKAMOTO et al., 2021). Bem como estirpes do gênero *Pantoea* foram capazes de promoverem significativamente o crescimento de pimentão e tomate, através da solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio (MEI et al., 2021).

Isolados endofíticos de *Lilium leucanthum* apresentaram características promotoras do crescimento vegetal, como produção de ácidos orgânicos, ACC desaminase, indol-3-acético ácido (IAA), sideróforos e fixação de nitrogênio e solubilização de fosfato, promovendo o desenvolvimento de mudas de tomate (KHAN et al., 2020).

O local de isolamento das bactérias endofíticas pode influenciar a comunidade presente (KHAN et al., 2020). Como por exemplo bactérias endofíticas isoladas da palma forrageira, que apresentaram eficiência significativa na estimulação do crescimento das plantas, produzindo substâncias como AIA e melanina, além de possuírem uma resistência natural a antibióticos (SILVA et al., 2014). Além disso, apresentaram a capacidade de promoção do crescimento em tomateiro, através da produção de AIA, sideróforos e ACC deaminase, mantendo seu crescimento em mais de 90% quando em situações de estresse (EKE et al., 2019).

Nesse contexto, levantamos a hipótese que os genótipos da palma forrageira apresentam diferentes proporções de bactérias endofíticas com mecanismos de promoção de crescimento e

estresse abiótico. Objetivando assim, identificar *in vitro* os mecanismos de promoção de crescimento e estresse abiótico de bactérias endofíticas isoladas de palma forrageira.

## 4.2 Material e métodos

### 4.2.1 Local de coleta

A palma foi coletada no Banco Ativo de Germoplasma, na Estação Experimental de Arcoverde do IPA. O clima é classificado em BSh segundo Köppen e Geiger (1923), com pouca pluviosidade ao longo do ano e temperatura média anual de 23,5 °C (CLIMA-DATE, 2022).

Foram coletadas três raquetes de cada um de seis genótipos de palma forrageira dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, com as cultivares IPA-20 (*Opuntia fucus-indica*), orelha de elefante africana (*O. undulata Griffiths*), Orelha de Elefante Mexicana (*O. stricta Haw*), miúda de Nopalea, IPA Sertânia, e F 21 (todas *Nopalea cochenillifera* Salm Dyck). Vale salientar que recentemente houve uma mudança taxonômica para o gênero *Nopalea*, que passou a ser *Opuntia cochenillifera* Karst (HALSSLER, 2022). Contudo, nesse trabalho os genótipos continuarão a ser agrupados em *Opuntia* e *Nopalea*, considerando as diferenças fenotípicas entre os mesmos.

### 4.2.2 Caracterização química e física do solo

Foram coletadas amostras de solos da camada 0-20 cm, para caracterização física e química do solo (Tabela 8).

**Tabela 8** - Análise química e física do solo.

pH água	Ca	Mg	Al	Na	K	P	M.O.	H+Al	Classificação
1:2,25			cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			mg dm <sup>-3</sup>	g kg <sup>-1</sup>	cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	<b>Textural</b>
4,17	1,1	0,9	0,98	0,14	0,25	73,3	9,03	4,77	Areia Franca

M.O.-Matéria orgânica; H- Hidrogênio.

### 4.2.3 Isolamento das bactérias

Para o isolamento das bactérias, as raquetes foram lavadas com detergente em água corrente, depois imersas em etanol 70 % durante 30s, seguido por imersão em hipoclorito de sódio 2,5 % durante 5 minutos, e por último, tríplice lavagem em água destilada autoclavada. Após a higienização, foi pesado 10g de palma e triturado com 90 mL de solução salina 0,85 %, seguido por diluições em séries de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995). Cada diluição foi inoculada no meio TSA (Tryptic Soy Agar) em triplicata utilizando a alíquota de 100 µl, em seguida foram incubados a 28 °C. O crescimento foi acompanhado após 24h da incubação.

#### **4.2.4 Extração de DNA**

Para a extração do DNA foi usado o método de bancada Bead Beating (CULLEN; HIRSCH, 1998), os isolados foram cultivados em 5mL do meio TSA líquido por cinco dias, sob agitação constante a 150 Rotação Por Minuto (RPM). Após esse tempo foi realizado a extração do DNA para os isolados que cresceram bem. O DNA extraído foi corado com Sybr Green® e precipitados com Ladder Buffer (LB), sendo submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,5 %, a 100 volts por 30min e visualizados em transiluminador sob luz UV.

