

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ISABELLA DAL'RIO NASCIMENTO LOPES

ESTUDO DA COMUNIDADE BACTERIANA E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS ASSOCIADAS A RAÍZES
DE *TROPAEOLUM MAJUS* L. (CAPUCHINHA)

RIO DE JANEIRO

2021



ISABELLA DAL'RIO NASCIMENTO LOPES



**ESTUDO DA COMUNIDADE BACTERIANA E SELEÇÃO DE BACTÉRIAS
PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS ASSOCIADAS A RAÍZES
DE *TROPAEOLUM MAJUS* L. (CAPUCHINHA)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lucy Seldin

RIO DE JANEIRO

2021

CIP - Catalogação na Publicação

DD151e Dal'Rio , Isabella Nascimento Lopes
Estudo da Comunidade Bacteriana e Seleção de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas Associadas a Raízes de *Tropaeolum majus* L. (Capuchinha) / Isabella Nascimento Lopes Dal'Rio . - Rio de Janeiro, 2021. 85 f.

Orientadora: Lucy Seldin.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saude, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2021.

1. Capuchinha. 2. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas. 3. Plantas Alimentícias Não Convencionais. 4. Sequenciamento da Comunidade Bacteriana Total (16S). 5. Isolamento de Bactérias Endofíticas. I. Seldin, Lucy, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, pelos ensinamentos e pela parceria de longa data. Ainda que longe, estamos sempre juntos.

À professora Lucy, por me receber de braços abertos e também abraçar as minhas ideias. Por ser não só uma ótima orientadora, mas também uma mãe científica que sabe exatamente a hora de puxar a orelha e a hora de pegar leve. Obrigada infinitamente pela compreensão, pela preocupação e por ter um papel tão ativo na minha construção como pesquisadora.

À Jacky, minha co-orientadora que me acompanhou desde o início da minha jornada e hoje é uma grande amiga, tão querida! Obrigada por escutar meus áudios de mais de 10 min contendo brainstorms enviados às 23 horas de um domingo com toda a paciência do mundo. Obrigada por ter mergulhado de cabeça nos nossos projetos. A vida científica há de fazer nossos caminhos se cruzarem novamente, sinto muito a sua falta!

Aos amigos do LGM pelo apoio moral e psicológico. Janinha, nossa querida técnica, que me ajudou muito na bancada e me ensinou a parar para descansar, obrigada pelo carinho e pelo cuidado. Erickinha, minha amiga, que também me ensinou tanto de bancada lá em 2016. Eliene que foi uma grande companhia durante a pandemia e me ajudou nesse projeto. A todos os outros amigos que em algum momento tiveram que me ajudar a lavar uma vidraria e verter um meio, muito obrigada!

Aos amigos do LABEM, que me deram tanto suporte. Rapha e Douglinhas, sempre dispostos a me ajudar como podem, muito obrigada! Milleninha, pelos cafés e chocolates. E um agradecimento especial aos professores Diogo e Caio. Diogo, sempre disponível a tirar qualquer dúvida, me lembrou de trazer algo muito importante para o projeto: LEVEZA. Me lembrou de curtir todo esse processo, inclusive os resultados negativos e a escrita da dissertação. Obrigada! Caio, nem caberia aqui tudo que eu tenho para agradecer. Desde discutir sobre metodologias, ajudar na bancada, ajudar nas análises, casa de vegetação e tomar um café. Obrigada por todo o apoio e parceria durante a pandemia, eu te admiro demais!

Às minhas amigas Bea, Lari, July e Agnes. Obrigada por sempre disponibilizarem o ouvido de vocês para eu poder desabafar e por terem sempre me apoiado nesse sonho. Amo muito cada uma de vocês!

À UFRJ que hoje é minha casa, a PBV pela oportunidade de fazer o mestrado e ao IMPPG pelo meu bacharelado. Ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dal’Rio, Isabella Nascimento Lopes. Estudo da comunidade bacteriana e seleção de bactérias promotoras de crescimento de plantas associadas a raízes de *Tropaeolum majus* L. (capuchinha). Rio de Janeiro, 2021. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos). Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2021.

A capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) é uma planta alimentícia não-convencional economicamente importante para a agricultura orgânica, pela presença de flores vistosas que se destacam em projetos de paisagismo e na culinária. Essa hortaliça é capaz de manter a umidade do solo, repelir pragas e favorecer o crescimento de outras plantas adjacentes. A capuchinha também apresenta propriedades medicinais, como atividade anti-inflamatória, antioxidante e antibiótica. Apesar do crescente interesse por essa hortaliça, a microbiota da capuchinha ainda é desconhecida e inexplorada. A seleção de Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (*Plant Growth Promoting Bacteria*, PGPB) provenientes da microbiota indígena da capuchinha pode permitir o desenvolvimento de um bioinoculante com atividade contra fitopatógenos e capaz de favorecer o desenvolvimento da planta. Tendo em vista a relevância da capuchinha para a agricultura orgânica, o presente trabalho tem como objetivos: (i) determinar a estrutura da comunidade bacteriana total associada às regiões rizosférica, endofítica e ao solo não-rizosférico da capuchinha; (ii) isolar e identificar PGPB da região endofítica da capuchinha e (iii) comparar a comunidade bacteriana total endofítica da capuchinha com as PGPB identificadas. Para isso, foram amostradas raízes, solo rizosférico e não-rizosférico de cinco plantas de capuchinha cultivadas no Sítio Cultivar em Nova Friburgo, Rio de Janeiro. O DNA total das amostras foi submetido a um sequenciamento em larga escala de parte do gene que codifica o 16S rRNA (gene *rrs*). Concomitantemente, foi feito o isolamento de bactérias endofíticas e a seleção de PGPB (mineralização e solubilização de fosfato, produção de substâncias antimicrobianas, produção de sideróforos, produção de compostos indólicos e amplificação do gene *nifH*). A análise de alfa-diversidade da comunidade bacteriana total mostrou que há uma redução de diversidade e riqueza da comunidade do solo não-rizosférico para a rizosfera e da rizosfera para a região endofítica. Já a análise de beta-diversidade mostrou que cada microambiente analisado possui uma comunidade bacteriana característica. Os filos Proteobacteria e Actinobacteria foram dominantes nas três regiões analisadas. O gênero *Pseudomonas* foi o mais dominante na comunidade do solo não-rizosférico e da rizosfera, enquanto o gênero *Ralstonia* – que inclui espécies fitopatogênicas – foi o mais abundante na comunidade E. Além disso, 236 estirpes bacterianas foram isoladas, nas quais 96 estirpes apresentaram resultados positivos para pelo menos 4 dos 6 testes de seleção de PGPB realizados. Destas, 76 estirpes foram identificadas molecularmente em 11 diferentes gêneros, sendo majoritariamente pertencentes aos gêneros *Serratia*, *Raoultella* e *Klebsiella*. A comparação entre o sequenciamento da comunidade bacteriana total e as estirpes isoladas, ambas endofíticas, resultou na seleção de 23 estirpes – dos gêneros *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*. A utilização dessas estirpes foi sugerida para o desenvolvimento de um bioinoculante devido à presença delas na microbiota indígena da capuchinha. Estudos *in vivo* serão fundamentais para avaliar as estirpes selecionadas como possíveis bioinoculantes. Além disso, mais estudos são necessários para elucidar a relação ecológica entre o gênero *Ralstonia* e a capuchinha.

ABSTRACT

Dal’Rio, Isabella Nascimento Lopes. Study of the bacterial community and selection of plant growth-promoting bacteria associated with roots of *Tropaeolum majus* L. (capuchin). Rio de Janeiro, 2021. Plano de dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos). Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2021.

Capuchin (*Tropaeolum majus* L.) is an unconventional food plant economically important for organic agriculture, due to the presence of attractive flowers that are used in landscaping projects and for cooking. This plant is able to maintain soil moisture, repel pests and favor the growth of other adjacent plants. Capuchin also has medicinal properties, such as anti-inflammatory, antioxidant and antibiotic activities. Despite the growing interest in this plant, the capuchin’s microbiome is yet unknown and unexplored. The selection of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) from the indigenous capuchin microbiota may allow the development of a bioinoculant with activity against phytopathogens and capable of favoring the development of the plant. Because of the capuchin's relevance to organic agriculture, the present study aims to: (i) determine the structure of the total bacterial community associated with the rhizosphere, endosphere and non-rhizosphere soil of capuchin; (ii) isolate and identify PGPB from capuchin’s endophytic region, and (iii) compare the total bacterial community with the identified PGPB. To this end, roots, rhizosphere and non-rhizosphere soil were sampled from five capuchin plants grown at Sítio Cultivar in Nova Friburgo, Rio de Janeiro. The total DNA of the samples was subjected to large-scale sequencing of part of the gene encoding the 16S rRNA (*rrs* gene). Concomitantly, the isolation of endophytic bacteria and PGPB selection was performed. The alpha diversity analysis from the total bacterial community showed that there is a reduction in diversity and richness from the non-rhizosphere soil to the rhizosphere and from the rhizosphere to the endosphere. The beta diversity analysis showed that each microenvironment analyzed has a unique bacterial community. Proteobacteria and Actinobacteria phyla were dominant in the three regions analyzed. The genus *Pseudomonas* was the most dominant in the non-rhizosphere soil and rhizosphere communities, while the genus *Ralstonia* – which includes phytopathogenic species – was the most abundant in the endophytic community. In addition, 236 bacterial strains were isolated, in which 96 strains showed positive results for at least 4 out of 6 PGPB selection tests performed. Of these, 76 strains were identified molecularly in 11 different genera, mostly belonging to *Serratia*, *Raoultella* and *Klebsiella*. The comparison between total bacterial community and isolated strains, both endophytic, resulted in the selection of 23 strains – of the genera *Bacillus*, *Serratia*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus*. The use of these strains was suggested to the development of a bioinoculant due to their presence in the indigenous capuchin microbiome. *In vivo* studies will be fundamental to evaluate the strains’ ability to be used as bioinoculants and more studies are needed to elucidate the ecological relationship between the genus *Ralstonia* and capuchin plants.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Características visuais da capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) em uma plantação em Nova Friburgo, Rio de Janeiro. As diferentes plantas apresentavam flores laranjas (a) e vermelhas (b). É possível observar o caule de coloração verde arroxeada, fino, retorcido e a presença de sementes de capuchinha, indicada pela seta vermelha (c). Ainda, é possível notar as folhas arredondadas e o crescimento desordenado da capuchinha (d). Fonte: compilado de imagens do acervo pessoal, figura de autoria própria. 4
- Figura 2.** Área de plantio consorciado de alface e capuchinha no Sítio Cultivar em Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Fonte: acervo pessoal. 14
- Figura 3.** Formação de anéis necróticos foliares e murcha das folhas e flores de capuchinha no Sítio Cultivar em Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Seta vermelha: murcha da folha; seta amarela: murcha da flor e seta azul: anéis necróticos na folha. Fonte: acervo pessoal. 14
- Figura 4.** Metodologia utilizada para seleção de PGPB e identificação das estirpes, conforme detalhado no item 4.5. Fonte: figura de autoria própria, contendo imagens do acervo pessoal e imagens extraídas de busca. 19
- Figura 5.** Teste realizado para avaliar a produção de compostos indólicos (CI), conforme descrito no item 4.5.1. A mudança da coloração amarela do meio King's B para tons avermelhados após a adição do reagente de Salkowski indica positivo para CI. Da esquerda para a direita: positivo forte, controle negativo e positivo fraco. Fonte: acervo pessoal. 20
- Figura 6.** Testes realizados para análise de mineralização de fosfato orgânico (meio FCA – a), produção de sideróforos (meio CAS – b) e solubilização de fosfato inorgânico (meio NBRIP – c). A presença de um halo transparente ao redor das colônias indica que a estirpe foi positiva para os testes. Fonte: acervo pessoal. 22
- Figura 7.** Teste realizado para avaliar a produção de substâncias antimicrobianas (SAMs) conforme descrito no item 4.5.4. No centro das placas de Petri está o crescimento das estirpes bacterianas isoladas. Após o inóculo de uma estirpe de *Micrococcus* sp., a presença do halo foi considerada como resultado positivo para a produção de substâncias antimicrobianas. Em (a), presença de um halo considerado turvo. Em (b), presença de um halo considerado translúcido. Fonte: compilado de imagens do acervo pessoal, figura de autoria própria. 23
- Figura 8.** Teste realizado para avaliar a amplificação do gene *nifH*, conforme descrito no item 4.5.5. Na linha superior, as siglas significam: 1kb – poço contendo MassRuler™ High Range DNA Ladder; C+ - poço contendo o controle positivo referente ao gene *nifH*; E18-E34 – poços contendo os produtos de PCR de diferentes estirpes testadas; CN – controle negativo da reação de PCR (sem colônia). As setas amarelas indicam resultados considerados positivos para a presença do gene *nifH* (394pb) e as setas vermelhas indicam amplificações inconclusivas (tamanhos somente próximos a 394pb). As demais amplificações foram consideradas negativas. Fonte: imagem de autoria própria gerada pelo aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System com o auxílio do *software* Image Lab™. 24

- Figura 9.** Curva de rarefação individual das amostras da região endofítica (E – tons de verde), rizosférica (R – tons de laranja) e do solo não-rizosférico (S – tons de azul) associado à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* Microsoft Excel. 27
- Figura 10.** NMDS (*Non-Metric Dimensional Scaling*) da beta-diversidade entre a comunidade bacteriana presente nas regiões endofítica (E – verde), rizosférica (R – laranja) e no solo não-rizosférico (S – azul) associado à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.), baseado no índice de Bray-Curtis. Gráfico gerado em 3D, mostrando as coordenadas 1 e 2 ou 2 e 3. Valores do teste PERMANOVA $p < 0,05$ indicam diferença significativa na beta-diversidade da comunidade bacteriana entre as amostras. Valor de Stress $\leq 0,10$ indica que a distribuição dos dados é fidedigna; valores próximos a 2,0 indicam distribuição estocástica dos dados. Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* PAST v4.02. 29
- Figura 11.** Abundância relativa média de 8 filos bacterianos identificados através do sequenciamento de parte do gene *rrs* nas regiões endofítica (E – verde), rizosférica (R – laranja) e no solo não-rizosférico (S – azul) associados à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Em **a** – até 80% de abundância relativa e em **b** – até 12% de abundância relativa, mostrando os filos que apresentam mais de 0,75% de abundância relativa na média de todas as amostragens. Os asteriscos ao lado do nome dos filos indicam que há diferença estatística entre as amostras. Letras diferentes ao lado das barras de desvio padrão representam diferenças estatísticas significativas entre as amostras S, R e/ou E (Tukey, $p < 0,05$). Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* Microsoft Excel. 30
- Figura 12.** Abundância relativa média de 23 famílias bacterianas identificadas através do sequenciamento de parte do gene *rrs* nas regiões endofítica (E – verde), rizosférica (R – laranja) e no solo não-rizosférico (S – azul) associadas à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Em **a** – até 40% de abundância relativa; em **b** – até 8% de abundância relativa e em **c** – até 4% de abundância relativa, mostrando as famílias que apresentam mais de 1% de abundância relativa na média das réplicas de pelo menos uma das amostragens (E, R e/ou S). Os asteriscos ao lado do nome das famílias indicam que há diferença estatística entre as amostras. Letras diferentes acima ou ao lado das barras de desvio padrão representam diferenças estatísticas significativas entre as amostras S, R e/ou E (Tukey, $p < 0,05$). Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* Microsoft Excel. 32
- Figura 13.** Abundância relativa média de 20 gêneros bacterianos identificados através do sequenciamento de parte do gene *rrs* nas regiões endofítica (E – verde), rizosférica (R – laranja) e no solo não-rizosférico (S – azul) associados à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Em **a** – até 40% de abundância relativa; em **b** – até 7% de abundância relativa e em **c** – até 3% de abundância relativa, mostrando os gêneros que apresentam mais de 0,75% de abundância relativa na média das réplicas de pelo menos uma das amostragens (R, S e/ou E). Os asteriscos ao lado do nome das espécies indicam que há diferença estatística. Letras diferentes acima ou ao lado das barras de desvio padrão representam diferenças estatísticas significativas entre as amostras S, R e/ou E (Tukey, $p < 0,05$). Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* Microsoft Excel. 33

Figura 14. Abundância relativa do gênero *Ralstonia* associada à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) e identificada através do sequenciamento de parte do gene *rrs* da comunidade bacteriana total. Em **a** – um *boxplot* mostrando a distribuição de cada amostra em relação à abundância relativa de *Ralstonia* nas regiões endofítica (E – verde), rizosférica (R – vermelho) e no solo não-rizosférico (S – azul). Letras diferentes acima das barras de desvio padrão representam diferenças estatísticas significativas entre as amostragens (Tukey, $p < 0,05$). Em **b** – um gráfico mostrando uma possível correlação negativa entre a abundância relativa de *Ralstonia* em R e em E. Coeficiente de correlação de Pearson $r = -0,91436$. Fonte: figura de autoria própria gerada nos *softwares* PAST v4.02 (**a**) e Microsoft Excel (**b**). 34

Figura 15. Análise LEfSe (*Linear discriminant analysis Effect Size*) mostrando os táxons significativamente mais enriquecidos na comunidade bacteriana da região rizosférica (R – vermelho) e no solo não-rizosférico (S – azul) associada à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Cada bola representa um nível taxonômico e bolas sem coloração vermelha ou azul não apresentam resultados significativos. Fonte: figura de autoria própria gerada com auxílio da plataforma Huttenhower Lab no servidor Galaxy Community Hub e editada no *software* Inkscape. 36

Figura 16. Análise LEfSe (*Linear discriminant analysis Effect Size*) mostrando os táxons significativamente mais enriquecidos na comunidade bacteriana da região endofítica (E – verde) e no solo não-rizosférico (S – azul) associada à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Cada bola representa um nível taxonômico e bolas sem coloração verde ou azul não apresentaram um impacto significativo. Fonte: figura de autoria própria gerada com auxílio da plataforma Huttenhower Lab no servidor Galaxy Community Hub e editada no *software* Inkscape. 36

Figura 17. Análise LEfSe (*Linear discriminant analysis Effect Size*) mostrando os táxons significativamente mais enriquecidos na comunidade bacteriana das regiões endofítica (E – verde) e rizosférica (R – vermelho) associadas à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Cada bola representa um nível taxonômico e bolas sem coloração vermelha ou verde não apresentaram um impacto significativo. Fonte: figura de autoria própria gerada com auxílio da plataforma Huttenhower Lab no servidor Galaxy Community Hub e editada no *software* Inkscape. 37

Figura 18. Percentual de estirpes isoladas do interior das raízes de capuchinha que apresentaram resultados positivos ou negativos nos testes para seleção de PGPB realizados. Em **a** – resultado de cada teste para as 236 estirpes, sendo eles: FCA – mineralização de fosfato orgânico; NBRIP – solubilização de fosfato inorgânico; CAS – produção de sideróforos; *nifH* – presença do gene *nifH*; SAMs – produção de substâncias antimicrobianas; CI – produção de compostos indólicos. Positivo significa que houve produção de halo (FCA, CAS, NBRIP, SAMs) ou presença da banda (*nifH*) ou mudança de coloração do meio para a cor rosa (CI). Fraco/forte em CI – intensidade da cor. Em SAMs, translúcido/turvo se referem ao halo. Inconclusivo em *nifH* – bandas inespecíficas, mas próximas a 394pb. Em **b** – é possível observar o número de estirpes que apresentaram resultados positivos em nenhum, um, dois, três, quatro, cinco ou seis (todos) testes realizados. As estirpes em verde (101 estirpes) foram positivas para pelo menos 4 dos 6 testes realizados. Dessas 101 estirpes, as duplicatas (morfologia colonial e resultados nos testes para seleção de PGPB iguais) foram excluídas,

totalizando 96 estirpes que tiveram seu DNA extraído e o gene *rrs* sequenciado para identificação molecular. Fonte: figura de autoria própria gerada no *Microsoft Excel* 39