#### **4.2.5 BOX-PCR**

A diversidade genética das amostras foi avaliada por meio da técnica de BOX-PCR (Tabela 2) e os produtos foram corados com Sybr Green® e precipitados com LB, sendo então submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,7% a 65 volts durante 6 horas. Um marcador de peso molecular de 100 pb (Sinapse) foi utilizado como referência. O gel de agarose foi visualizado utilizando um transiluminador sob luz ultravioleta e registrado por meio de um fotodocumentador. Foram utilizados dendrogramas gerados por meio do programa Geljv2 para analisar a similaridade entre as amostras. Essa análise foi realizada utilizando o coeficiente de Jaccard e o algoritmo UPGMA, conforme Heras et al. (2015) e Delamuta et al. (2017).

#### **4.2.6 Amplificação do gene ACC Deaminase**

Todas as estirpes foram avaliadas quanto à presença do gene que codifica a ACC deaminase (Tabela 2). Os produtos resultantes dessa amplificação foram corados com Sybr Green® e precipitados com LB, sendo então submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1 %, à 100 volts por 30 minutos. Um marcador de peso molecular de 100 pb fornecido pelo fabricante Sinapse foi utilizado como referência.

Após a eletroforese, o gel de agarose foi visualizado utilizando um transiluminador sob luz ultravioleta, sendo então fotografado por meio de um fotodocumentador. A presença do gene que codifica a ACC deaminase foi identificada como positiva pela presença de fragmentos de bandas com aproximadamente 450 pb, conforme os padrões descritos por Poly, Monrozier e Bally (2001).

#### **4.2.7 Amplificação gene *nifH***

A presença do gene *nifH* foi identificada por PCR com os *primes* FGPH192 (TACGGCAARGGTGGNATH) e PolR3 (ATSGCCATCATYTCRCCG) (SIMONET et al.,

1991; POLY; MONROZIER; BALLY, 2001), com as seguintes condições de reação: 94 °C por 5 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 45s, 72 °C por 1 min, e 72 °C por 10 min. Os produtos da PCR foram corados com Sybr Green® e precipitados com LB, submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 %, 100 volts, por 30 min, utilizando marcador de tamanho de 100 pb (Sinapse). Posteriormente, foi utilizado transiluminador sob luz UV, fotografado em fotodocumentador. As estirpes com fragmentos de gene com cerca de 450 pb foram consideradas positivas para o gene (POLY; MONROZIER; BALLY, 2001).

#### **4.2.8 Produção de ácido indol acético**

A produção de AIA seguiu o método descrito por Kuss et al. (2007) com modificações. Os isolados foram cultivados em 5 mL meio de cultura TSB (10 %) com adição de 5 Mm de L-triptofano, a 150 RPM por cinco dias. Após esse período, 1,5 mL da cultura foi centrifugado a 10.000 RPM por 5 min, 50 ul do sobrenadante resultante foi transferido para placa Elisa com poços em triplicata e adicionado 200 ul de solução Salkovisk (SERGEEVA et al., 2002) feito com 92,60 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 35%, 154,3mL de água e 3,1mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5 mol L<sup>-1</sup>, aguardando 30 min no escuro para acontecer a reação, em seguida foi analisado por espectrometria  $\lambda = 530$  nm em leitor de microplacas Biotek H1. A concentração de compostos indol acéticos foi estimada por uma curva padrão, preparada com meio de cultura estéril não inoculado e quantidades conhecidas de AIA, 2,5, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo obtido a seguinte equação.

$$A = 0,0082C + 0,0804 \quad R^2 = 0,9933$$

Onde: A= Leitura da absorbância

C= Concentração de IAA em  $\mu\text{g mL}^{-1}$

As estirpes foram agrupadas pela produção de AIA de acordo com o proposto por Brígido; Glick; Oliveira (2017), < 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), baixa produção ( $\geq 15$  e < 30  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) média produção, ( $\geq 30$  e  $\leq 45$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) alta produção e (> 45  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) elevada produção.