Figura 19. Árvore filogenética das sequências de parte do gene *rrs* de 76 estirpes isoladas da capuchinha, incluindo os metadados associados aos testes para seleção de PGPB e a identidade de cada estirpe a nível de gênero. A árvore foi gerada utilizando o *software* MEGA 10 (método *Maximum Likelihood*, *bootstrap*=100) e os metadados foram incluídos utilizando a plataforma iTOL v6. Agrupamentos filogenéticos de maior similaridade foram reunidos com a mesma cor. Valores de *bootstrap* acima de 50% estão representados pelas bolas azuladas acima dos ramos filogenéticos. O resultado referente a intensidade da cor no teste CI (produção de compostos indólicos) está representado pelos quadrados e o teste para detecção da presença do gene *nifH* está representado pelos triângulos. Os diferentes tamanhos das bolas correspondem a variação no tamanho dos halos nos seguintes testes: FCA – mineralização de fosfato orgânico (bolas vermelhas); NBRIP – solubilização de fosfato inorgânico (bolas roxas); CAS – produção de sideróforos (bolas verdes) e SAMs – produção de substâncias antimicrobianas (bolas amarelas). Fonte: figura de autoria própria gerada na plataforma iTOL v6. 42

Figura 20. Árvore filogenética mostrando a similaridade das estirpes isoladas através do sequenciamento de parte do gene *rrs*, comparando com as sequências das estirpes de maior identidade depositadas no banco de dados RDP (*Ribosomal Database Project*) e BLASTn. As bolas laranjas destacam as estirpes isoladas e os colchetes enfatizam a classificação taxonômica mais provável das estirpes. Os clados referentes às estirpes que apresentaram similaridade com a família Enterobacteriaceae foram colapsados nesta figura. A análise foi gerada utilizando o *software* MEGA 10, com o método *Maximum likelihood* e com um *bootstrap* de 500. Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* MEGA 10. 45

Figura 21. Árvore filogenética mostrando a similaridade das estirpes isoladas através do sequenciamento de parte do gene *rrs*, comparando com as sequências das estirpes de maior identidade depositadas no banco de dados RDP (*Ribosomal Database Project*) e BLASTn. As bolas laranjas destacam as estirpes isoladas e os colchetes enfatizam a classificação taxonômica mais provável das estirpes. Com exceção do gênero *Serratia*, os clados referentes às estirpes que apresentaram uma maior similaridade com a família Enterobacteriaceae estão em evidência nesta figura e os demais clados estão colapsados. A análise foi gerada utilizando o *software* MEGA 10, com o método *Maximum likelihood* e com um *bootstrap* de 500. Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* MEGA 10. 46

Figura 22. Árvore filogenética mostrando a similaridade das estirpes isoladas através do sequenciamento de parte do gene *rrs*, comparando com as sequências das estirpes de maior identidade depositadas no banco de dados RDP (*Ribosomal Database Project*) e BLASTn. As bolas laranjas destacam as estirpes isoladas e os colchetes enfatizam a classificação taxonômica mais provável das estirpes. A figura evidencia os dois agrupamentos com similaridade a espécies do gênero *Serratia* e os demais agrupamentos foram ocultados. A análise foi gerada utilizando o *software* MEGA 10, com o método *Maximum likelihood* e com um *bootstrap* de 500. Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* MEGA 10. 47

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1. Análise físico-química de uma amostra composta do solo rizosférico e do solo não-rizosférico. | 15 |
| Tabela 2. Alfa-diversidade da comunidade bacteriana total das amostras da região endofítica (E), rizosférica (R) e do solo não-rizosférico (S) avaliadas a partir do sequenciamento em larga escala de parte do gene <i>rrs</i> . Entre parênteses: desvio padrão considerando as réplicas. Letras iguais ao lado dos valores indicam que não há diferença estatística entre as amostras; letras diferentes indicam que há diferença estatística. Teste de Tukey, $p < 0,05$ | 27 |
| Tabela 3. Identificação molecular a partir do sequenciamento do gene <i>rrs</i> de 76 estirpes bacterianas isoladas de <i>Tropaeolum majus</i> L. (capuchinha) a nível de filo, família e gênero. | 40 |

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

16S rRNA – RNA ribossomal 16S

AIA – Ácido Indolacético

BBWV1 – *Broad bean wilt virus*

BITC – Benzil-isotiocianato

BLASTn – *Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*

BYMV – *Bean yellow mosaic virus*

CAS – sigla atribuída ao teste realizado para detectar a produção de sideróforos

CI – Compostos Indólicos

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FBN – Fixação Biológica de Nitrogênio

FCA – sigla atribuída ao teste realizado para detectar a mineralização de fosfato orgânico

IBRA – Instituto Brasileiro de Análises

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia

INT – Instituto Nacional de Tecnologia

ISQ – Isoquercetina

ITCs – Isotiocianatos

LefSe – *Linear discriminant analysis Effect Size*

NasMV – *Nasturtium mosaic potyvirus*

NBRIP – sigla atribuída ao teste realizado para detectar a solubilização de fosfato inorgânico

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NMDS – *Non-Metric Dimensional Scaling*

OTUs – *Operational Taxonomic Unit*

PANC – Plantas Alimentícias Não-Convencionais

pb - pares de base

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)

PGPB – *Plant Growth Promoting Bacteria* (Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas)

PSEQDNA – Plataforma de Sequenciamento de DNA

RDP – *Ribosomal Database Project*

RSSC – *Ralstonia solanacearum species complex*

SAMs – Substâncias Antimicrobianas

TBE - Tris, Ácido Bórico e EDTA

TSA – TSB adicionado de 1,5% de ágar

TSB – *Trypticase Soy Broth*

TuMV – *Turnip mosaic virus*

UV – Ultravioleta

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| AGRADECIMENTOS | v |
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABELAS | xii |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS | xiii |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Plantas Alimentícias Não-Convencionais (PANC) | 1 |
| 1.2 A capuchinha (<i>Tropaeolum majus</i> L.) | 3 |
| 1.3 Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPB – <i>Plant Growth Promoting Bacteria</i>) | 8 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 11 |
| 3 OBJETIVOS | 12 |
| 3.1 Objetivo geral | 12 |
| 3.2 Objetivos específicos | 12 |
| 4 METODOLOGIA | 13 |
| 4.1 Amostragem | 13 |
| 4.2 Desinfecção das raízes e isolamento de bactérias endofíticas | 15 |
| 4.3 Extração do DNA total das amostras da região endofítica, rizosférica e do solo não-rizosférico..... | 16 |
| 4.4 Análise da comunidade bacteriana total através do sequenciamento em larga escala de parte do gene <i>rrs</i> | 17 |
| 4.5 Seleção de PGPB do interior das raízes da capuchinha | 18 |
| 4.5.1 Teste de produção de compostos indólicos (CI) | 20 |
| 4.5.2 Teste de mineralização de fosfato orgânico (FCA) e solubilização de fosfato inorgânico (NBRIP) | 21 |
| 4.5.3 Teste de produção de sideróforos (CAS) | 21 |
| 4.5.4 Teste de produção de substâncias antimicrobianas (SAMs) | 22 |
| 4.5.5 Teste de amplificação do gene <i>nifH</i> por PCR | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 4.5.6 Extração do DNA das estirpes selecionadas | 24 |
| 4.5.7 Sequenciamento de parte do gene <i>rrs</i> das PGPB selecionadas | 24 |
| 4.5.8 Análise filogenética | 25 |
| 4.6 Comparação entre a composição da comunidade bacteriana total endofítica e as estirpes isoladas da região endofítica da capuchinha | 26 |
| 5 RESULTADOS | 27 |
| 5.1 Análise da comunidade bacteriana total das regiões endofítica, rizosférica e do solo não-rizosférico através do sequenciamento em larga escala de parte do gene <i>rrs</i> | 27 |
| 5.2 Seleção e identificação de PGPB..... | 38 |
| 5.3 Comparação entre a composição da comunidade bacteriana total endofítica e as estirpes isoladas da região endofítica da capuchinha | 48 |
| 6 DISCUSSÃO | 50 |
| 7 CONCLUSÕES | 59 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas Alimentícias Não-Convencionais (PANC)

É estimado que existam aproximadamente 382 mil espécies de plantas no mundo, das quais apenas 6 mil são consideradas comestíveis. Dessas 6 mil espécies de plantas, menos de 200 são produzidas em larga escala pelas agroindústrias de todo o mundo e apenas 9 espécies representam mais de 66% da produção mundial (BÉLANGER & PILLING, 2019). Essa limitação na diversidade de espécies de plantas alimentícias comercializadas pela agroindústria ocorre principalmente devido à utilização de sistemas de monocultura para o plantio agrícola (CREWS, CARTON & OLSSON, 2018). O sistema de monocultura é de fácil manejo e facilita o investimento em tecnologias agrícolas, como o melhoramento genético de plantas, com o objetivo final de maximização da produtividade e do lucro (CREWS, CARTON & OLSSON, 2018).

Em contrapartida, a expansão da agricultura tornou necessária a utilização de agrotóxicos, que pode acarretar danos à saúde humana e impactos ao meio ambiente (LOPES & ALBUQUERQUE, 2018). Além disso, tanto o melhoramento genético de plantas quanto a utilização desenfreada de agrotóxicos resultam no aumento do preço dos alimentos e torna-os cada vez mais inacessíveis para aqueles que são economicamente desprovidos (SANTOS & GLAASS, 2018). Tendo em vista o domínio da agroindústria sobre a disposição e o acesso aos alimentos, é necessário explorar alternativas a fim de garantir a soberania e a segurança alimentar da população, ou seja, o direito individual de acesso a uma maior diversidade de alimentos ricos nutricionalmente e que não comprometam a saúde do consumidor (CHONCHOL, 2005). Nesse contexto, o plantio e consumo de Plantas Alimentícias Não-Convencionais (PANC) são uma alternativa que pode garantir a segurança e a soberania alimentar da população, conforme será elucidado a seguir.

As PANC são caracterizadas por possuírem pelo menos uma fração comestível – raízes, caule, folhas, flores e/ou sementes – e podem ser espontâneas, cultivadas, nativas ou exóticas (KINUPP & BARROS, 2007). Essas hortaliças não fazem parte do cardápio cotidiano da população como um todo, pois são desconhecidas ou deixaram de ser consumidas ao longo dos anos (LIBERATO, TRAVASSOS & SILVA, 2019). Normalmente, as PANC estão vinculadas a uma tradição culinária regional. A ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*), por exemplo, por possuir alto índice proteico e fazer parte da produção agrícola local, é consumida diariamente em algumas cidades de Minas Gerais (KINUPP, 2009). Entretanto, sua distribuição é limitada

pelo Brasil e essa hortaliça não faz parte da alimentação popular de forma homogênea. Segundo Kinupp e Lorenzi (2014), outros exemplos de PANC que podem ser citados são: peixinho (*Stachys byzantina*), bortalha (*Basella alba*) e caruru (*Amaranthus* spp.).

As PANC são geralmente mais ricas em minerais, proteínas e antioxidantes que as hortaliças consideradas convencionais (KINUPP & BARROS, 2008). Além disso, essas hortaliças possuem um baixo custo de produção, são de fácil propagação e são adaptáveis às diversas condições de plantio (MAPA, 2010). Portanto, as PANC também podem ser uma importante fonte de renda para pequenos e médios produtores rurais e estão presentes principalmente nas fazendas de cultivo orgânico (KINUPP & LORENZI, 2014).

A praticidade do cultivo e a manutenção das PANC as tornam uma alternativa para populações economicamente desprovidas. Em 2017, Abreu e Diniz ressaltaram a necessidade da introdução de plantas não-convencionais na alimentação de beneficiários do bolsa família, destacando os benefícios nutricionais na infância e a possibilidade de substituição das hortaliças convencionais de maior custo. Um estudo conduzido em Bangladesh observou que o consumo de PANC em épocas de escassez de arroz – que representa a base da alimentação da população mais pobre – parece estar relacionado à ausência de mortes associadas à inanição (BISWAS & RAHMATULLAH, 2011). Para a sociedade de uma forma geral, o estudo e a divulgação de informações em relação às PANC incentivam a redução do consumo de alimentos industrializados, estimulando dietas mais saudáveis (SALVI & KATEWA, 2016).

É essencial incentivar estudos etnobotânicos para resgatar ou descobrir plantas alimentícias não-convencionais. Dessa forma, será possível evitar o processo de extinção de espécies e apresentar à população alternativas viáveis para a alimentação cotidiana. Além disso, a disseminação de informações sobre as PANC permite a preservação da cultura de populações tradicionais, como os indígenas e moradores de zonas rurais, visto que, nesse caso, o conhecimento se dissemina principalmente de forma hereditária (ABREU & DINIZ, 2017). Ainda, o desenvolvimento de pesquisas científicas voltado para hortaliças não-convencionais permite a valorização da diversidade de espécies nacionais e a possível descoberta de novos componentes bioativos, como por exemplo, substâncias que possam ser utilizadas como fitofármacos, conforme será discutido no próximo item.

1.2. A capuchinha (*Tropaeolum majus* L.)

Tropaeolum majus L., popularmente conhecida como capuchinha, é uma planta da família Tropaeolaceae, originária da América do Sul. A capuchinha é considerada uma PANC, possui propriedades medicinais amplamente exploradas e apresenta importância crescente na culinária. Quando associada a outras espécies de plantas, a capuchinha também pode ser vantajosa para a agricultura pois pode repelir pragas e é capaz de manter a umidade do solo (REIS, 2006). A capuchinha é uma hortaliça trepadeira de fácil adaptação ao clima tropical e de crescimento anual.

A capuchinha possui cerca de 0,45 metros de altura média – podendo chegar até 2 metros – e o cultivo em campo desta planta deve respeitar um espaçamento de pelo menos 0,4 metros entre elas para o melhor desenvolvimento da planta (FERREIRA, VIEIRA & ZÁRETE, 2004). Além disso, a capuchinha apresenta folhas arredondadas de coloração verde escura, que podem variar de 5 a 10 cm (BUTNARIU & BOSTAN, 2010). As raízes dessa planta são fibrosas, o caule é retorcido e pode possuir coloração arroxeada (**Figura 1c e d**). As flores de capuchinha são hermafroditas, possuem florescimento perene (SILVA, 2012) e podem apresentar coloração laranja, amarela ou avermelhada (**Figura 1a e b**). Essa hortaliça não necessita de solo rico em nutrientes e cresce bem em sol pleno ou parcial (REIS, 2006).

A popularização da capuchinha vem ocorrendo nos últimos anos devido à relevância culinária de suas flores, que são comestíveis. Apesar do consumo de flores ser comum em outros continentes, o mesmo não ocorre na América do Sul (RODRIGUES *et al.*, 2017). Entretanto, a globalização da informação tem permitido que o consumidor aprenda a diferenciar as flores comestíveis das tóxicas e, assim, aumentando o consumo da capuchinha.

De uma forma geral, as flores comestíveis (incluindo as da capuchinha) apresentam um alto índice de antioxidantes e anti-inflamatórios em sua composição e podem ser, além de nutritivas, medicinais (MLCEK & ROP, 2011). Além disso, não só as flores da capuchinha são comestíveis, e sim toda a planta, que possui sabor acre, picante e adocicado. Comumente, as flores são servidas em saladas frescas e as sementes (que possuem sabor similar ao da alcaparra) são utilizadas para a produção de compotas (GOLZE & SOUZA, 2009).

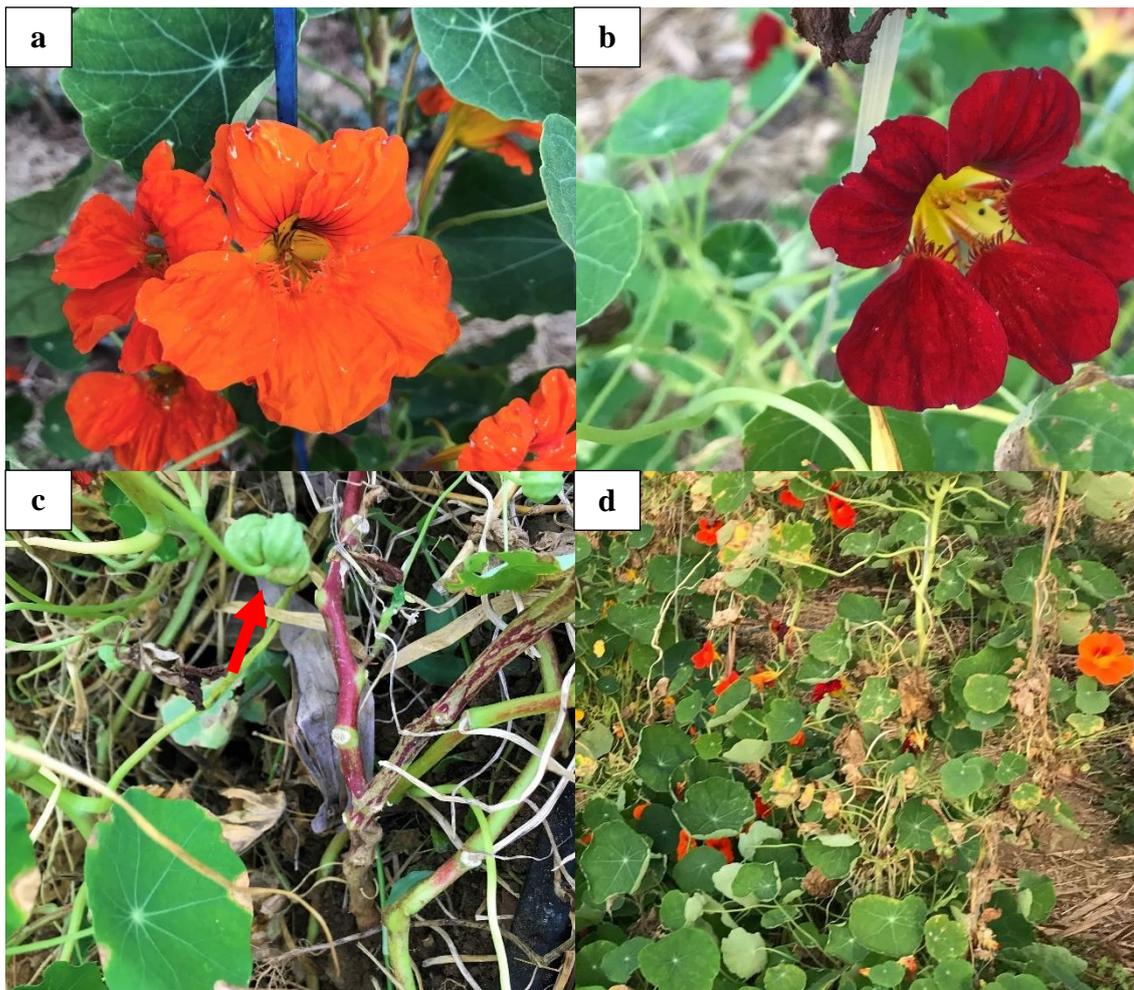


Figura 1. Características visuais da capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) em uma plantação em Nova Friburgo, Rio de Janeiro. As diferentes plantas apresentavam flores laranjas (a) e vermelhas (b). É possível observar o caule de coloração verde arroxeada, fino, retorcido e a presença de sementes de capuchinha, indicada pela seta vermelha (c). Ainda, é possível notar as folhas arredondadas e o crescimento desordenado da capuchinha (d). Fonte: compilado de imagens do acervo pessoal, figura de autoria própria.

As propriedades medicinais presentes na capuchinha são reconhecidas na medicina alternativa. Os principais empregos envolvendo o extrato da planta estão na aplicação como antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante (BUTNARIU & BOSTAN, 2010). Por ser rica em vitamina C, a capuchinha também é popularmente utilizada como antiescorbútica e o consumo do chá pode auxiliar na prevenção de queda de cabelo (REIS, 2006). Além disso, o macerado das folhas dessa planta também pode ser utilizado para o tratamento de doenças cutâneas e para cicatrização de ferimentos (BRONDANI *et al.*, 2016).

Apesar do mecanismo de ação medicinal da planta não ser totalmente elucidado, diversos benefícios da utilização da planta são descritos e relacionados aos aparelhos digestivo, cardiovascular, pulmonar e urinário. A fim de compreender melhor os compostos presentes nos

extratos de capuchinha e a sua atividade como planta medicinal, foram desenvolvidos diversos estudos que serão descritos a seguir. Entre os principais componentes químicos isolados, os mais relevantes são os ácidos graxos e os compostos fenólicos (BRONDANI *et al.*, 2016).

O óleo produzido a partir das sementes de capuchinha apresenta compostos fenólicos como taninos, tiossulfinaos e flavonoides (FERREIRA, VIEIRA & ZÁRETE, 2004). Os taninos levam à formação de um complexo responsável pela rápida e eficiente cicatrização de tecidos; já o tiossulfinao possui atividade antibiótica e anti-inflamatória (BUTNARIU & BOSTAN, 2010).

A ação antioxidante dos extratos de capuchinha está relacionada à presença de ácido ascórbico e flavonoides, como isoquercetina (ISQ) e kaempferol, que previnem a degeneração celular e eliminam radicais livres (BRONDANI *et al.*, 2016). Essa atividade antioxidante dos extratos da capuchinha se dá de forma dose-dependente em neutrófilos humanos (BAZYLKO *et al.*, 2013). Além disso, a administração oral dos extratos hidroetanólicos de capuchinha em camundongos não apresenta toxicidade aguda, mesmo em altas doses (ZANETTI *et al.*, 2003).

O flavonóide ISQ é um dos principais e um dos mais explorados componentes presente nos extratos de capuchinha. Em 2012, Gasparotto Junior e colaboradores caracterizaram o mecanismo pela qual o componente ISQ é capaz de causar diurese em camundongos e, conseqüentemente, levar à redução da hipertensão. Portanto, acredita-se que os extratos de capuchinha possam ser utilizados em humanos para tratamento de doenças cardiovasculares onde há necessidade de aumento da diurese.

Outros compostos fenólicos de relevância encontrados nos extratos de capuchinha são os glicosinolatos e isotiocianatos. Os glicosinolatos são responsáveis pelo sabor picante da planta e estão presentes em altas concentrações, principalmente nas folhas (GARZÓN & WROLSTAD, 2009). Quando ocorre um acúmulo de glicosinolatos na planta, estes transformam-se em isotiocianatos (ITCs) através da hidrólise pela enzima mirosinase. Em 1995, Pintão e colaboradores constataram que a substância benzil-isotiocianato (BITC), isolada dos extratos de capuchinha, apresentava efeito citotóxico contra células tumorais. O composto atua de forma rápida e os efeitos do tratamento são duradouros. Além da função antitumoral, o BITC também está associado à função de detoxificação, anti-helmíntica e antimicrobiana (PINTÃO *et al.*, 1995).

Alguns ácidos graxos essenciais também foram isolados dos extratos de capuchinha. O ácido oleico, conhecido como ômega 9, possui ação antioxidante e auxilia na síntese de hormônios em humanos. Além disso, o ácido linoleico, conhecido como ômega 6, também foi isolado e está relacionado à síntese de membranas celulares. Ambos os ácidos graxos encontrados nos extratos de capuchinha podem ajudar a prevenir doenças cardiovasculares e possuem ação anti-inflamatória (BRONDANI *et al.*, 2016).

Além da relevância como planta medicinal e na gastronomia, a capuchinha também possui aplicabilidade na agricultura. A prática de cultivo de plantas em consórcio, que tem se popularizado na agricultura convencional e orgânica, consiste no plantio de diferentes espécies de plantas em uma mesma área. Com isso, há uma redução na erosão do solo – devido a maior cobertura do mesmo pelas plantas – e há a possibilidade de maior produtividade, já que melhora a fertilidade do solo (BÉLIVEAU *et al.*, 2017). Em 2020, Schulz e colaboradores observaram que o plantio em consórcio de milho e capuchinha pode ser utilizado como uma alternativa à monocultura de milho. Nesse caso, a produtividade e a qualidade da biomassa do milho se mantêm, enquanto as flores da capuchinha funcionam como polinizadoras e podem ser comercializadas. Além disso, Formagio e colaboradores (2011) verificaram que extratos metanólicos da folha dessa hortaliça apresentavam atividade fitotóxica *in vitro* contra a planta daninha conhecida como picão-preto (*Bidens pilosa L.*). Dessa forma, os extratos da capuchinha possuem potencial para serem utilizados como substitutos aos métodos químicos de controle a ervas daninhas.

Ainda, a capuchinha apresenta a capacidade de repelir pragas, como pulgões, e melhorar o crescimento de outras plantas, como repolho e tomate (MAPA, 2010). Em 1984, Corrêa relatou que a capuchinha possui atividade fitoprotetora quando associada ao plantio de macieiras (*Mallus comunis*). Por isso, a utilização dessa hortaliça na agricultura é relevante para hortas orgânicas, visto que reduz a necessidade de utilização de agroquímicos.

Entretanto, como outras plantas, a capuchinha é susceptível a alguns fitopatógenos. Como existe uma escassez de estudos na literatura, pouco se conhece sobre os mecanismos pelos quais os microrganismos fitopatogênicos afetam a capuchinha. Em 2010, Russomanno & Kruppa relataram que o fungo *Colletotrichum* sp. é capaz de causar antracnose nas folhas de capuchinha. Nesse caso, o fungo leva à formação de manchas escurecidas nas folhas que, conseqüentemente, interferem na fotossíntese e afetam o desenvolvimento da planta, podendo levá-la à morte.

Outras doenças causadas por vírus também já foram relatadas acometendo plantas de capuchinha, como por exemplo: NasMV (*Nasturtium mosaic potyvirus*) (GRAÇA & BUDNIK, 1993), BBWV1 (*Broad bean wilt virus*) (FROWD & TOMLINSON, 1972), BYMV (*Bean yellow mosaic virus*) (SCHULZE, ROBERTS & PIETERSEN, 2017) e TuMV (*Turnip mosaic virus*) (MAMULA & LJUBESIC, 1975). Esses vírus são transmitidos por diferentes tipos de afídeos, são majoritariamente inespecíficos e se disseminam facilmente entre diferentes espécies de plantas. Os sintomas observados nessas viroses são a formação de um mosaico nas folhas (manchas amareladas na forma de *spots*), deformação das folhas e flores, clareamento de nervuras e formação de anéis necróticos. Os sintomas em conjunto resultam em um mal desenvolvimento da planta e também podem levá-la à morte.

Ademais, estudos mostram que a capuchinha pode ser suscetível à infecção pelo fitopatógeno *Ralstonia solanacearum* na natureza (OLSSON, 1976; PRADHANANG, ELPHINSTONE & FOX, 2000). Através de contaminações artificiais por irrigação ou inóculo direto do fitopatógeno, os estudos relatam que há o aparecimento de sintomas característicos à doença causada por *R. solanacearum*, popularmente conhecida como murcha bacteriana. Dentre os possíveis sintomas, é observada a murcha e amarelamento das folhas jovens, formação de lesões necróticas, podridão mole e, por fim, o colapso da planta. Entretanto, até o presente momento, não foram descritos na literatura casos de infecção natural da capuchinha por *R. solanacearum*.

Apesar da crescente utilização da capuchinha como planta alimentícia e do crescente interesse pelas suas propriedades medicinais, a microbiota associada a ela ainda é desconhecida e inexplorada. Microrganismos associados à rizosfera e presentes no interior da planta podem conferir benefícios, como a proteção contra fitopatógenos e o melhoramento na disponibilidade de nutrientes para a planta (BABALOLA, 2010). Além disso, essa microbiota pode estar diretamente envolvida com a produção de compostos de interesse medicinal e/ou industrial através da produção de metabólitos secundários (SILVA *et al.*, 2011). Assim sendo, a seleção de bactérias promotoras de crescimento de plantas (PGPB, do inglês, *Plant Growth Promoting Bacteria*) é de grande relevância, permitindo o desenvolvimento de um possível bioinoculante para capuchinha. O uso de bactérias associadas à capuchinha poderá contribuir para uma agricultura mais sustentável, favorecendo a fertilidade do solo e minimizando ainda mais a utilização de agroquímicos (BABALOLA, 2010).

1.3. Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (PGPB – *Plant Growth Promoting Bacteria*)

A comunidade bacteriana associada a qualquer planta é diversa, dinâmica e pode afetar diretamente a saúde de seu hospedeiro. Essa interação ocorre na região mais superficial da planta (epifítica), no interior dos tecidos (endofítica) e no solo associado à raiz (rizosférica). A interação bactéria-planta na região rizosférica é complexa devido à liberação de exsudatos pela raiz. Esses exsudatos são ricos em nutrientes, estimulam a quimiotaxia de microrganismos e favorecem a proliferação destes nesta região (GLICK, 2012). Já na região endofítica, é observada a formação de um subconjunto de microrganismos provenientes principalmente da região rizosférica. A interação entre os microrganismos endofíticos e a planta é considerada mais eficiente do que a interação com os microrganismos rizosféricos (CHEN *et al.*, 2010; SANTOYO *et al.*, 2016). Além disso, diferentes bactérias associadas a plantas também liberam compostos bioativos que podem favorecer o desenvolvimento e/ou a resistência da planta, sendo conhecidas como PGPB.

As PGPB podem promover o crescimento da planta através de mecanismos diretos e indiretos. Os mecanismos diretos favorecem a disponibilidade de nutrientes e/ou modulam os níveis hormonais da planta, como por exemplo, através da fixação de nitrogênio, da mineralização de fosfato orgânico e solubilização de fosfato inorgânico, da produção de sideróforos e da produção de ácido indolacético (GLICK, 2012). Já os mecanismos indiretos podem estar associados ao desenvolvimento de resistência e/ou tolerância a fitopatógenos e a diferentes condições de estresse (STAMENKOVIC *et al.*, 2018).

As bactérias capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) – também chamadas de bactérias diazotróficas – podem ser de vida livre, associativas ou simbióticas. As bactérias associativas podem ser endofíticas obrigatórias e colonizar estritamente o interior da planta – como ocorre em espécies diazotróficas dos gêneros *Gluconacetobacter*, *Burkholderia* e *Erwinia* – ou podem ser endofíticas facultativas e colonizar tanto a rizosfera quanto o interior da planta, como ocorre em espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Bacillus* e *Paenibacillus*. Já as bactérias simbióticas, podem desenvolver uma estrutura de nódulo radicular que favorece a eficiência da FBN, como ocorre nas leguminosas. Nesses casos, as PGPB carregam a maquinaria enzimática necessária para realização da FBN, codificada pelos genes *nif*, e são capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico (N₂) a formas metabolicamente

viáveis para as plantas. Além disso, as bactérias fixadoras de nitrogênio são essenciais para o ciclo do nitrogênio (CASSETARI, GOMEZ & SILVA, 2016).

Apesar dos solos serem geralmente ricos em fósforo, a assimilação desse composto pelas plantas é bastante difícil, pois está presente no ambiente nas formas insolúveis de fosfato orgânico e inorgânico. As PGPB podem possuir as enzimas fosfatases capazes de mineralizar o fosfato orgânico – transformando-o em fosfato inorgânico – e solubilizar o fosfato inorgânico do solo, para que esse composto possa ser utilizado pelas plantas (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999). Além disso, a forma abundante do ferro na natureza – Fe(III) – também é pouco solúvel, o que dificulta a assimilação desse composto pelas plantas. As PGPB podem produzir sideróforos, que possuem alta afinidade pela molécula de Fe(III). A síntese de sideróforos pelas bactérias permite que ocorra a solubilização e o sequestro de ferro do ambiente e, dessa forma, disponibilizando essa substância para a planta (LOPER & BUYER, 1991).

A comunidade bacteriana também pode modular alguns hormônios vegetais e induzir o crescimento de plantas, mesmo em situações de estresse. O fitormônio ácido indolacético (AIA) possui diversas funções bem elucidadas, associadas à regulação da divisão e à diferenciação celular (GLICK, 2012). Algumas PGPB que produzem AIA são responsáveis pela extensão e ramificação das raízes – o que favorece a absorção de nutrientes – e pelo aumento da liberação de exsudatos na região rizosférica (SPAEPEN, VANDERLEYDEN & REMANS, 2007).

Entre os mecanismos indiretos, a síntese de antimicrobianos e enzimas líticas pelas PGPB pode interferir na proliferação de fungos fitopatogênicos na planta (STAMENKOVIC *et al.*, 2018). Além disso, essas bactérias podem induzir a expressão de genes de resistência na planta (ISR, do inglês *Induced Systematic Resistance*) como uma forma de biocontrole (BENEDUZI, AMBROSINI & PASSAGLIA, 2012).

A produção de compostos pelas PGPB, como sideróforos e AIA, leva a um reconhecimento por receptores presentes na raiz da planta e, conseqüentemente, ativa uma cascata de sinalização interna. Em seguida, no interior das células vegetais, são ativadas as vias do ácido jasmônico e do etileno, que acarreta a ativação de um gene responsável pela produção da proteína NPR1, envolvida na indução de resistência sistêmica na planta (ANNAPURNA *et al.*, 2013). Uma vez induzida, ocorre uma redução na gravidade e na incidência de doenças nessas plantas (VAN LOON, BAKKER & PIETERSE, 1998).

Além disso, a comunidade bacteriana, através do seu metabolismo, pode alterar a composição de moléculas no solo e reduzir o excesso de contaminantes presentes no ambiente, atuando como agentes biorremediadores. Indiretamente, essas bactérias podem melhorar a qualidade nutricional do solo e favorecer o crescimento das plantas (STAMENKOVIC *et al.*, 2018).

Por fim, o estudo da comunidade bacteriana nos dá subsídios para a seleção de uma estirpe ou um consórcio de estirpes com características de PGPB e com potencial para aplicação biotecnológica na agricultura (JIMÉNEZ-GÓMEZ *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021; MAY *et al.*, 2021). Nesse contexto, os bioinoculantes são produtos biotecnológicos que possuem um ou mais microrganismos em sua composição e que, quando aplicados à cultura agrícola, conseguem colonizar as plantas e conferir benefícios associados ao biocontrole, à fertilização e/ou à fitoestimulação (BASU *et al.*, 2021). Atualmente, existem diversos produtos no mercado com diferentes finalidades e que podem ser utilizados em pelo menos um tipo de cultivo agrícola.

Entre os bioinoculantes de relevância no mercado internacional, é possível citar o Cedomon[®], que possui em sua composição uma estirpe de *Pseudomonas chlororaphis* e é eficiente no biocontrole de diversos fitopatógenos que afetam o cultivo de cereais, como cevada e aveia (BASU *et al.*, 2021). Um outro exemplo é o bioinoculante BIOAGRO[™] NG que é utilizado em cultivos de soja no Brasil e possui em sua composição duas estirpes das espécies *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium diazoefficiens*, que são estirpes fixadoras de nitrogênio (URIBE *et al.*, 2010). Esses produtos podem resultar em uma redução na utilização de agrotóxicos em cultivos agrícolas tradicionais e são de extrema importância para a agricultura orgânica. Apesar do desenvolvimento de um bioinoculante a partir de um consórcio bacteriano ser um processo complexo, pode contribuir indubitavelmente para uma agricultura mais ecológica e sustentável.

2. JUSTIFICATIVA

A busca da população por alimentos saudáveis, de baixo custo e orgânicos faz com que as PANC se tornem de grande interesse. Estas possuem diversos benefícios, como no auxílio ao combate à subnutrição e pela sua fácil adaptabilidade ao ambiente.

Entre as PANC de destaque no Brasil, encontramos a capuchinha (*Tropaeolum majus* L.), uma planta trepadeira, versátil e de fácil propagação. Além de ser utilizada para projetos de paisagismo pelas suas flores vistosas, toda a planta é comestível e consumida em saladas frescas. A capuchinha também possui propriedades medicinais exploradas pela medicina alternativa. Na literatura, diversos compostos isolados dos extratos de capuchinha foram associados a atividades antioxidante, anti-hipertensiva, antimicrobiana e anti-inflamatória. Na agricultura, a capuchinha pode ser utilizada para o controle de ervas daninha, pragas e para a manutenção da umidade do solo.

Apesar do crescente interesse pela capuchinha, são poucos os estudos relacionados a essa planta. Diversas fitopatologias podem afetar a capuchinha e se disseminar para as plantações adjacentes. PGPB associadas à capuchinha poderiam auxiliar o seu crescimento e protegê-las contra patógenos. As PGPB atuam através de mecanismos diretos e indiretos, que envolvem a fixação biológica de nitrogênio, a produção de fitormônios, a produção de substâncias antimicrobianas, a indução de ISR (Resistência Sistêmica Induzida), entre outros. Entretanto, a microbiota associada a essa planta ainda é praticamente inexplorada.

Com o conhecimento sobre a comunidade bacteriana associada à capuchinha, poderemos sugerir um consórcio bacteriano com potencial de promoção de crescimento e/ou atividade contra fitopatógenos, permitindo o futuro desenvolvimento de um bioinoculante. Dessa forma, estaremos contribuindo para uma agricultura mais sustentável.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente trabalho visa caracterizar a comunidade bacteriana total associada à rizosfera, à região endofítica e ao solo não-rizosférico de *Tropaeolum majus* L. Além disso, pretendemos isolar e identificar PGPB, a partir das amostras da região endofítica, fornecendo subsídios para o desenvolvimento futuro de um bioinoculante.

3.2. Objetivos específicos

- (i) Determinar a composição da comunidade bacteriana total da região endofítica, rizosférica e do solo não-rizosférico de capuchinha através do sequenciamento massivo de parte do gene que codifica o 16S rRNA (gene *rrs*);
- (ii) Isolar bactérias endofíticas de capuchinha e selecionar PGPB através de métodos dependentes de cultivo e moleculares;
- (iii) Identificar as PGPB selecionadas através do sequenciamento de parte do gene *rrs*;
- (iv) Comparar a composição da comunidade bacteriana total endofítica com as PGPB identificadas.