#### **4.2.9 Produção de sideróforos**

A produção de sideróforos seguiu a metodologia descrita por Schwyn e Neilands (1987). Os isolados foram cultivados em 5 mL de meio de cultura KingB a 150 RPM por cinco dias. Após esse período, 1,5 mL da cultura foi centrifugado a 10.000 RPM por 5 min, 100  $\mu\text{l}$  do sobrenadante resultante foi transferido para uma placa Elisa com poços em triplicata e adicionado

100 µl da solução CAS (7,5 ml de cromo azurol S, 1,5 mL de HCL+FeCL<sub>3</sub>6H<sub>2</sub>O, 25 mL de HDTMA, 40 mL de piperazina anidra e 26 mL de água deionizada) aguardando 30 min no escuro para acontecer a reação, em seguida foi analisado por espectrometria  $\lambda = 530$  no microplate reader da Biotek. A produção de sideróforos foi estimada pela fórmula de Payne (1994).

$$\text{Produção de Sideróforos} = \left( \frac{(Ar - As)}{Ar} \right) * 100$$

Onde: Ar = absorbância de referência (solução CAS e caldo não inoculado).

As = absorbância da amostra (solução CAS e sobrenadante sem células da amostra).

As estirpes foram agrupadas de acordo com a metodologia de Arora e Verma (2017), em (< 30%) baixa produção de sideróforos, ( $\leq 50\%$ ) produção média de sideróforos, (>50%) alta produção de sideróforos.

#### **4.2.10 Solubilização de fosfato de cálcio**

Para solubilização de fosfato de cálcio, foi utilizado a metodologia descrita por Nautiyal (1999). As bactérias foram multiplicadas em 5 mL de meio de cultura YM, agitadas a 150 RPM por cinco dias e inoculadas em três pontos em placas de Petri com meio de cultura NBRIP (NAUTYVAL, 1999), deixando incubado por 15 dias em temperatura de 28 °C e classificadas como solubilizadoras pelo surgimento de um halo de solubilização. Foi calculado índice de solubilização do seguinte modo:

$$IS = \frac{\text{Diâmetro halo (mm)}}{\text{Diâmetro colônia(mm)}}$$

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

#### **4.2.11 Teste de eficiência de crescimento por estresse osmótico**

Foi realizado um teste de eficiência do crescimento em meio com restrição de água seguindo a metodologia descrita por Mergeay et al. (1985). Para simulação do estresse osmótico foi utilizado o polietilenoglicol (PEG8000). As bactérias foram crescidas em meio líquido YM, durante 48 h sob agitação constante a 150 RPM, após esse período foi preparado o meio de cultura YM com controle negativo a 0 %, e o meio com concentrações de 10 %, 20 % e 30 % de PEG8000. Em seguida 100 µl da suspensão bactéria foi inoculada em placas de crescimento em

triplicata para cada um dos tratamentos. Após cinco dias de crescimento as bactérias foram avaliadas por densidade ótica a  $\lambda = 600 \text{ nm}$  em leitor de microplacas Biotek H1. Os isolados com valores de densidade ótica  $\geq 2$  foram considerados osmoadaptativos de acordo com Nordstedt e Jones (2020).

#### ***4.2.12 Análises estatísticas***

Foi realizado o teste de qui-quadrado de comparação entre os gêneros para ACC deaminase, *nifH*, níveis de produção de AIA, sideróforos, solubilização de fosfato e adaptação osmótica.

### 4.3 Resultados

Após a aplicação da técnica BOX-PCR para agrupamento, os 241 isolados da palma forrageira dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea* resultaram em 190 isolados amplificados, que formaram 185 grupos distintos. Dentre esses grupos, apenas um deles era composto por mais de uma bactéria. Conseqüentemente, as bactérias selecionadas por meio da técnica BOX-PCR foram submetidas à análise dos seguintes mecanismos de promoção de crescimento:

Dos isolados testados para o gene *acdS*, que codifica para a ACC deaminase, 24 isolados amplificando para o gene (Tabela 9), com diferença significativa entre os gêneros pelo  $X^2$  a 10 %. 41 isolados amplificaram para o gene *nifH* (Tabela 9), com diferença significativa entre os gêneros pelo  $X^2$  a 10%.

**Tabela 9** - Teste de qui-quadrado ( $X^2$ ) para os mecanismos de promoção de crescimento em plantas, com as estirpes isoladas dos gêneros *Opuntia* e *Nopalea* na palma forrageira.

Mecanismos	Níveis Mecanismos	<i>Opuntia</i>	<i>Nopalea</i>	Pr>Qui
Presença de ACC	ACC+	20	4	0,0185
Presença <i>nifH</i>	<i>nifH</i> +	31	10	0,0319
Produção de AIA	Baixa	18	0	0,00042
	Média	4	0	0,0964
	Alta	2	1	0,7908
	Elevada	4	1	0,3426
Produção de sideróforos	Baixa	38	36	0,1729
	Alta	1	0	0,4058
Solubilização de fosfato de cálcio	Baixa	7	7	0,4866
	Média	1	0	0,4085
Estresse osmótico	10%	36	30	0,4476
	20%	28	27	0,2143
	30%	23	21	0,3541

30 estirpes apresentaram produção de AIA (Tabela 9). 18 isolados apresentaram baixa produção de AIA ( $< 15 \text{ ug mL}^{-1}$ ), 5 isolados apresentaram produção média ( $\geq 15$  e  $< 30 \text{ ug mL}^{-1}$ ), 3 isolados tiveram alta produção ( $\geq 30$  e  $\leq 45 \text{ ug mL}^{-1}$ ) e 5 dos isolados tiveram uma produção elevada de AIA ( $> 45 \text{ ug mL}^{-1}$ ). O teste  $X^2$  a 10 % foi significativo para baixa e média produção e não significativo para alta e elevada produção.

75 estirpes foram capazes de produzir sideróforos. Sendo que 74 dos isolados apresentaram baixa produção ( $< 30$  %). E apenas 1 isolado teve alta produção de sideróforos ( $> 50\%$ ). O teste  $X^2$  das análises foi não significativo para as duas faixas de produção.

15 isolados foram capazes de solubilizar fosfato de cálcio (Tabela 9). 14 dos isolados solubilizadores foram classificados como tendo baixa capacidade de solubilização de fosfato de cálcio ( $IS < 2$ ), enquanto apenas 1 dos isolados demonstrou uma capacidade de solubilização

média ( $2 > IS < 4$ ). O teste  $X^2$  das análises foram não significativos para as duas faixas de solubilização.

66 isolados foram osmoadaptativos a uma pressão osmótica de 10 % de PEG<sub>8000</sub> (Tabela 9). Dentre os isolados osmoadaptativos a 10 %, 55 também foram osmoadaptativos a uma pressão osmótica de 20 %. Dos isolados osmoadaptativos a 20 %, 44 também foram adaptativos a uma pressão osmótica de 30 %. O teste de  $X^2$  foi não significativo para as três faixas de estresse osmótico.

#### 4.3.1 Compilação dos mecanismos testados para os isolados da palma

Enquanto 38 estirpes não apresentaram nenhum dos mecanismos avaliados, enquanto que 72, 55, 16, 4 isolados apresentaram respectivamente um, dois, três e quatro mecanismos (Tabela 8), sem diferença significativa em função do genótipo de isolamento, exceto para o grupo com quatro mecanismos, em que todas foram isoladas de *Opuntia*.

**Tabela 10** - Teste de qui-quadrado ( $X^2$ ) para a quantidade de estirpes por mecanismos, dos isolados provenientes da palma forrageira do gênero *Opuntia* e *Nopalea*.

Mecanismos	<i>Opuntia</i>	<i>Nopalea</i>	Pr>Qui
1	37	35	0,1481
2	36	19	0,3407
3	11	5	0,4342
4	4	0	0,0964

#### 4.4 Discussão

A análise *in vitro* de 186 estirpes bacterianas isoladas dos cladódios da palma revelou a presença de mecanismos importantes para a promoção do crescimento de plantas. Dentre essas estirpes, 13 % apresentaram amplificação do gene ACC deaminase, sendo mais frequentes nas estirpes do gênero *Opuntia*, conforme apresentado na Tabela 9. Estudos anteriores com o gênero *Opuntia*, como o de Govindasamy et al. (2022), também confirmaram a presença de muitas estirpes bactérias produtoras de ACC deaminase.