4. METODOLOGIA

4.1. Amostragem

A coleta das amostras foi realizada no dia 17 de outubro de 2019 no Sítio Cultivar, localizado em Nova Friburgo, Rio de Janeiro (coordenadas geográficas 22°17'51.4" Sul; 42°27'39.6" Oeste). O Sítio Cultivar possui produção orgânica de hortaliças, frutas e ovos, certificada pelo INT (Instituto Nacional de Tecnologia). A irrigação dos cultivos era realizada duas vezes ao dia utilizando um sistema de microaspersão e a adubação era feita de 3 em 3 meses utilizando o adubo orgânico fermentado Fert-Bokashi®, comercializado pela empresa Korin, que possui em sua composição um produto de fermentação de resíduos de origem vegetal e animal. Segundo o Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), o mês de outubro em Nova Friburgo apresentou uma precipitação média de 187mm. Esse mês demarca o início do período de chuvas, sendo os períodos de seca nos meses de junho, julho e agosto (precipitação média entre 56-60mm) e a maior precipitação média em dezembro (em média 429mm).

Na **Figura 2** podemos visualizar a área de coleta das plantas de capuchinha no Sítio Cultivar. Nessa região, o plantio de capuchinha era mantido em consórcio com o plantio de alface. Foi observado no momento da coleta que as plantas de capuchinha apresentavam formação de anéis necróticos foliares, se iniciando pela região mais externa da folha e avançando para o interior da mesma (**Figura 3**). Além disso, também foi observado o amarelamento e murcha das flores e folhas da capuchinha (**Figura 3**). Foi constatado pela agricultora local que os sintomas citados eram comuns ao plantio de capuchinha e não afetavam seu desenvolvimento e produção.

Foi feita a amostragem das raízes e do solo não-rizosférico associado à capuchinha. Cinco diferentes plantas de capuchinha, espaçadas entre si cerca de 2 metros, foram arrancadas com o auxílio de uma pá desinfetada com álcool 70%. Em seguida, as raízes foram agitadas manualmente e o solo restante aderido à superfície da raiz foi considerado o solo rizosférico. O solo não-rizosférico foi amostrado em cinco diferentes pontos de regiões localizadas entre as plantas, sendo coletado também com o auxílio de uma pá desinfetada com álcool 70% a cerca de 10-15cm de profundidade. No total, foram obtidas 5 amostras de raízes com solo rizosférico e 5 amostras de solo não-rizosférico. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e transportadas para o laboratório.



Figura 2. Área de plantio consorciado de alface e capuchinha no Sítio Cultivar em Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Fonte: acervo pessoal.



Figura 3. Formação de anéis necróticos foliares e murcha das folhas e flores de capuchinha no Sítio Cultivar em Nova Friburgo, Rio de Janeiro. Seta vermelha: murcha da folha; seta amarela: murcha da flor e seta azul: anéis necróticos na folha. Fonte: acervo pessoal.

Duas amostras compostas – uma do solo rizosférico (R) e outra do solo não-rizosférico (S) – foram enviadas para o IBRA (Instituto Brasileiro de Análises) para análise das características físico-químicas. Cada amostra composta foi feita contendo 50g de solo das 5 amostras coletadas de R ou S, totalizando 250g de R e 250g de S. A tabela abaixo mostra o resultado da análise das características físico-químicas. A textura do solo de ambas as amostras foi classificada como textura média (equilíbrio entre a composição de areia, silte e argila).

Tabela 1. Análise físico-química de uma amostra composta do solo rizosférico e do solo não-rizosférico.

| Características | Solo rizosférico | Solo não-rizosférico |
|--|-------------------------|-----------------------------|
| Teor de argila (g/kg) | 153 | 135 |
| pH (CaCl₂) | 5,6 | 5,5 |
| C total (%) | 2,0 | 2,4 |
| N total (%) | 0,245 | 0,398 |
| Proporção C:N | 8,16 | 6,03 |
| P disponível (mg/dm³) | 159 | 160 |
| H^o + Al³ (cmolc/dm³) | 1,9 | 2,2 |
| Al³ (cmolc/dm³) | 0 | 0 |
| Na (cmolc/dm³) | 0,21 | 0,18 |
| Ca (cmolc/dm³) | 7,2 | 8,2 |
| Mg (cmolc/dm³) | 2,3 | 2,3 |
| K (cmolc/dm³) | 0,6 | 0,19 |
| S (mg/dm³) | 36 | 6 |
| Fe (mg/dm³) | 29 | 23 |

4.2. Desinfecção das raízes e isolamento de bactérias endofíticas

Para cada uma das 5 plantas de capuchinha coletadas, aproximadamente 10g de raiz com solo rizosférico foram pesados em 5 diferentes erlenmeyers de 125ml. Uma alíquota de 500mg de solo rizosférico de cada uma das 5 plantas foi retirada com o auxílio de uma espátula estéril para a extração de DNA. Para a lavagem inicial das raízes, os erlenmeyers foram acrescidos de 15ml de salina estéril (0,85%) e incubados sob agitação (100rpm) a 28°C por uma hora, em incubadora shaker refrigerada Novatecnica™ NT715. Com o auxílio de uma pinça estéril, as raízes foram separadas do restante do lavado para desinfecção e isolamento de bactérias endofíticas.

Foram utilizadas 5g da raiz de cada uma das 5 plantas coletadas para o isolamento de bactérias endofíticas. A desinfecção das raízes foi realizada da seguinte forma: exposição à luz

UV por 40 minutos; imersão em álcool 70% por 4 minutos sob agitação (100rpm) em incubadora shaker refrigerada Novatecnica™ NT715 e imersão em hipoclorito de sódio 2,5% por 5 minutos sob agitação (100rpm), nas mesmas condições. Por fim, foram realizadas três lavagens subsequentes com água destilada estéril sob agitação (100rpm) por 10, 5 e 3 minutos, nas mesmas condições. Para verificar a eficiência da desinfecção das raízes, 100µl da água destilada estéril utilizada na última lavagem foram plaqueados em meio TSA (TSB – *Trypticase Soy Broth* – adicionado de 1,5% de ágar) em triplicata e as placas foram incubadas por 24 horas a 32°C. A ausência de crescimento bacteriano em TSA indicava a eficácia da desinfecção das raízes.

Após a desinfecção, as raízes das 5 plantas diferentes foram maceradas individualmente com 5µl de água destilada estéril em um pilão previamente esterilizado em autoclave (121°C, 15 min). Cada um dos 5 macerados foi diluído sucessivamente (de 10⁰ a 10⁻⁸) em salina estéril e 100µl de cada diluição foram plaqueados em meio TSA em triplicata. As placas foram incubadas a 32°C por até 5 dias para a seleção e isolamento das colônias. As estirpes foram selecionadas levando em consideração as diferenças morfológicas das colônias. Em cada planta, um mesmo morfotipo colonial foi isolado mais de uma vez quando possível. Posteriormente, as colônias isoladas foram estocadas em TSB contendo 10% de glicerol e conservadas a -80°C.

4.3. Extração do DNA total das amostras da região endofítica, rizosférica e do solo não-rizosférico

Foram pesadas alíquotas de 500mg de solo rizosférico (R) e do macerado das raízes (região endofítica – E) de cada uma das 5 plantas e 500mg do solo não-rizosférico (S) de cada um dos 5 pontos coletados, totalizando 15 amostras. Em seguida, a extração do DNA foi realizada através do método de lise direta, utilizando o protocolo do fabricante do kit comercial DNeasy PowerSoil (Qiagen®). Para quantificar o DNA (ng/µl após a extração, foi realizada a dosagem por fluorescência utilizando o Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific™, Waltham, MA, EUA). Ainda, a integridade do DNA foi verificada por uma eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo SYBR™ Safe DNA Gel Stain (3%), preparado em tampão TBE 1X (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989) por 2 horas a 80V. Ao final da corrida, o gel foi observado utilizando o aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System com o auxílio do software Image Lab™.

4.4. Análise da comunidade bacteriana total através do sequenciamento em larga escala de parte do gene que codifica o 16S rRNA (gene *rrs*)

Para a análise da comunidade bacteriana presente na região endofítica (E), rizosférica (R) e no solo não-rizosférico (S) foi utilizada a técnica de sequenciamento em larga escala realizada na plataforma Illumina MiSeq. O DNA extraído das 15 amostras (5 de E, 5 de R e 5 de S) foi enviado para a empresa Novogene (Sacramento, USA). A amplificação de parte do gene *rrs* foi realizada utilizando os iniciadores 515F (5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3') e 806R (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3'), conforme descrito por Caporaso e colaboradores (2010). A plataforma Illumina NovaSeq 6000 foi utilizada para o sequenciamento das amostras.

As análises de bioinformática foram realizadas para as 15 amostras sequenciadas utilizando o *software* Mothur v.1.43.0 (SCHLOSS *et al.*, 2009). As sequências *forward* e *reverse* obtidas no sequenciamento foram pareadas em *contigs* (*make.contigs*) e os códigos de barras e iniciadores foram removidos (*trim.seqs*). Em seguida, as sequências foram submetidas a um controle de qualidade inicial por meio de remoção de homopolímeros (≥ 8), remoção de ambiguidades, remoção de sequências com tamanhos inconsistentes e agrupamento de sequências idênticas. Posteriormente, foi realizado um alinhamento das sequências obtidas com as sequências previamente depositadas no banco de dados Silva v.138 (QUAST *et al.*, 2013) através de uma PCR virtual, utilizando os iniciadores 341F e 806R (TAKAHASHI *et al.*, 2014). Após a PCR, um segundo controle de qualidade foi realizado para determinação do tamanho das sequências (*screen.seqs* e *filter.seqs*), formação de pré-clusters (*pre.cluster*), remoção de sequências quiméricas (*chimera.vsearch*) e remoção de contaminantes (*remove.seqs*). Em seguida, foi realizada uma classificação utilizando no banco de dados RDP (*Ribosomal Database Project*; COLE *et al.*, 2009) e foram removidos possíveis contaminantes, como DNA mitocondrial, cloroplastos, arqueas, eucariotos e táxons desconhecidos (*cut off* = 80%). As sequências semelhantes foram classificadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs, do inglês *Operational Taxonomic Unit*) pelo comando *cluster.split* (*cut off* = 3%) e as sequências raras (*singletons*) foram retiradas (*cut off* = 1%). O tamanho das sequências foi normalizado com base na amostra que possuía o menor número de sequências.

Os dados gerados no *software* Mothur foram exportados incluindo os índices de alfa diversidade (Shannon e OTUs), a curva de rarefação e a abundância relativa taxonômica para comparação entre as 5 réplicas de cada amostragem (S, R e E). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* PAST v4.02 (HAMMER, HARPER & RYAN, 2001). Os

dados de diversidade e de abundância relativa taxonômica foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e, quando necessário, os dados foram transformados utilizando Box-Cox ou Log (LEGENDRE & BORCARD, 2018). Para a análise de dados normais (paramétricos) foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre as amostras foram analisadas pelo teste de Tukey (ABDI & WILLIAMS, 2010). Para as análises não paramétricas, foi realizado um teste Kruskal-Wallis e as diferenças entre as amostras foram observadas pelo teste U de Mann-Whitney (MCKIGHT & NAJAB, 2010). Quando necessário, gráficos do tipo *boxplot* foram gerados para avaliar a distribuição das réplicas entre as amostragens (R, S e E) e as diferenças estatísticas foram analisadas pelo teste de Tukey (ABDI & WILLIAMS, 2010). Foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$.

A matriz de distribuição das OTUs foi submetida ao teste *Non-Metric Dimensional Scaling* (NMDS) utilizando o índice de dissimilaridade Bray-Curtis (RICOTTA & PODANI, 2017), para avaliar a distribuição e a correlação das OTUs entre as amostras S, R e E. Para avaliar as diferenças estatísticas entre as amostras ($p < 0,05$) foi aplicada uma PERMANOVA (ANDERSON, 2017). Por fim, a matriz de distribuição das OTUs com suas respectivas identificações taxonômicas foi submetida a uma LEfSe (*Linear discriminant analysis Effect Size*). Com isso, o algoritmo aplicado pelo LEfSe permitiu avaliar quais grupos taxonômicos estavam significativamente mais enriquecidos em cada amostragem, a consistência desse resultado entre cada amostra e a possível relevância desse efeito (SEGATA *et al.*, 2011).

4.5. Seleção de PGPB do interior das raízes da capuchinha

A seleção das estirpes bacterianas foi feita para cada uma das 5 plantas coletadas e a metodologia utilizada encontra-se apresentada na **Figura 4**. Para a realização dos testes, as estirpes previamente estocadas em TSB contendo 10% de glicerol no freezer -80°C foram reativadas através da semeadura em placas de Petri contendo meio TSA. As placas foram mantidas a 32°C por 24 horas e foi feita a verificação da pureza das colônias pela presença de apenas um morfotipo colonial por placa. Em seguida, as colônias foram utilizadas para realização do teste de amplificação do gene *nifH* por PCR (descrito no item 4.5.5) e inoculadas em 3ml de meio TSB. Após 24h a 32°C , o crescimento das estirpes em meio TSB foi utilizado para a realização dos demais testes. A seguir, estão detalhados os procedimentos para seleção das PGPB.

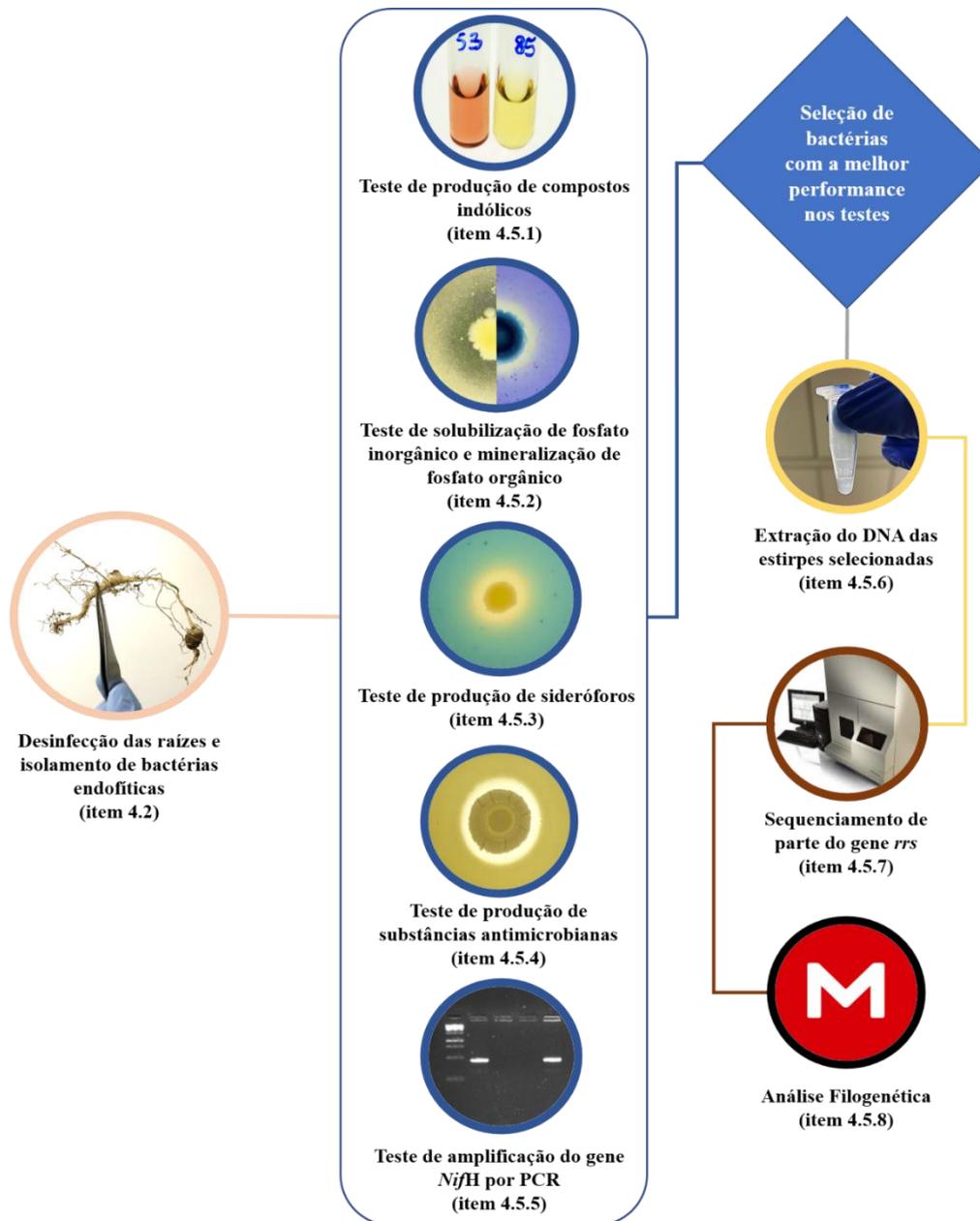


Figura 4. Metodologia utilizada para seleção de PGPB e identificação das estirpes, conforme detalhado no item 4.5. Fonte: figura de autoria própria, contendo imagens do acervo pessoal e imagens extraídas de busca.

4.5.1. Teste de produção de compostos indólicos (CI)

A análise da produção de CI foi realizada a partir de uma adaptação da metodologia descrita por Bent e colaboradores (2001). Após 24 horas de crescimento de cada estirpe em meio TSB, 100µl de cada cultura foram inoculados em tubos de ensaio com tampa de rosca contendo 3ml de meio King's B líquido (KING, WARD & RANEY, 1954), que foram mantidos no escuro, sob agitação de 150rpm e temperatura de 27°C em incubadora *shaker* refrigerada Novatecnica™ NT715. Após 72 horas, 1,5ml da suspensão de células foram transferidos para tubos Eppendorf que foram submetidos à centrifugação refrigerada por 15 minutos a 10.000rpm, em microcentrífuga Sorvall™ Legend™ Micro 17R. Em seguida, para avaliar a produção de compostos indólicos, 1ml de sobrenadante foi adicionado a 1ml de reagente de Salkowski (1,875g de FeCl₃.6H₂O, 100 ml H₂O e 150 ml de H₂SO₄ a 96% de pureza), conforme descrito por Tang e Bonner (1947). A produção de CI foi avaliada visualmente, indicada pela mudança de coloração do sobrenadante para tons avermelhados e pela intensidade da cor (fraco ou forte, conforme mostrado na **Figura 5**).

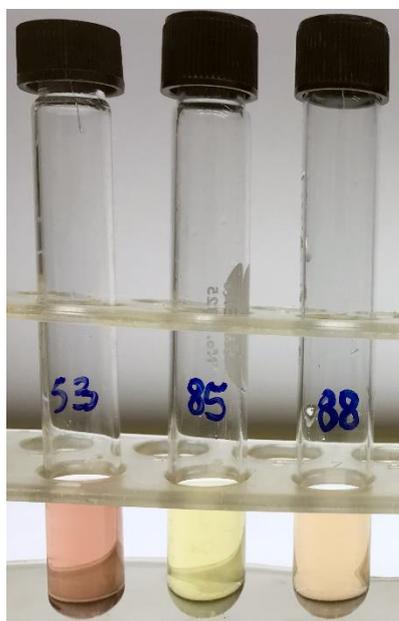


Figura 5. Teste realizado para avaliar a produção de compostos indólicos (CI), conforme descrito no item 4.5.1. A mudança da coloração amarela do meio King's B para tons avermelhados após a adição do reagente de Salkowski indica positivo para CI. Da esquerda para a direita: positivo forte, controle negativo e positivo fraco. Fonte: acervo pessoal.