Outros estudos também já demonstraram que o genótipo causa influência sobre a comunidade bacteriana. Como em estudos realizados em eucalipto, que ficou evidenciado que comunidade bacterianas isoladas de *E. camaldulensis* não apresentavam mecanismos de resistência ao estresse hídrico, enquanto as estirpes isoladas de *E. tereticornis* demonstraram alta resistência ao estresse hídrico, conforme descrito por Dasgupta et al. (2020). Isso evidencia que genótipos de plantas com maior resistência à seca, como o gênero *Opuntia*, possuem uma maior proporção de bactérias que proporcionam alívio do estresse hídrico.

A presença do gene *nifH* foi identificada em 22 % das estirpes, sendo observada uma maior frequência de isolados para o gênero *Opuntia*, conforme mostrado na Tabela 9. Resultados de estudos anteriores realizados por Costa e Melo (2013) e Lyra et al. (2013) com o gênero *Opuntia* também demonstraram uma alta frequência de isolamento de bactérias com a capacidade de fixação de nitrogênio. Bem como estudos com outras espécies vegetais como a cana-de-açúcar, que também mostrou diferenças na comunidade de bactérias fixadoras de nitrogênio entre diferentes genótipos da cana, conforme relatado por Singh et al. (2022). Essas diferenças estão associadas às interações específicas entre as espécies e as bactérias fixadoras de nitrogênio (SINGH et al., 2022).

Dentre as estirpes analisadas neste estudo, 16,13 % delas apresentaram produção de AIA, sendo mais frequente no gênero *Opuntia* para todos os níveis de produção. Resultados semelhantes foram encontrados em estudos anteriores realizados por Costa e Melo (2012) com estirpes isoladas do gênero *Opuntia*, no qual aproximadamente 20 % dos isolados foram produtores de AIA em algum dos níveis de produção. Bem como em trabalhos de Govindasamy et al. (2022) de raízes de *Opuntia* em que aproximadamente 30 % das estirpes apresentaram produção de AIA, abrangendo todos os níveis de produção. A presença de bactérias produtoras de AIA estimula o crescimento das plantas, o alongamento das raízes, o desenvolvimento do caule e favorece a absorção de água e nutrientes, conforme Jahn; Hofmann; Ludwig-Müller, (2021).

Os mecanismos AIA, ACC deaminase e *nifH* tiveram maior frequência de isolados *Opuntia*. Estas características podem contribuir para a maior resistência a seca, como também encontrado por Karray et al. (2020) para *Opuntia* em ambientes árido e semiárido.

A produção de sideróforos foi identificada em 41 % estirpes bacterianas, distribuída em ambos os gêneros da palma. Sendo o mecanismo mais expresso independentes do gênero. Os endófitos produtores de sideróforos conferem ao cacto a capacidade de crescer em ambientes estressantes, pois essas bactérias têm a capacidade de auxiliar as plantas de cactos na extração de vários micronutrientes, conforme relatado por Dimkpa et al. (2008) e Qin et al. (2015).

Cerca de 8,5 % das estirpes apresentaram a capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, sem diferença de ocorrência entre os gêneros. Esses resultados estão em concordância com o trabalho de Costa e Melo (2012), que relataram que apenas 12 % das estirpes isoladas da palma forrageira apresentaram capacidade de solubilização de fosfato, sendo que essas estirpes demonstraram aumentos significativos no incremento da produção.

Das estirpes analisadas, 35,5% delas apresentaram crescimento em pelo menos um dos níveis de pressão osmótica testados (Tabela 9), não havendo diferença significativa entre os gêneros para nenhum dos níveis. Estudos anteriores, como o de Cruz Barrera et al. (2020), comprovaram que as bactérias endofíticas osmoadaptativas promovem o crescimento e aumentam a matéria seca das plantas, o que oferece perspectivas positivas para o uso dessas bactérias através do estabelecimento de relações simbióticas que podem aumentar a tolerância da planta ao estresse abiótico (OGBE et al., 2023).

Os mecanismos mais expressos, independentes dos gêneros, foram produção de sideróforos, adaptação osmótica e *nifH*. Resultados semelhantes foram encontrados por Walitang et al. (2020) em *Oryza sativa*, estando este feito associado a capacidade de seletividade da planta.

80% das estirpes apresentaram mecanismos de promoção de crescimento, conforme mostrado na Tabela 10. Dentre essas estirpes, 75 produziram apenas um mecanismo, 55 apresentaram dois mecanismos, 16 apresentaram três mecanismos (tabela 11) e apenas 4 estirpes expressaram quatro mecanismos. Resultados semelhantes foram observados em estudos com *Opuntia ficus-indica*, nos quais 85 % dos isolados produziram algum um mecanismo de promoção de crescimento (GOVINDASAMY et al., 2022). Em consonância com esses achados, Srinivasan et al. (2022), ao trabalharem com bactérias de uma planta do deserto (*Zygophyllum dumosum*), constataram que 80 % dos isolados bacterianos também foram capazes de expressar algum mecanismo de promoção de crescimento. Esses resultados destacam a relevância do estudo de bactérias endofíticas como uma área promissora de pesquisa (AFZAL et al., 2019).

**Tabela 11** - Estirpes isoladas da palma forrageira com maiores quantidades de mecanismos de promoção de crescimento em plantas.

Mecanismos	Estirpe	Osmoadaptação	AIA	Sideróforos	Solubilização de fosfato	ACC	NIF	
3	49	x	x			x		
	51	x	x			x		
	105		x			x	x	
	124	x		x			x	
	127	x				x	x	
	137	x	x			x		
	165			x		x	x	
	204			x	x		x	
	211	x	x	x				
	219	x	x				x	
	221	x			x		x	
	294	x	x			x		
	327	x			x		x	
	340	x			x		x	
	341	x					x	x
	358	x			x			x
4	185	x	x	x	x			
	197	x	x	x	x			
	215		x	x		x	x	
	216		x	x		x	x	

#### 4.5 Conclusões

Aproximadamente 80% das bactérias isoladas de palma forrageira apresentaram pelo menos um mecanismo de promoção de crescimento de planta *in vitro*, com os produção de sideróforos, adaptação osmótica e *nifH*, sendo os mais frequentes independente do gênero da palma forrageira hospedeira.

A produção de AIA, ACC deaminase e *nifH* foram significativamente mais frequentes em *Opuntia*, o que pode contribuir para a maior resistência deste gênero a déficit hídrico.

A frequência comparativamente alta de bactérias com características promotoras de crescimento em palma forrageira confirma o potencial de espécies adaptadas a ambientes estressantes, como semiárido tropical, como fonte de estirpes para avaliação para a promoção de crescimento de plantas.

As estirpes 185, 197, 215 e 216 responderam de forma positiva para pelo menos quatro dos seis mecanismos (solubilização de fosfato, produção de AIA, estresse osmótico, produção de sideróforos, presença do gene *nifH* e gene *acdS*).

## Referências Bibliográficas

- AFZAL, I.; KHAN, Z.; SIKANDAR, S.; SHAHZAD, S. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. **Microbiological Research Journal**, v. 221, n. April 2018, p. 36–49, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.02.001>
- ARORA, N.K.; VERMA M. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. **3 Biotech**, 2017. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-1008-y>
- BRÍGIDO, C.; GLICK, B.; OLIVEIRA, S. Survey of plant growth-promoting mechanisms in native portuguese chickpea *mesorhizobium* isolates. *Microbial ecology*, v. 73, p. 900-915, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00248-016-0891-9>
- CARDOSO, E. J. B. N.; ANDREOTE, F. D. Microbiologia do solo. **ESALQ**, 2016. <https://doi.org/10.11606/9788586481567>
- CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A.; OLIVEIRA, A. N.; WILLERDING, A. L. Capacidade de solubilização de fosfatos e eficiência simbiótica de rizóbios isolados de solos da Amazônia. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 359-366, 2010.
- COSTA, F.E.C.; MELO, I.S. Endophytic and rhizospheric bacteria from *Opuntia ficus-indica* mill and their ability to promote plant growth in cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **African Journal of Microbiology**, v. 6, p.1345-1353,2012. <https://doi.org/10.5897/AJMR11.1503>
- CRUZ BARRERA, M.; JAKOBS-SCHOENWANDT, D.; GÓMEZ, M.I.; SERRATO, J.; RUPPEL, S.; PATEL, AV. Formulating bacterial endophyte: Pre-conditioning of cells and the encapsulation in amidated pectin beads, **Biotechnology Reports**, v. 28, p. 26, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00463>
- DASGUPTA, M.G.; BURRAGONI, S.; AMRUTHA, S.; MUTHUPANDI, M.; PARVEEN, A.B.M.; SIVAKUMAR, V.; ULAGANATHAN, K. Diversity of bacterial endophyte in *Eucalyptus* clones and their implications in water stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 241, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micres>
- DIMKPA, C.O.; SVATOS, A.; DABROWSKA, P.; SCHMIDT, A.; BOLAND, W.; KOTHE, E. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. **Chemosphere**, v. 74, p.19–25, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.079>
- GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica** (Cairo), v. 2012, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- GOVINDASAMY, V.; GEORGE, P.; RAMESH, S.V.; SURESHKUMAR, P.; RANE, J.; MINHAS, P.S. Characterization of root-endophytic actinobacteria from cactus (*Opuntia ficus-indica*) for plant growth promoting traits. **Archives of Microbiology**, v.204, p.150, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02671-2>