4.5.2. Teste de mineralização de fosfato orgânico (FCA) e solubilização de fosfato inorgânico (NBRIP)

O pré-inóculo de cada estirpe foi transferido em forma de *spot* (5µl) para placas de Petri contendo o meio de cultura FCA (KEROVUO *et al.*, 1998) – que contém fitato de cálcio em sua composição – ou o meio de cultura NBRIP (NAUTIYAL, 1999), que possui fosfato de cálcio. Após cinco dias, o aparecimento de um halo transparente ao redor de cada colônia foi utilizado como indicativo da capacidade de mineralização de fosfato orgânico no meio FCA (**Figura 6a**) e solubilização de fosfato inorgânico no meio NBRIP (**Figura 6c**). Além disso, foi feita a medida do diâmetro do halo presente em cada colônia utilizando uma régua. As medidas em milímetros foram utilizadas para comparar o tamanho do halo entre as diferentes estirpes.

4.5.3. Teste de produção de sideróforos (CAS)

A análise da produção de sideróforos pelas estirpes isoladas foi realizada conforme Schwyn e Neilands (1987). As seguintes soluções foram preparadas separadamente: 60,5mg de cromoazurol S (CAS) em 50ml de água destilada; 10ml de Fe (III) (FeCl₃.6H₂O 1mM em HCl 10mM) e 72,9mg de HDTMA (hexadeciltrimetilamonio) em 40ml de água destilada. Após a autoclavação a 121°C por 15min, a solução de CAS foi misturada à solução de Fe (III). Em seguida, a solução de HDTMA foi mantida sob agitação e lentamente adicionada à solução de CAS + Fe (III). A solução final CAS + Fe (III) + HDTMA (100ml) foi acrescentada ao meio King's B (KING, WARD & RANEY, 1954), adicionado de 1,5% de ágar e previamente autoclavado. O crescimento das estirpes em TSB foi inoculado na forma de *spot* (5µl) nas placas de Petri contendo o meio seletivo CAS-ágar e incubadas a 32°C por 5 dias. As estirpes consideradas positivas para produção de sideróforos produziram um halo ao redor das colônias e mudaram a coloração do meio verde-azulado para amarelo (**Figura 6b**). O diâmetro do halo formado pelas colônias foi medido em milímetros com uma régua e utilizado para comparação entre as diferentes estirpes.

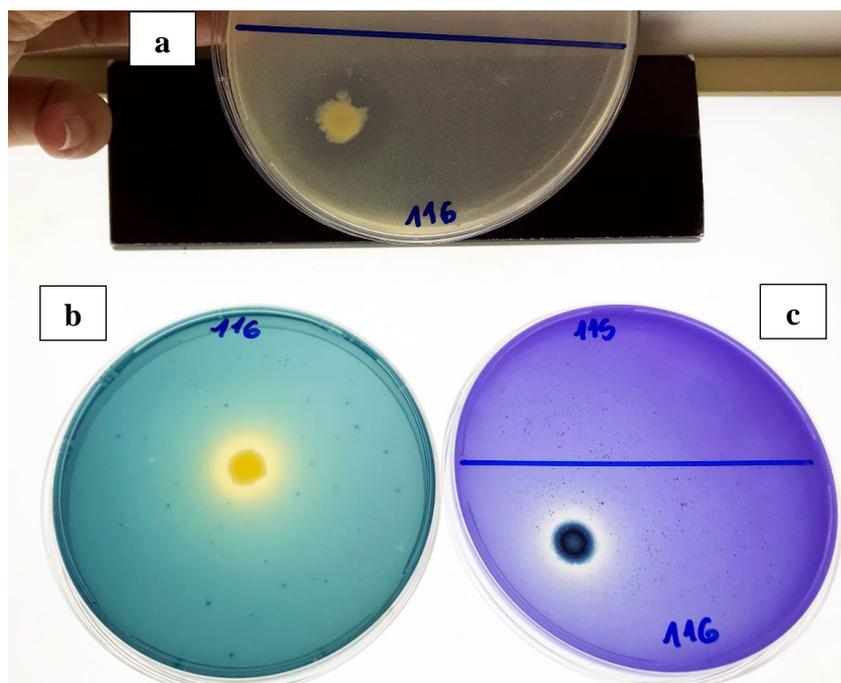


Figura 6. Testes realizados para análise de mineralização de fosfato orgânico (meio FCA – **a**), produção de sideróforos (meio CAS – **b**) e solubilização de fosfato inorgânico (meio NBRIP – **c**). A presença de um halo transparente ao redor das colônias indica que a estirpe foi positiva para os testes. Fonte: acervo pessoal.

4.5.4. Teste de produção de substâncias antimicrobianas (SAMs)

As estirpes isoladas foram testadas quanto a capacidade de produzir substâncias antimicrobianas, conforme a metodologia descrita por Rosado e Seldin (1993). Uma alíquota de 5µl do crescimento das estirpes em TSB foi inoculada em meio TSA na forma de *spot* e incubadas a 32°C por 48 horas. Após este período, as células foram expostas a vapor de clorofórmio por 15 minutos e as placas foram inoculadas com uma suspensão de TSA semi-sólido (TSB adicionado de 0,75% de ágar) contendo *Micrococcus* sp. (COTTA *et al.*, 2012) e incubadas por 48 horas a 32°C. A presença de um halo de inibição de crescimento ao redor das colônias foi considerada como resultado positivo para produção de substâncias antimicrobianas. Ainda, os halos foram classificados em translúcidos (**Figura 7a**) ou turvos (**Figura 7b**) e medidos com o auxílio de uma régua para comparação entre as diferentes estirpes.

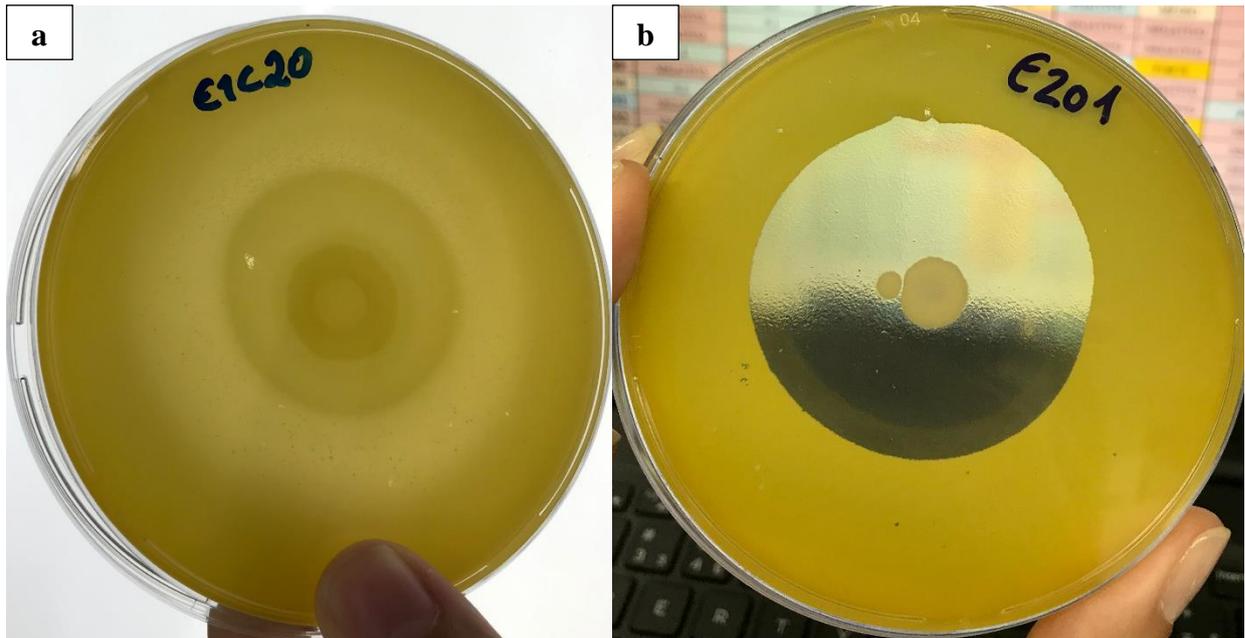


Figura 7. Teste realizado para avaliar a produção de substâncias antimicrobianas (SAMs) conforme descrito no item 4.5.4. No centro das placas de Petri está o crescimento das estirpes bacterianas isoladas. Após o inóculo de uma estirpe de *Micrococcus* sp., a presença do halo foi considerada como resultado positivo para a produção de substâncias antimicrobianas. Em (a), presença de um halo considerado turvo. Em (b), presença de um halo considerado translúcido. Fonte: compilado de imagens do acervo pessoal, figura de autoria própria.

4.5.5. Teste de amplificação do gene *nifH* por PCR

As colônias das estirpes isoladas foram submetidas a uma reação de PCR para amplificação do gene *nifH* que codifica para uma das subunidades da enzima nitrogenase, utilizando os iniciadores UEDA19F (5' GCIWTYTAYGGIAARGGIGG 3') e R6 (5' GCCATCATYTCICCCIGA 3'), conforme descrito por Angel e colaboradores (2018). Cada reação foi realizada em um volume final de 20 μ l, contendo tampão de PCR 5X da Promega® na concentração de 1X; 2mM de MgCl₂; 1mM de dNTP; 1 μ M de cada iniciador; 1,25U de *Taq* DNA polimerase e água MilliQ estéril q.s.p. 20 μ l. Com o auxílio de um palito estéril, uma pequena quantidade de uma colônia isolada de cada estirpe foi introduzida em cada reação (WOODMAN, 2008). O ciclo utilizado foi: 1x (5min a 94°C); 30x (60seg a 94°C; 60seg a 55°C; 60seg a 72°C); 1x (10min a 72°C); 4°C. Os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 1,4% contendo SYBR™ Safe DNA Gel Stain (3%) em tampão TEB 1X (SAMBROOK, FRITSCH & MANIATIS, 1989) com uma corrente elétrica de 80V por 65 minutos. Para verificar a amplificação do fragmento esperado (394pb), 3 μ l do produto de PCR foi comparado a 3 μ l de MassRuler™ High Range DNA Ladder, da Thermo Fisher Scientific™. Ao final da corrida, o gel foi observado conforme descrito no item 4.3. Foram considerados resultados positivos a amplificação de bandas de 394pb, conforme mostrado na **Figura 8.**

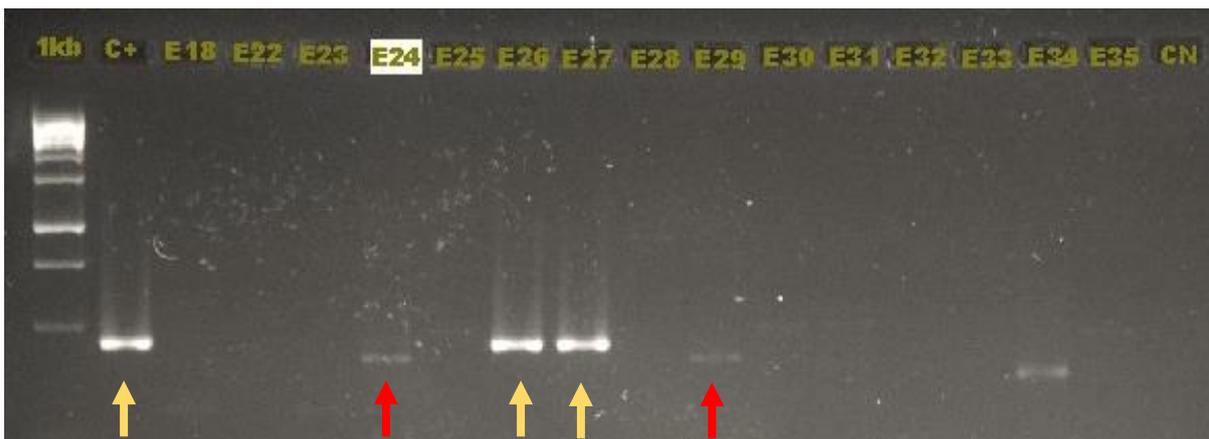


Figura 8. Teste realizado para avaliar a amplificação do gene *nifH*, conforme descrito no item 4.5.5. Na linha superior, as siglas significam: 1kb – poço contendo MassRuler™ High Range DNA Ladder; C+ - poço contendo o controle positivo referente ao gene *nifH*; E18-E34 – poços contendo os produtos de PCR de diferentes estirpes testadas; CN – controle negativo da reação de PCR (sem colônia). As setas amarelas indicam resultados considerados positivos para a presença do gene *nifH* (394pb) e as setas vermelhas indicam amplificações inconclusivas (tamanhos somente próximos a 394pb). As demais amplificações foram consideradas negativas. Fonte: imagem de autoria própria gerada pelo aparelho Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System com o auxílio do software Image Lab™.

4.5.6. Extração do DNA das estirpes selecionadas

As estirpes que apresentaram um maior número de resultados positivos nos testes realizados para seleção de PGPB foram submetidas a uma extração do DNA utilizando o kit comercial “ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep™” (Zymo Research Corporation, USA). Para verificar a eficiência da extração, o DNA foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0,8%, conforme descrito no item 4.3, e a quantificação do DNA foi realizada utilizando o Qubit™ dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific™).

4.5.7. Sequenciamento de parte do gene *rrs* das PGPB selecionadas

As estirpes selecionadas através dos métodos tradicionais e moleculares descritos anteriormente foram identificadas através do sequenciamento de parte do gene que codifica o 16S rRNA. Para isso, foram realizadas reações de PCR utilizando os iniciadores universais pA (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') e pH (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'), conforme descrito por Massol-Deya e colaboradores (1995). Cada reação foi realizada com um volume final de 100µl, contendo tampão de PCR 5X da Promega® na concentração de 1X; 1,5mM de MgCl₂; 1mM de dNTP; 1µM de cada iniciador; 2,5U de *Taq* DNA polimerase; 1µl do DNA de cada estirpe e água MilliQ estéril q.s.p. 100µl. O ciclo utilizado foi: 1x (2min a

94°C); 35x (1min e 10seg a 94°C; 30seg a 48°C; 2min e 10seg a 72°C); 1x (2min a 72°C); 4°C. Os produtos da PCR foram purificados utilizando o kit comercial “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega Corporation, USA).

Para cada estirpe bacteriana foram feitas duas reações contendo entre 20-40ng do DNA da estirpe, 0,5µM do iniciador (785F ou 907R; LANE, 1991) e água MilliQ estéril q.s.p. 7µl. As reações foram enviadas para a Plataforma de Sequenciamento de DNA (PSEQDNA) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil). O sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador automático SeqStudio™ (Applied Biosystems – Thermo Fisher Scientific™).

4.5.8. Análise filogenética

As sequências *forward* e *reverse* de cada estirpe, obtidas a partir do sequenciamento, foram inicialmente analisadas pela ferramenta *Electropherogram quality analysis*, disponibilizada pela EMBRAPA (asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/). Através dessa ferramenta, foi feito um controle de qualidade nas sequências, removendo bases nucleotídicas e/ou sequências de baixa qualidade (*phred*<20). Em seguida, foi feita a montagem dos *contigs* utilizando o software BioEdit (HALL, BIOSCIENCES & CARLSBAD, 2011). Após a montagem, os *contigs* foram submetidos a dois diferentes bancos de dados para avaliar a identidade das sequências das estirpes com as sequências depositadas. A identidade leva em consideração os nucleotídeos iguais entre as sequências comparadas e desconsidera possíveis *gaps* causados por deleções e/ou inserções nucleotídicas. Portanto, os *contigs* foram submetidos ao banco de dados RDP (*Ribosomal Database Project*; COLE *et al.*, 2009) e a ferramenta SeqMatch foi utilizada para comparar as sequências das estirpes às sequências depositadas no RDP. Além disso, os *contigs* também foram submetidos ao banco de dados rRNA/ITS do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), utilizando a ferramenta BLASTn (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e foram avaliadas as sequências de maior cobertura e identidade. Após a comparação entre a identidade das estirpes nos dois diferentes bancos de dados, foi inferida a possível identificação das estirpes isoladas a nível de filo, família e gênero.

Em seguida, as sequências nucleotídicas das estirpes e de bactérias com maior identidade às estirpes isoladas foram importadas para o *software* MEGA 10 (KUMAR *et al.*, 2018) para

avaliar a correlação filogenética entre as bactérias. Nesse contexto, foi avaliada a similaridade entre as sequências e fatores como inserção, deleção e/ou substituição de nucleotídeos foram considerados para inferir um relacionamento evolutivo entre as sequências das estirpes comparadas. No MEGA, foi feito o alinhamento das sequências pelo método ClustalW e a construção da árvore filogenética utilizando o método *Maximum likelihood* e o modelo Jukes-Cantor. Além disso, foi gerada uma árvore filogenética no MEGA apenas com as estirpes isoladas, utilizando os mesmos métodos. Esta árvore foi exportada para a plataforma online iTOL v6 (LETUNIC & BORK, 2021), que foi utilizada para incluir metadados relacionados aos testes para seleção de PGPB e a possível identidade das estirpes isoladas.

4.6. Comparação entre a composição da comunidade bacteriana total endofítica e as estirpes isoladas da região endofítica da capuchinha

A composição da comunidade bacteriana total da região endofítica (E) das 5 diferentes plantas de capuchinha foi comparada com o resultado da identificação das estirpes isoladas das 5 diferentes plantas. Para isso, o arquivo contendo as sequências das estirpes foi importado para o *software* Mothur v.1.43.0 (SCHLOSS *et al.*, 2009) e foi incorporado ao arquivo contendo apenas as sequências das amostras E (merge.files e merge.count). Em seguida, foi realizado um alinhamento das sequências no banco de dados Silva v.138 (QUAST *et al.*, 2013) através de uma PCR virtual, utilizando os iniciadores 341F e 806R (TAKAHASHI *et al.*, 2014) e o comando align.seqs. Após a PCR, foi realizado um controle de qualidade para a determinação do tamanho das sequências (filter.seqs), a formação de pré-clusters (pre.cluster) e a clusterização dos dados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs, do inglês *Operational Taxonomic Unit*). Por fim, o comando bin.seqs foi utilizado para listar as OTUs e as sequências pertencentes às mesmas. Os dados gerados foram exportados para análise no Microsoft Excel (versão 2016).

5. RESULTADOS

5.1. Análise da comunidade bacteriana total das regiões endofítica, rizosférica e do solo não-rizosférico através do sequenciamento em larga escala de parte do gene *rrs*

Com o intuito de conhecer a comunidade bacteriana associada à capuchinha, foi realizado o sequenciamento das regiões endofítica, rizosférica e do solo não-rizosférico das cinco plantas de capuchinha coletadas (15 amostras). Foram obtidas 1.492.053 sequências no total das 15 amostras. Após a normalização do número de sequências por amostra, mantendo como padrão mínimo 49.071 sequências por amostra, foi obtido um total de 736.065 sequências. A cobertura do sequenciamento de cada amostra está apresentada na **Figura 9**, que mostra a curva de rarefação individual e o número de OTUs identificadas pelo número de sequências obtidas. A tendência de formação de uma assíntota indica que a amostragem foi suficiente para cobrir a maior parte da diversidade bacteriana local. A comunidade bacteriana das 5 amostras de solo não-rizosférico apresentaram uma maior riqueza de OTUs e uma menor cobertura quando comparadas à comunidade bacteriana da maioria das amostras das regiões endofítica e rizosférica (**Figura 9**).

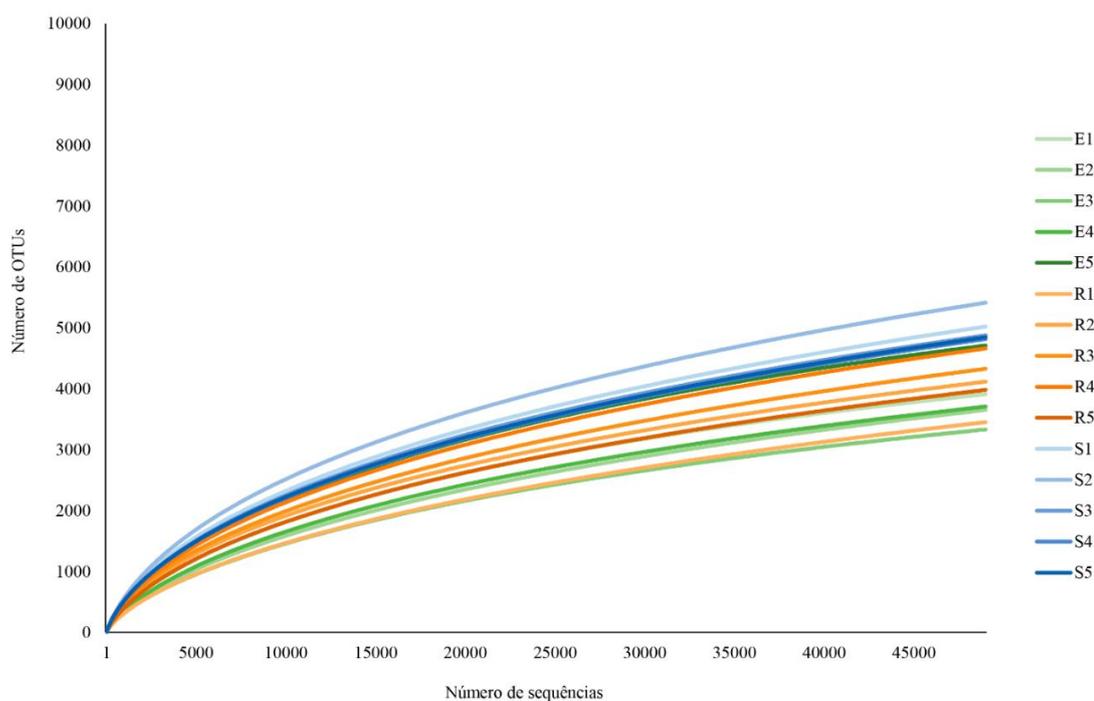


Figura 9. Curva de rarefação individual das amostras da região endofítica (E – tons de verde), rizosférica (R – tons de laranja) e do solo não-rizosférico (S – tons de azul) associado à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* Microsoft Excel.

A **Tabela 2** mostra os dados relacionados à alfa-diversidade das amostras das regiões endofítica, rizosférica e do solo não-rizosférico. É possível notar que a comunidade bacteriana presente nas amostras de solo não-rizosférico apresentou uma riqueza (número de OTUs) e uma diversidade (índice de Shannon) significativamente maior quando comparada à comunidade bacteriana das amostras das regiões endofítica e rizosférica. A comunidade bacteriana da rizosfera apresentou uma riqueza significativamente menor quando comparada à comunidade bacteriana do solo não-rizosférico. As comunidades bacterianas endofítica e rizosférica não apresentaram diferenças significativas entre si em relação à diversidade ou à riqueza.

Tabela 2. Alfa-diversidade da comunidade bacteriana total das amostras da região endofítica (E), rizosférica (R) e do solo não-rizosférico (S) avaliadas a partir do sequenciamento em larga escala de parte do gene *rrs*. Entre parênteses: desvio padrão considerando as réplicas. Letras iguais ao lado dos valores indicam que não há diferença estatística entre as amostras; letras diferentes indicam que há diferença estatística. Teste de Tukey, $p < 0,05$.

| Alfa-diversidade | E | R | S |
|-------------------|---------------|----------------|---------------|
| Nº de OTUs | 3867 (517) a | 4113 (448) a | 5000 (246) b |
| Índice de Shannon | 5,29 (0,86) a | 5,91 (0,57) ab | 6,78 (0,13) b |

A análise da beta-diversidade entre a comunidade bacteriana das amostras foi realizada utilizando uma NMDS (*Non-Metric Dimensional Scaling*, **Figura 10**). A comunidade bacteriana das amostras de solo não-rizosférico se separou da comunidade bacteriana das amostras das regiões endofítica e rizosférica pelas coordenadas 1, 2 e 3 ($p < 0,05$). Além disso, a comunidade bacteriana das amostras da região endofítica possuiu uma tendência de separação da comunidade bacteriana das amostras de rizosfera pela coordenada 2. Entretanto, essa tendência não se mostrou estatisticamente significativa pela PERMANOVA ($p > 0,05$).

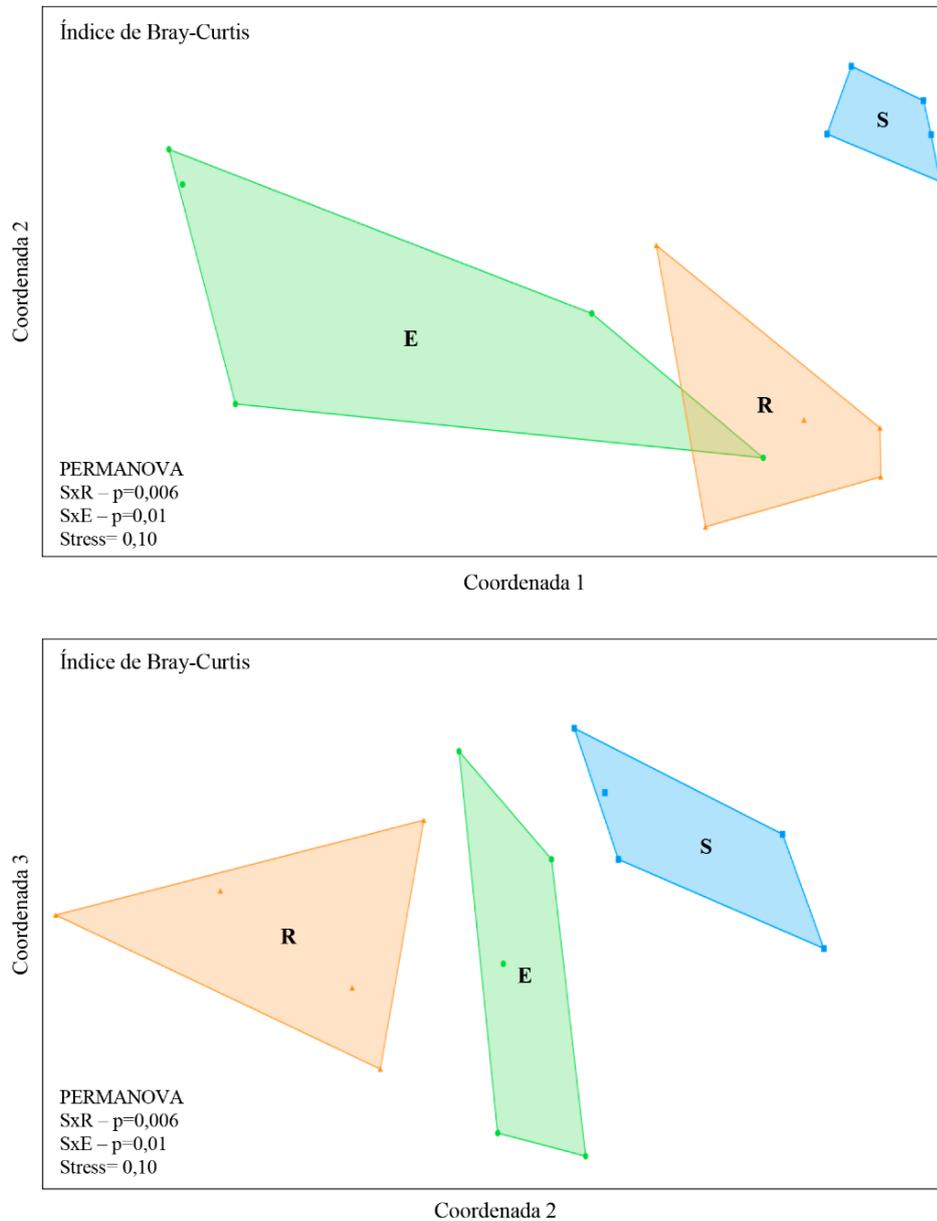


Figura 10. NMDS (*Non-Metric Dimensional Scaling*) da beta-diversidade entre a comunidade bacteriana presente nas regiões endofítica (E – verde), rizosférica (R – laranja) e no solo não-rizosférico (S – azul) associado à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.), baseado no índice de Bray-Curtis. Gráfico gerado em 3D, mostrando as coordenadas 1 e 2 ou 2 e 3. Valores do teste PERMANOVA $p < 0,05$ indicam diferença significativa na beta-diversidade da comunidade bacteriana entre as amostras. Valor de Stress $\leq 0,10$ indica que a distribuição dos dados é fidedigna; valores próximos a 2,0 indicam distribuição estocástica dos dados. Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* PAST v4.02.

Em relação a composição da comunidade bacteriana, 15 filios foram encontrados em todas as amostras (em proporções variadas): Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Acidobacteria, Bacteroidetes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes, Nistropirae, Chloroflexi, Armatimonadetes, Latescibacteria, candidato a divisão WPS-1, Spirochaetes e Deinococcus-Thermus (aqui listados em ordem decrescente de abundância relativa). Os 8 filios mais abundantes estão indicados na **Figura 11** e representaram 90% da abundância relativa total a nível de filo. Cerca de 8% das sequências não puderam ser classificadas. A comunidade bacteriana das amostras do solo não-rizosférico apresentou uma abundância relativa dos filios Actinobacteria, Acidobacteria e Verrucomicrobia significativamente maior quando comparada à comunidade bacteriana das amostras das regiões endofítica e rizosférica, que não diferem estaticamente entre si. Já a comunidade bacteriana das amostras rizosféricas apresentou uma abundância relativa significativamente maior do filo Proteobacteria quando comparada à comunidade bacteriana das amostras do solo não-rizosférico.

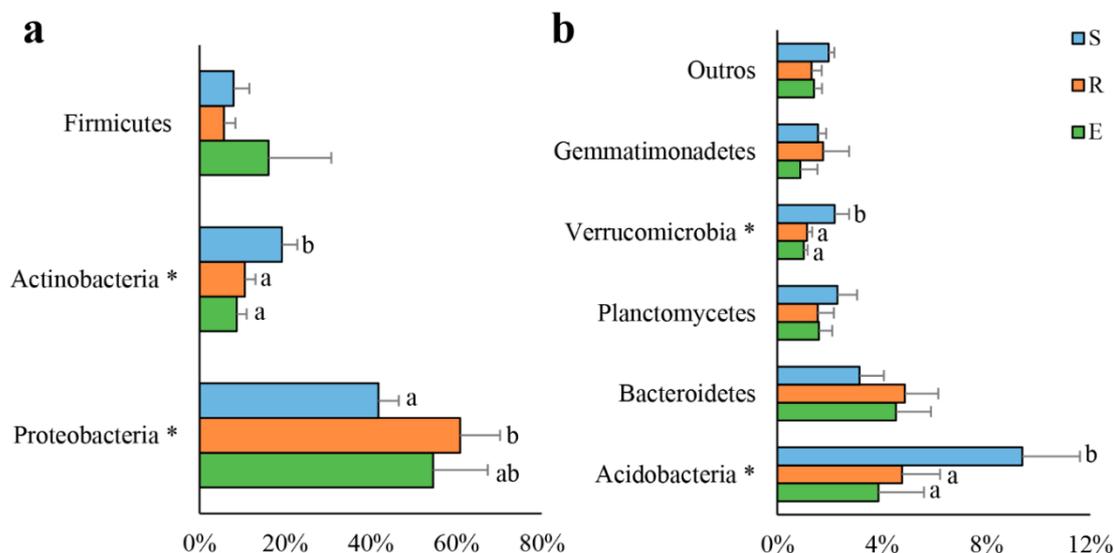


Figura 11. Abundância relativa média de 8 filios bacterianos identificados através do sequenciamento de parte do gene *rrs* nas regiões endofítica (E – verde), rizosférica (R – laranja) e no solo não-rizosférico (S – azul) associados à capuchinha (*Tropaeolum majus* L. Em **a** – até 80% de abundância relativa e em **b** – até 12% de abundância relativa, mostrando os filios que apresentam mais de 0,75% de abundância relativa na média de todas as amostragens. Os asteriscos ao lado do nome dos filios indicam que há diferença estatística entre as amostras. Letras diferentes ao lado das barras de desvio padrão representam diferenças estatísticas significativas entre as amostras S, R e/ou E (Tukey, $p < 0,05$). Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* Microsoft Excel.

As 23 famílias bacterianas mais abundantes, com pelo menos 1% de abundância relativa na média das réplicas de pelo menos uma das amostragens (rizosfera, solo não-rizosférico e/ou região endofítica), foram: Burkholderiaceae, Pseudomonadaceae, Planococcaceae, Comamonadaceae, Sphingomonadaceae, Enterobacteriaceae, Chitinophagaceae, Bacillaceae, Rhizobiaceae, Paenibacillaceae, Planctomycetaceae, Xanthomonadaceae, Gemmatimonadaceae, Gaiellaceae, Hyphomicrobiaceae, Nocardioideae, Microbacteriaceae, Rhodobacteraceae, Mycobacteriaceae, Reyranella, Pseudonocardiaceae, Streptomycetaceae e Micromonosporaceae (aqui listadas em ordem decrescente de abundância relativa). As 23 famílias estão mostradas na **Figura 12** e representaram cerca de 49% do total de sequências a nível de família. Aproximadamente 34% das famílias foram encontradas com uma abundância relativa inferior a 1% e cerca de 15% das sequências não foram classificadas a nível de família.

A comunidade bacteriana das amostras de solo não-rizosférico apresentou uma abundância relativa estatisticamente maior das famílias Gaiellaceae, Hyphomicrobiaceae, Nocardioideae, Pseudonocardiaceae, Streptomycetaceae e Micromonosporaceae, quando comparada à comunidade bacteriana das amostras das regiões endofítica e rizosférica. Já a comunidade bacteriana das amostras de rizosfera apresentou uma abundância relativa significativamente maior das famílias Pseudomonadaceae, Sphingomonadaceae e Enterobacteriaceae, quando comparada à comunidade bacteriana das amostras de solo não-rizosférico e da região endofítica. Em relação à comunidade bacteriana endofítica, as famílias Planococcaceae, Paenibacillaceae e Rhodobacteraceae apresentaram uma abundância relativa significativamente maior quando comparadas à comunidade das amostras de rizosfera; e da família Burkholderiaceae quando comparadas à comunidade das amostras de solo não-rizosférico. Por fim, a família Mycobacteriaceae apresentou uma abundância relativa significativamente menor na comunidade bacteriana das amostras da região endofítica quando comparado à comunidade das amostras de rizosfera e solo não-rizosférico.

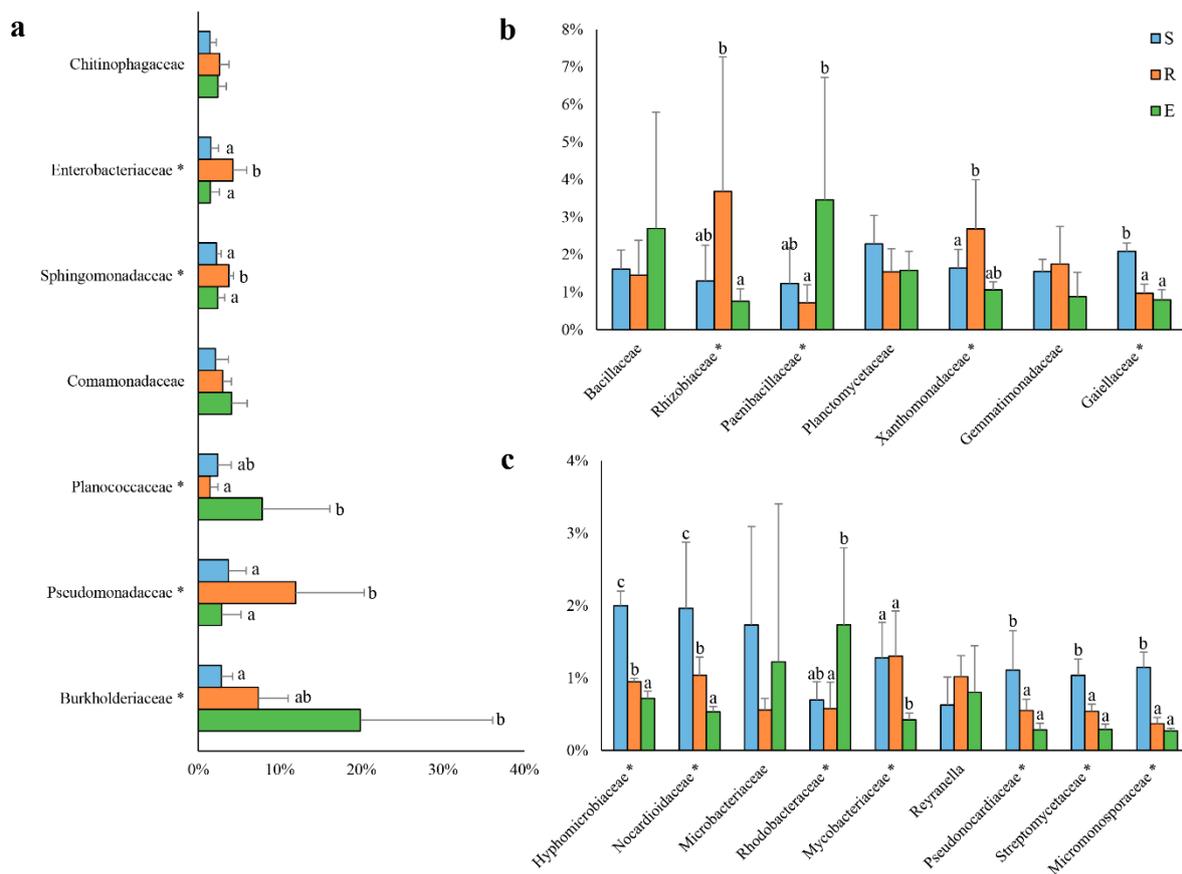


Figura 12. Abundância relativa média de 23 famílias bacterianas identificadas através do sequenciamento de parte do gene *rrs* nas regiões endofítica (E – verde), rizosférica (R – laranja) e no solo não-rizosférico (S – azul) associadas à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Em **a** – até 40% de abundância relativa; em **b** – até 8% de abundância relativa e em **c** – até 4% de abundância relativa, mostrando as famílias que apresentam mais de 1% de abundância relativa na média das réplicas de pelo menos uma das amostragens (E, R e/ou S). Os asteriscos ao lado do nome das famílias indicam que há diferença estatística entre as amostras. Letras diferentes acima ou ao lado das barras de desvio padrão representam diferenças estatísticas significativas entre as amostras S, R e/ou E (Tukey, $p < 0,05$). Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* Microsoft Excel.