JAHN, L.; HOFMANN, U.; LUDWIG-MÜLLER, J.; Indole-3-Acetic Acid Is Synthesized by the Endophyte *Cyanodermella asteris* via a Tryptophan-Dependent and -Independent Way and Mediates the Interaction with a Non-Host Plant. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 2651, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22052651>

KARRAY, F.; GARGOURI, M.; HEBAANE, A.; MHIRI, N.; MLIKI, A.; SAYADI, S. Climatic Aridity Gradient Modulates the Diversity of the Rhizosphere and Endosphere Bacterial Microbiomes of *Opuntia ficus-indica*. **Frontiers in Microbiology**, v.11, p1622, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01622>

KHAN, M.S.; GAO, J.; CHEN, X.; ZHANG, M.; YANG, F.; DU, Y.; MOE, T.S.; MUNIR, I.; XUE, J.; ZHANG, X. The Endophytic Bacteria *Bacillus velezensis* L1-9, Isolated from *Lilium leucanthum*, Harbors Antifungal Activity and Plant Growth-Promoting Effects. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 668-680, 2020. <https://doi.org/10.4014/jmb.1910.10021>

KUSS, A.V.; KUSS, V.V.; LOVATO, T.; FLÔRES, M.L. Fixação de nitrogênio e produção de ácido indolacético in vitro por bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 1459-1465, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2007001000013>

LYRA, M. C. C. P.; SANTOS, D.C.; MONDRAGON-JACOBO, C.; DA SILVA, M.L.R.B.; MARGULHÃO, A. C. E.S.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Isolation and molecular characterization of endophytic bacteria associated with the culture of forage cactus (*Opuntia* spp.). **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 1, p.11-16, 2013. <https://doi.org/10.7324/JABB.2013.1103>

MEHMET TUĞRUL, K. soil management in sustainable agriculture, sustainable crop production. **Intechopen**, 2020. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88319>.

MEI, C.; CHRETIEN, R. L.; AMARADASA, B. S.; TURNER, A.; LOWMAN, S. Characterization of Phosphate Solubilizing Bacterial Endophytes and Plant Growth Promotion In Vitro and in Greenhouse. **Microorganisms**, v. 9, p. 1–11, 2021. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091935>

MERGEAY, M.; NIES, D.; SCHLEGEL, H. G.; GERITS, J.; CHARLES, P.; VAN GIJSEGEM, F. Alcaligene seutrophus CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-bound resistance to heavy metals. **Journal Bacteriol**, v. 162, 1985. <https://doi.org/10.1128/jb.162.1.328-334.1985>

NAUTIYAL, C. S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 170, p. 265–270, 1999. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13383.x>

NORDSTEDT, N. P.; JONES, M. L. Isolation of rhizosphere bacteria that improve quality and water stress tolerance in greenhouse ornamentals. **Front plant science**, v. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00826>

OGBE, A.A.; GUPTA, S.; STIRK, W.A.; FINNIE, J.F.; VAN STADEN, J. Growth-Promoting Characteristics of Fungal and Bacterial Endophytes Isolated from a Drought-Tolerant Mint Species *Endostemon obtusifolius* (E. Mey. ex Benth.) N. E. Br. **Plants (Basel)**, v. 3, p.638, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12030638>

OKAMOTO, T.; SHINJO, R.; NISHIHARA, A.; UESAKA, K.; TANAKA, A.; SUGIURA, D.; KONDO, M. Genotypic variation of endophytic nitrogen-fixing activity and bacterial flora in rice stem based on sugar content. **Frontiers in Plant Science**, v.12, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.719259>