Os 20 gêneros mais abundantes, com pelo menos 0,75% de abundância relativa na média das réplicas de pelo menos uma das amostragens ((rizosfera, solo não-rizosférico e/ou região endofítica), foram: *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Gemmatimonas*, *Gaiella*, *Rhizobium*, *Mycobacterium*, *Yersinia*, *Sphingomonas*, *Novosphingobium*, *Sediminibacterium*, *Nocardioides*, *Acidovorax*, *Nitrospira*, *Streptomyces*, *Dyella*, *Stenotrophomonas*, *Solirubrobacter*, *Rhodobacter* e *Serratia* (listadas em ordem decrescente de abundância relativa). Os gêneros mais abundantes estão indicados na **Figura 13** e representaram cerca de 32% da abundância relativa total.

A comunidade bacteriana das amostras de solo não-rizosférico possui uma abundância relativa dos gêneros *Gaiella*, *Nocardioides*, *Nitrospira*, *Streptomyces* e *Solirubrobacter* significativamente maior quando comparada à comunidade bacteriana das amostras das regiões rizosférica e endofítica. Já a comunidade bacteriana das amostras de rizosfera possui uma

abundância relativa significativamente maior dos gêneros *Rhizobium* e *Sphingomonas* quando comparada à comunidade bacteriana das amostras da região endofítica; e do gênero *Pseudomonas*, quando comparada à comunidade das amostras de solo não-rizosférico e endofítica. Em relação à comunidade bacteriana da região endofítica, o gênero *Acidovorax* possuiu uma abundância relativa significativamente maior quando comparado à comunidade das amostras de rizosfera e solo não-rizosférico. O gênero *Paenibacillus* foi significativamente maior na comunidade bacteriana endofítica quando comparada à rizosférica. Em contrapartida, o gênero *Mycobacterium* possuiu uma abundância relativa menor quando comparado à comunidade de rizosfera e solo não-rizosférico. Por fim, o gênero *Ralstonia* possuiu uma abundância relativa significativamente maior nas amostras da região endofítica quando comparadas às amostras de solo não-rizosférico.

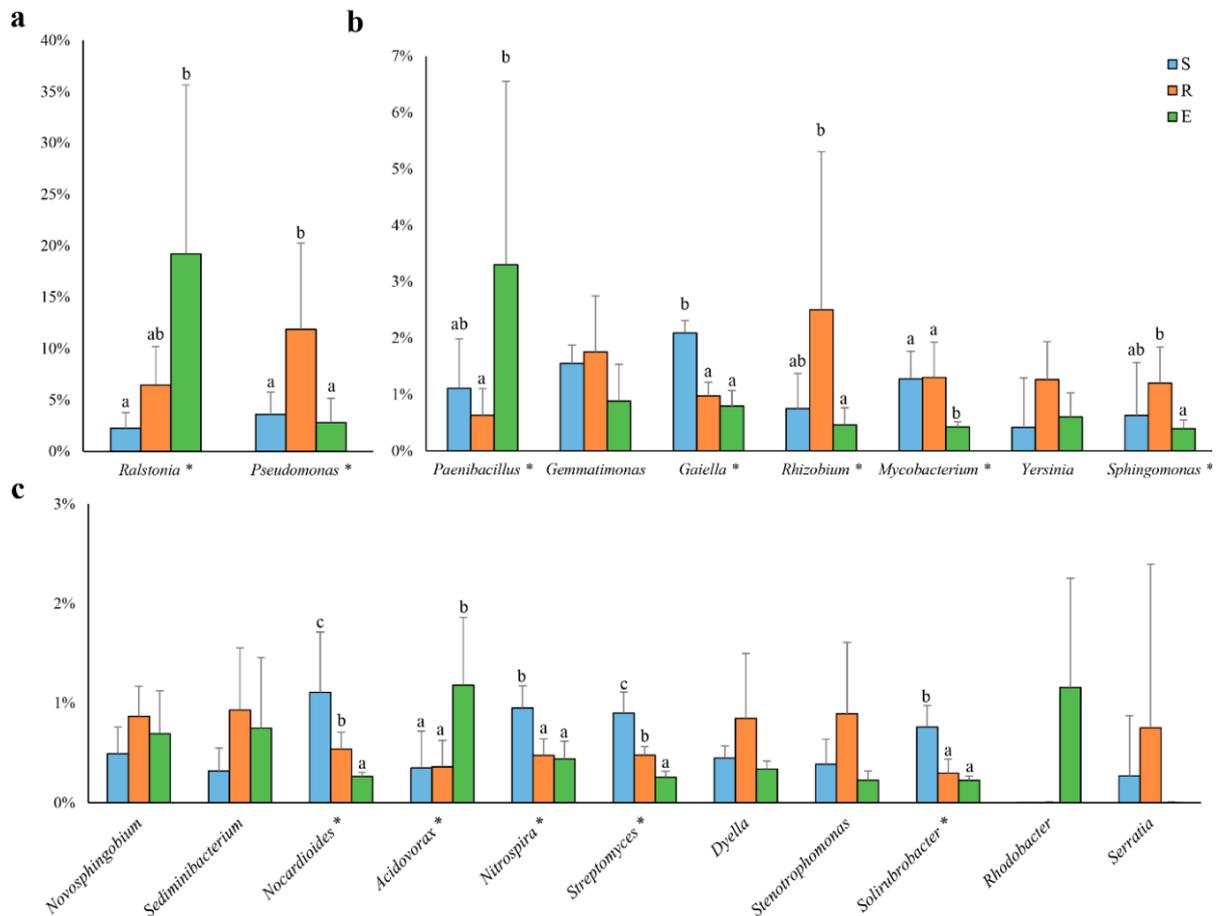


Figura 13. Abundância relativa média de 20 gêneros bacterianos identificados através do sequenciamento de parte do gene *rrs* nas regiões endofítica (E – verde), rizosférica (R – laranja) e no solo não-rizosférico (S – azul) associados à capuchinha (*Tropaolum majus* L.). Em **a** – até 40% de abundância relativa; em **b** – até 7% de abundância relativa e em **c** – até 3% de abundância relativa, mostrando os gêneros que apresentam mais de 0,75% de abundância relativa na média das réplicas de pelo menos uma das amostragens (R, S e/ou E). Os asteriscos ao lado do nome das espécies indicam que há diferença estatística. Letras diferentes acima ou ao lado das barras de desvio padrão representam diferenças estatísticas significativas entre as amostras S, R e/ou E (Tukey, $p < 0,05$). Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* Microsoft Excel.

Pelo fato do gênero *Ralstonia* incluir espécies fitopatogênicas de relevância econômica na agricultura e a colonização endofítica dessas espécies não ser comumente descrita na literatura, foi gerado um *boxplot* para avaliar a distribuição das réplicas das amostras das regiões endofítica, rizosférica e do solo não-rizosférico em relação à abundância relativa do gênero *Ralstonia* (**Figura 14a**). É possível observar que duas amostras da região endofítica apresentaram uma comunidade bacteriana com alta abundância relativa de *Ralstonia*, significativamente maior quando comparada com a comunidade de solo não-rizosférico. Apesar do teste de Tukey ter indicado que não há diferença significativa na abundância relativa de *Ralstonia* entre as comunidades endofítica e rizosférica, a **Figura 14b** mostra que há uma possível correlação negativa forte entre elas. Ou seja, quanto maior a abundância relativa do gênero *Ralstonia* na comunidade bacteriana endofítica, menor a abundância relativa do gênero na comunidade bacteriana rizosférica e vice-versa (coeficiente de correlação de Pearson, $r = -0,91436$).

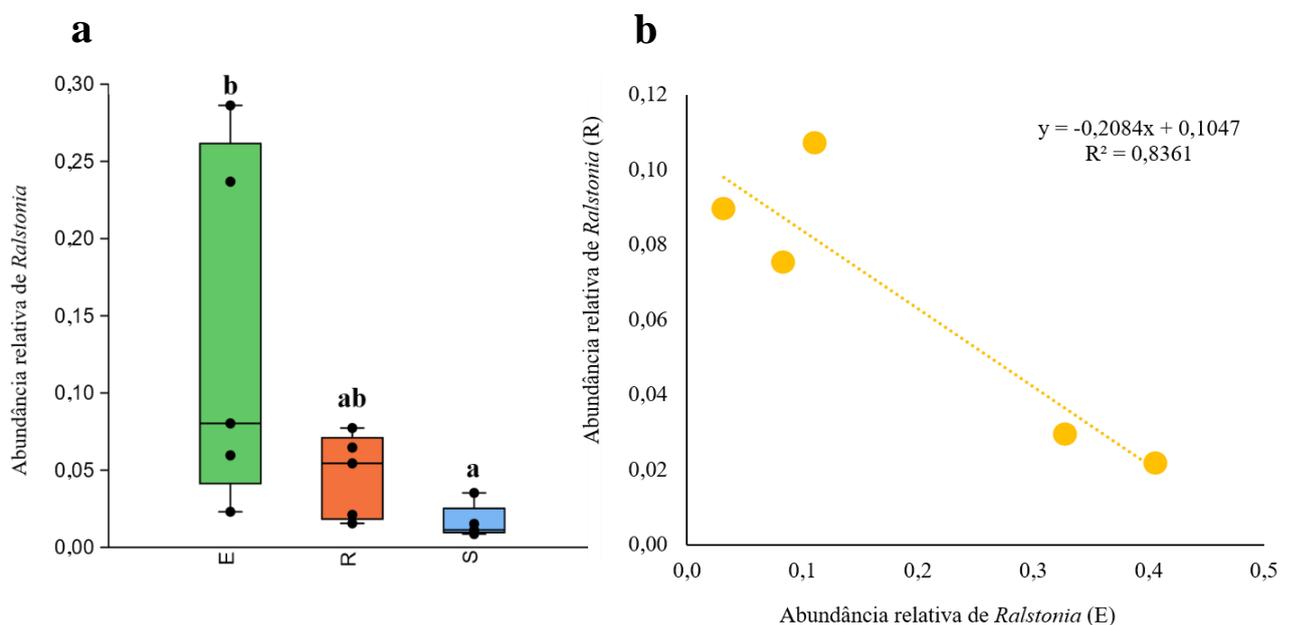


Figura 14. Abundância relativa do gênero *Ralstonia* associada à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.) e identificada através do sequenciamento de parte do gene *rrs* da comunidade bacteriana total. Em **a** – um *boxplot* mostrando a distribuição de cada amostra em relação à abundância relativa de *Ralstonia* nas regiões endofítica (E – verde), rizosférica (R – vermelho) e no solo não-rizosférico (S – azul). Letras diferentes acima das barras de desvio padrão representam diferenças estatísticas significativas entre as amostragens (Tukey, $p < 0,05$). Em **b** – um gráfico mostrando uma possível correlação negativa entre a abundância relativa de *Ralstonia* em R e em E. Coeficiente de correlação de Pearson $r = -0,91436$. Fonte: figura de autoria própria gerada nos *softwares* PAST v4.02 (**a**) e Microsoft Excel (**b**).

Adicionalmente, foi realizada uma LEfSe (*Linear discriminant analysis Effect Size*) para comparar a riqueza de OTUs e suas classificações taxonômicas entre a comunidade bacteriana endofítica, rizosférica e do solo não-rizosférico. Além de considerar a abundância relativa significativa de táxons, foi analisada a consistência desses dados entre as diferentes amostras. Assim, biomarcadores (táxons) foram selecionados e apontados como os principais responsáveis pelas diferenças observadas entre as comunidades. Dessa forma, a LEfSe excluiu dados discrepantes entre as réplicas das amostragens (possíveis *outliers*) e contribuiu para uma análise da comunidade bacteriana mais fidedigna.

A **Figura 15** mostra uma comparação entre as OTUs significativamente mais enriquecidas nas amostras de solo não-rizosférico e de rizosfera. A comunidade bacteriana do solo não-rizosférico foi influenciada principalmente pela ordem Actinomycetales (filo Actinobacteria), enquanto a comunidade bacteriana da rizosfera foi impactada pelas ordens Rhizobiales e Rhodobacterales, ambas do filo Proteobacteria. A **Figura 16** mostra uma comparação entre as OTUs mais enriquecidas no solo não-rizosférico e na região endofítica. Do mesmo modo, a comunidade bacteriana do solo não-rizosférico foi mais impactada pela ordem Actinomycetales, enquanto a comunidade bacteriana endofítica foi mais influenciada pelas ordens Lactobacillales (filo Firmicutes), Sphingomonadales (filo Proteobacteria) e Verrucomicrobiales (filo Verrucomicrobia). Por fim, a **Figura 17** mostra uma comparação entre as OTUs enriquecidas nas regiões endofítica e rizosférica. As ordens Cytophagales (filo Bacteroidetes) e Rhodospirillales (filo Proteobacteria) foram significativamente mais enriquecidas na comunidade bacteriana endofítica, enquanto as ordens Actinomycetales, Rhizobiales (filo Proteobacteria) e Alteromonadales (filo Proteobacteria) foram mais enriquecidas na rizosfera.

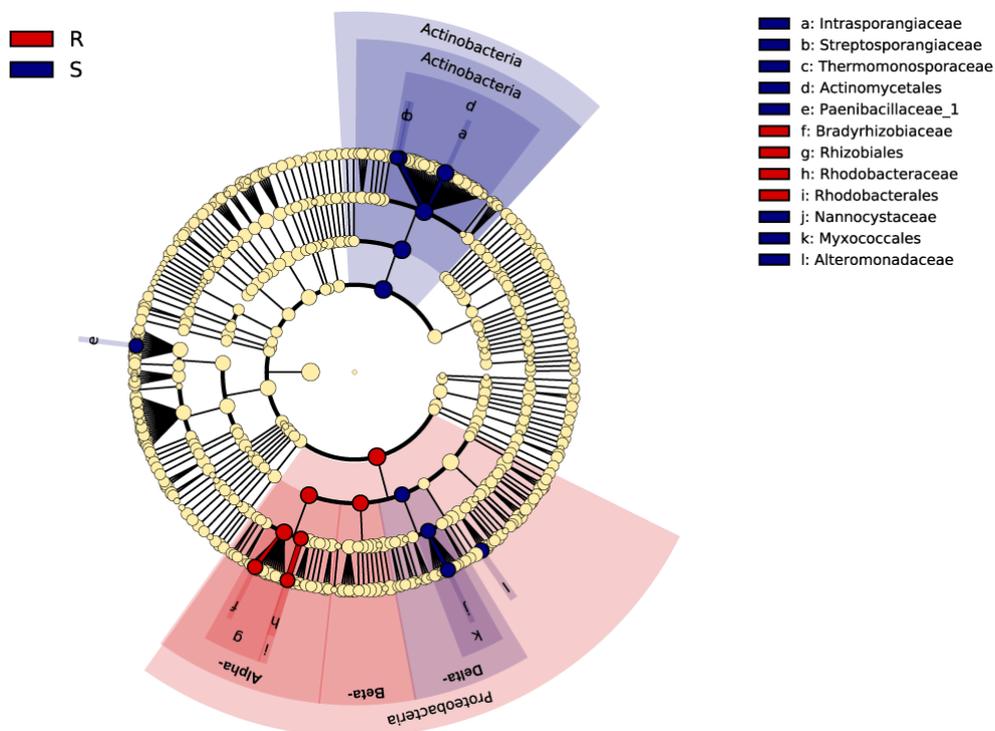


Figura 15. Análise LefSe (*Linear discriminant analysis Effect Size*) mostrando os táxons significativamente mais enriquecidos na comunidade bacteriana da região rizosférica (R – vermelho) e no solo não-rizosférico (S – azul) associada à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Cada bola representa um nível taxonômico e bolas sem coloração vermelha ou azul não apresentam resultados significativos. Fonte: figura de autoria própria gerada com auxílio da plataforma Huttenhower Lab no servidor Galaxy Community Hub e editada no *software* Inkscape.

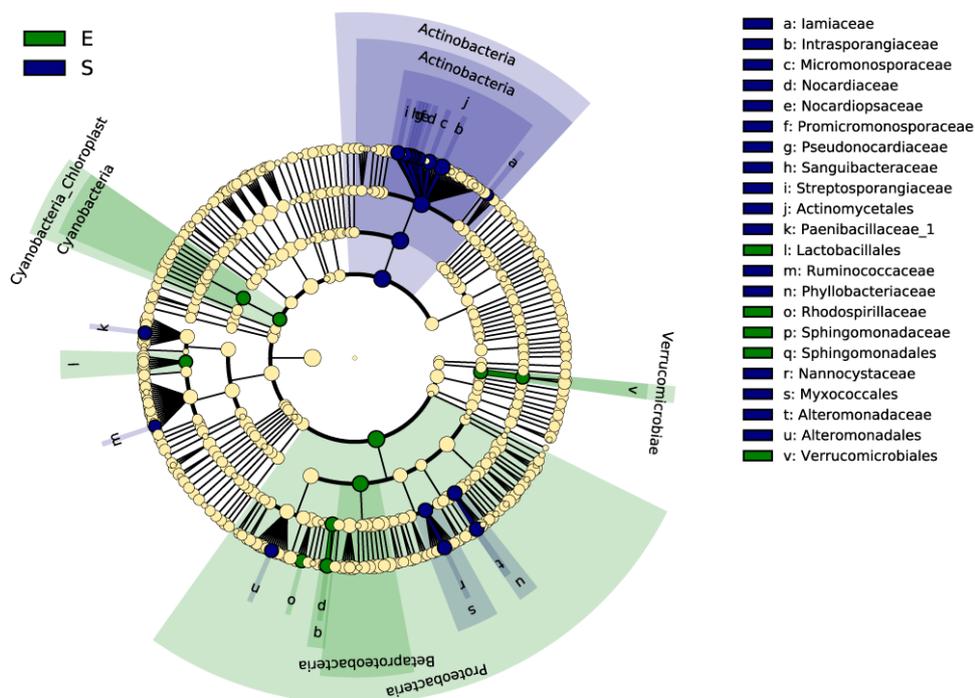


Figura 16. Análise LefSe (*Linear discriminant analysis Effect Size*) mostrando os táxons significativamente mais enriquecidos na comunidade bacteriana da região endofítica (E – verde) e no solo não-rizosférico (S – azul) associada à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Cada bola representa um nível taxonômico e bolas sem coloração verde ou azul não apresentaram um impacto significativo. Fonte: figura de autoria própria gerada com auxílio da plataforma Huttenhower Lab no servidor Galaxy Community Hub e editada no *software* Inkscape

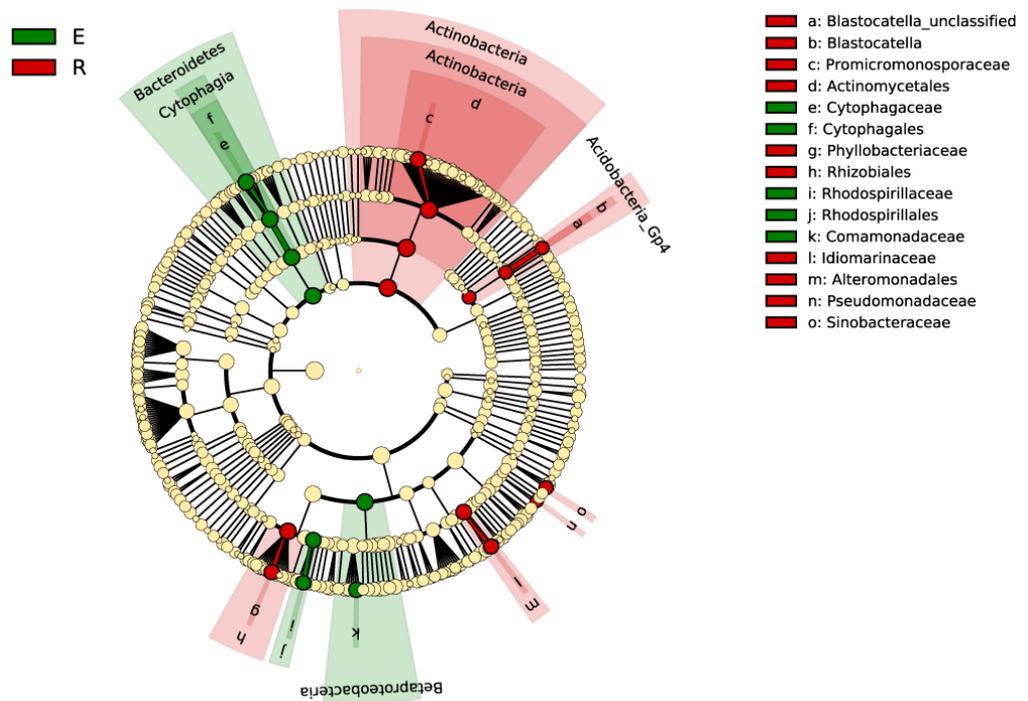


Figura 17. Análise LefSe (*Linear discriminant analysis Effect Size*) mostrando os táxons significativamente mais enriquecidos na comunidade bacteriana das regiões endofítica (E – verde) e rizosférica (R – vermelho) associadas à capuchinha (*Tropaeolum majus* L.). Cada bola representa um nível taxonômico e bolas sem coloração vermelha ou verde não apresentaram um impacto significativo. Fonte: figura de autoria própria gerada com auxílio da plataforma Huttenhower Lab no servidor Galaxy Community Hub e editada no *software* Inkscape.