OMOMOWO O.I.; BABALOLA O.O. Bacterial and fungal endophytes: tiny giants with immense beneficial potential for plant growth and sustainable agricultural productivity. **Microorganisms**, v. 11, p.481, 2019. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7110481>

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

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 95–103, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01172-4](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01172-4)

PRIYADARSHINI, P.; CHITDESHWARI, T.; SUDHALAKSHMI, C. An Iron Availability in Calcareous and Non-Calcareous Soils as Influenced by Various Sources and Levels of Iron. **Madras Agricultural Journal**, v. 106, p. 310-315, 2019. <https://doi.org/10.29321/MAJ2019.000265>

QIN, S.; MIAO, Q.; FENG, W.W.; WANG, Y.; ZHU, X.; XING, K.; JIANG, J.H. Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. **Applied Soil Ecology**, v.93, p.47–55, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.004>

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

SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)

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

SHI, Y.; YANG, H.; ZHANG, T.; SUN, J.; LOU, K. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p. 6375-6385, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5720-9>

SILVA, M. L. R. B.; MERGULHÃO, A. C. E. S.; FIGUERÔA, C. S.; CORDEIRO, D. S.; LYRA, M. C. C. P. Diversidade da microbiota endofítica na cultura da palma (*Opuntia* spp. e *Nopalea* spp.) no Semiárido de Pernambuco. Pesquisa Agropecuária Pernambucana, v. 19, n. 1, p. 3–10, 2014. <https://doi.org/10.12661/pap.2014.002>

SILVA, R.R, SAMPAIO, E. V.S.B. Palmas forrageiras *Opuntia ficus-indica* e *Nopalea cochenillifera*: Sistemas de produção e usos. GEAMA, v.1, p. 151-161, 2015.

SIMONET, P.; GROSJEAN, M. C.; MISRA, A. K.; NAZARET, S.; COURNOYER, B.; NORMAND, P. Frankia genus specific characterization by polymerase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology, v. 57, p. 3278-3286, 1991. <https://doi.org/10.1128/aem.57.11.3278-3286.1991>

SINGH, R.K.; SINGH, P.; SHARMA, A.; GUO, D.J.; UPADHYAY, S.K.; SONG, Q.Q.; VERMA, K.K.; LI, D.P.; MALVIYA, M.K.; SONG, X.P.; YANG, L.T.; LI, Y.R. Unraveling Nitrogen Fixing Potential of Endophytic Diazotrophs of Different Saccharum Species for Sustainable Sugarcane Growth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, p. 6242, 2022. <https://doi.org/10.3390/ijms23116242>

SRINIVASAN, J.; KHADKA, J.; NOVOPLANSKY, N.; GILLOR, O.; GRAFI, G. Endophytic Bacteria Colonizing the Petiole of the Desert Plant *Zygophyllum dumosum* Boiss: Possible Role in Mitigating Stress. **Plants** (Basel), v. 11, p. 484, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11040484>

WALITANG, D. I.; KIM, K.; MADHAIYAN, M.; KIM, Y. K.; KANG, Y.; SA, T. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. **BMC Microbiology**, v.17, p.209, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>

WOŹNIAK, M.; GAŁĄZKA, A.; TYŚKIEWICZ, R.; JAROSZUK-ŚCISEŁ, J. Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the biolog gen iii microplatetm test. **International journal of molecular sciences**, v. 20, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20215283>

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram identificadas 186 estirpes distintas nos gêneros *Opuntia* e *Nopalea*, demonstrando que espécies de regiões semiáridas abrigam grande diversidade de bactérias endofíticas.

Os gêneros relacionados às estirpes positivas para o gene *acdS* que codifica para a ACC deaminase, possuem mecanismos de promoção de crescimento vegetal, e, portanto, demonstram a eficácia desse gene como um meio de identificação de bactérias com potencial de estimular o crescimento.

O gênero *Opuntia* apresentou maior frequência de isolados com mecanismos de promoção de crescimento, principalmente os ligados ao alívio do estresse hídrico. O que demonstra o potencial de espécies adaptadas a ambientes estressantes, como fonte de bactérias de promoção de crescimento em plantas.

No entanto, a fim de obter uma compreensão mais aprofundada, são necessários estudos futuros que se concentrem na análise dessas cepas bacterianas em relação ao alívio do estresse hídrico e à promoção de crescimento de plantas em casa de vegetação e campo.