5.1. Seleção e identificação de PGPB

Foram isoladas da região endofítica das 5 diferentes plantas de capuchinha 236 estirpes bacterianas, enumeradas de E1 a E236. Dentre as 5 réplicas biológicas, foram isoladas 49 estirpes da planta 1, 64 estirpes da planta 2, 24 estirpes da planta 3, 37 estirpes da planta 4 e 62 estirpes da planta 5. Em cada uma das plantas, um mesmo morfotipo foi isolado mais de uma vez, incluindo assim potenciais clones entre as estirpes isoladas. A **Figura 18a** mostra o percentual de estirpes que apresentaram resultados positivos ou negativos em cada um dos testes de PGPB realizados. Das 236 estirpes testadas, 153 foram positivas para mineralização de fosfato orgânico (FCA); 166 para solubilização de fosfato inorgânico (NBRIP); 158 para produção de sideróforos (CAS) e 154 para produção de substâncias antimicrobianas (SAMs). Das 154 estirpes positivas para produção de SAMs, 109 estirpes produziram um halo turvo e 45 produziram um halo totalmente translúcido. Ainda, 105 estirpes apresentaram capacidade de produção de compostos indólicos (CI). Das 105 estirpes positivas para CI, 74 estirpes apresentaram uma coloração levemente rosada (positivo fraco) e 31 apresentaram uma coloração rosa intensa (positivo forte). Apenas 18 estirpes apresentaram a banda esperada correspondente ao gene *nifH* nas PCRs e 14 apresentaram bandas inespecíficas (somente próximas a 394pb), levando a um resultado inconclusivo.

A **Figura 18b** mostra o número de estirpes que apresentaram resultados positivos em nenhum, um, dois, três, quatro, cinco ou seis (todos) testes realizados. Cento e uma estirpes foram positivas para pelo menos 4 dos 6 testes PGPB realizados. Esse parâmetro foi arbitrariamente estipulado para selecionar quais estirpes prosseguiriam para a etapa de identificação. Foram consideradas duplicatas as estirpes que possuíam morfologia colonial parecida e resultados iguais entre si nos testes de PGPB. As duplicatas foram excluídas, totalizando 96 bactérias que tiveram seu DNA extraído e o gene *rrs* sequenciado para identificação molecular.

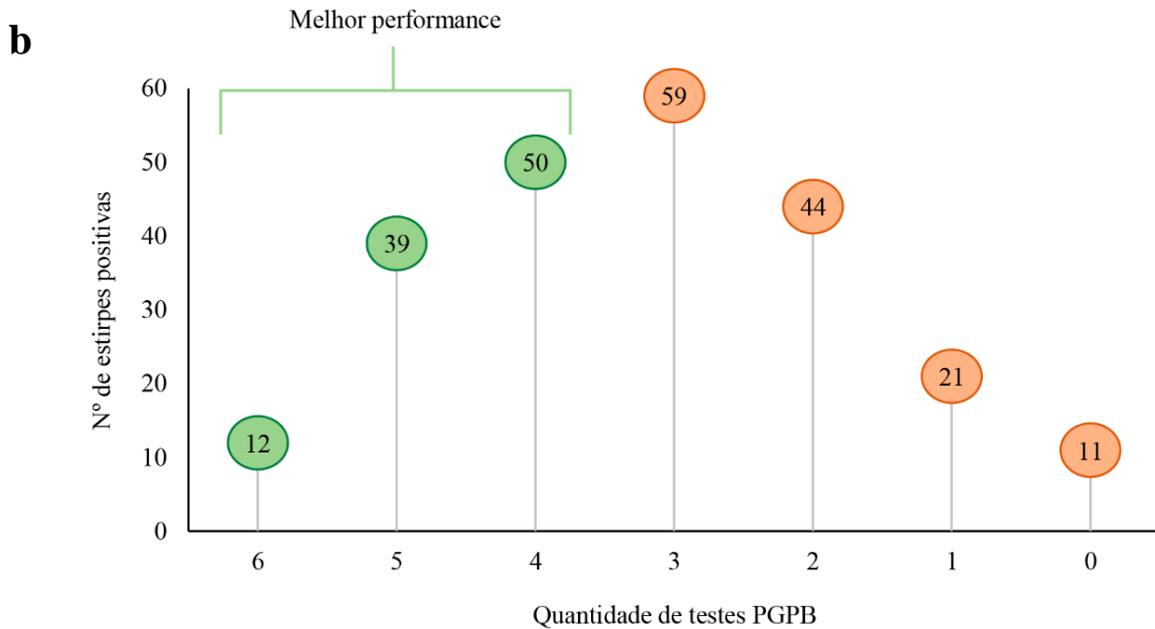
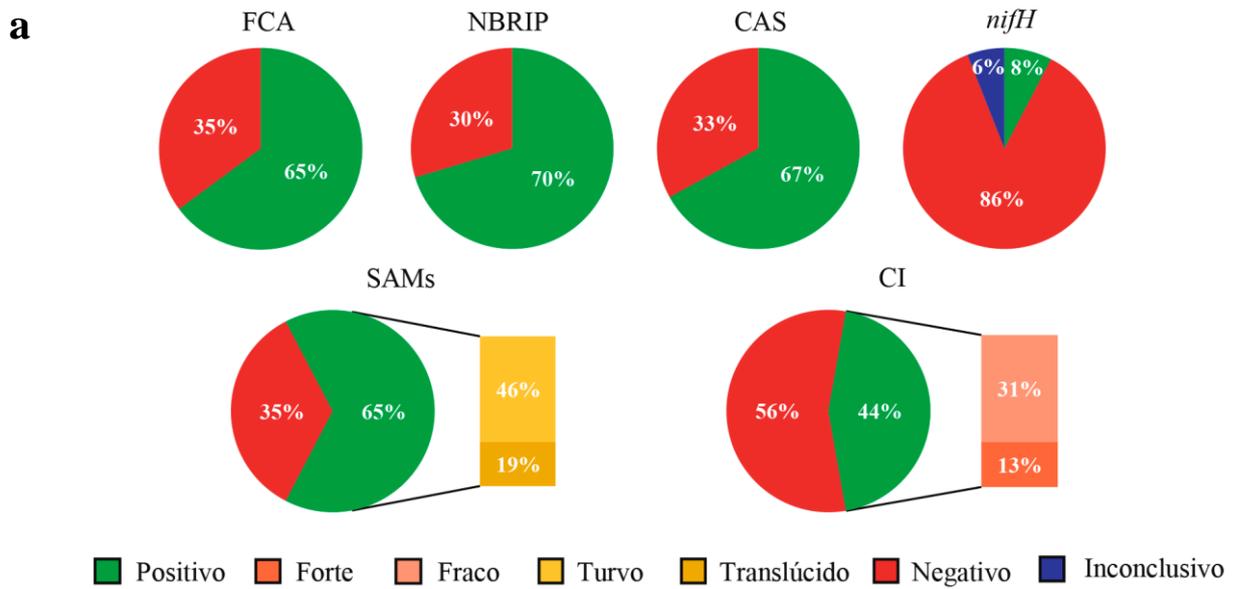


Figura 18. Percentual de estirpes isoladas do interior das raízes de capuchinha que apresentaram resultados positivos ou negativos nos testes para seleção de PGPB realizados. Em **a** – resultado de cada teste para as 236 estirpes, sendo eles: FCA – mineralização de fosfato orgânico; NBRIP – solubilização de fosfato inorgânico; CAS – produção de sideróforos; *nifH* – presença do gene *nifH*; SAMS – produção de substâncias antimicrobianas; CI – produção de compostos indólicos. Positivo significa que houve produção de halo (FCA, CAS, NBRIP, SAMS) ou presença da banda (*nifH*) ou mudança de coloração do meio para a cor rosa (CI). Fraco/forte em CI – intensidade da cor. Em SAMS, translúcido/turvo se referem ao halo. Inconclusivo em *nifH* – bandas inespecíficas, mas próximas a 394pb. Em **b** – é possível observar o número de estirpes que apresentaram resultados positivos em nenhum, um, dois, três, quatro, cinco ou seis (todos) testes realizados. As estirpes em verde (101 estirpes) foram positivas para pelo menos 4 dos 6 testes realizados. Dessas 101 estirpes, as duplicatas (morfologia colonial e resultados nos testes para seleção de PGPB iguais) foram excluídas, totalizando 96 estirpes que tiveram seu DNA extraído e o gene *rrs* sequenciado para identificação molecular. Fonte: figura de autoria própria gerada no Microsoft Excel.

Após o sequenciamento de parte do gene *rrs* das 96 estirpes, 20 estirpes apresentaram sequências com fragmentos inferiores a 1300pb após a montagem dos *contigs* e foram desconsideradas das análises seguintes. Foi possível obter fragmentos entre 1300-1500pb de 76 estirpes, que foram submetidas aos bancos de dados BLASTn e RDP para avaliar a identificação molecular das estirpes isoladas. O resultado do sequenciamento revelou a presença de estirpes relacionadas aos filios Actinobacteria, Firmicutes e Proteobacteria (**Tabela 3**). Foram identificados 11 gêneros diferentes, com pelo menos 99% de cobertura e 98% de identidade: *Mycolicibacterium*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella* e *Serratia*.

Tabela 3. Identificação molecular a partir do sequenciamento do gene *rrs* de 76 estirpes bacterianas isoladas de *Tropaeolum majus* L. (capuchinha) a nível de filo, família e gênero.

| Filo | Família | Gênero | Estirpe |
|----------------|--------------------------------|--|--|
| Actinobacteria | Mycobacteriaceae | <i>Mycolicibacterium</i> | E108 |
| Firmicutes | Bacillaceae | <i>Bacillus</i> | E45, E49, E92, E95, E97 |
| | Paenibacillaceae | <i>Paenibacillus</i> | E238 |
| | Staphylococcaceae | <i>Staphylococcus</i> | E12 |
| Proteobacteria | Pseudomonadaceae | <i>Pseudomonas</i> | E69 |
| | Erwiniaceae | <i>Pantoea</i> | E35, E63, E66, E80, E88 |
| | Enterobacteriaceae | <i>Enterobacter</i> | E8, E11, E15, E16, E23, E29, E68, E148, E179 |
| | | <i>Citrobacter</i> | E158 |
| | | <i>Klebsiella</i> | E101 |
| | <i>Raoultella / Klebsiella</i> | E1, E4, E6, E14, E26, E27, E53, E60, E62, E79, E133, E152, E162 | |
| | <i>Serratia</i> | E17, E33, E34, E50, E52, E54, E55, E57, E64, E67, E72, E77, E78, E81, E102, E114, E126, E141, E147, E160, E177, E181, E182, E183, E187, E189, E190, E193, E194, E197, E198, E199, E203, E204, E206, E208, E209, E210 | |

As sequências das estirpes isoladas foram submetidas ao MEGA 10 para a construção de uma árvore filogenética levando em consideração a similaridade (inserções, deleções e substituições nucleotídicas) entre as sequências. Para correlacionar o perfil fenotípico e genotípico das estirpes isoladas da capuchinha, os metadados referentes aos resultados dos testes para seleção de PGPB e à identificação taxonômica das estirpes nos bancos de dados foram incluídos na árvore filogenética gerada (**Figura 19**).

É possível observar que as estirpes do agrupamento filogenético *Raoultella* / *Klebsiella* (em azul – E1, E4, E6, E14, E26, E27, E53, E60, E62, E79, E133, E152 e E162) apresentaram um perfil fenotípico semelhante, e este agrupamento incluiu as estirpes que foram positivas para os 6 testes realizados para seleção de PGPB (**Figura 19**). Ainda, as 5 estirpes com identidade a espécies do gênero *Bacillus* (em laranja – E45, E49, E92, E95 e E97) apresentaram um perfil fenotípico diversificado entre elas e se localizam filogeneticamente distantes na árvore, sugerindo a possibilidade de se tratar de mais de uma espécie de *Bacillus*.

Além disso, é possível notar a formação de dois agrupamentos filogenéticos de estirpes isoladas que apresentaram identidade com espécies do gênero *Serratia*, mas possuíram diferenças fenotípicas (em amarelo – E177, E181, E182, E183, E189, E190, E193, E194, E197, E198, E199, E203, E204, E206, E208, E209 e E210; em roxo – E17, E33, E34, E50, E52, E54, E55, E57, E64, E67, E72, E77, E78, E81, E102, E114, E126, E141, E147, E160 e E187). No primeiro agrupamento (em amarelo), as estirpes isoladas foram majoritariamente produtoras de SAMs e apresentaram um halo translúcido (bolas amarelas, cor mais clara), mas não apresentaram halo no meio FCA (bolas vermelhas). Já no segundo agrupamento (em roxo), a maioria das estirpes apresentou halo no meio FCA mas não no teste para SAMs. Este resultado leva a crer que foram isoladas pelo menos duas espécies diferentes de *Serratia*.

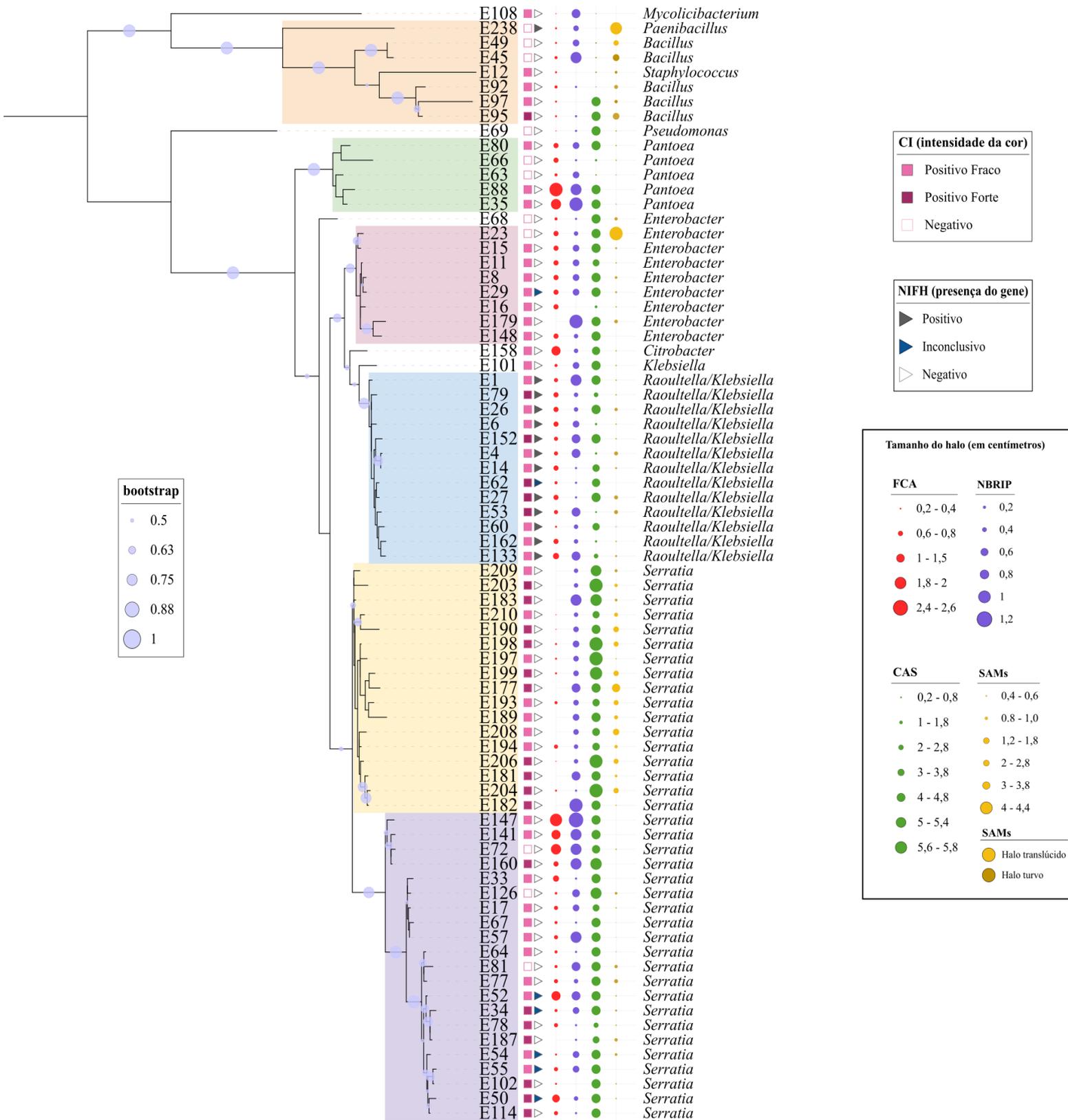


Figura 19. Árvore filogenética das seqüências de parte do gene *rrs* de 76 estirpes isoladas da capuchinha, incluindo os metadados associados aos testes para seleção de PGPB e a identidade de cada estirpe a nível de gênero. A árvore foi gerada utilizando o software MEGA 10 (método *Maximum Likelihood*, *bootstrap*=100) e os metadados foram incluídos utilizando a plataforma iTOL v6. Agrupamentos filogenéticos de maior similaridade foram reunidos com a mesma cor. Valores de *bootstrap* acima de 50% estão representados pelas bolas azuladas acima dos ramos filogenéticos. O resultado referente a intensidade da cor no teste CI (produção de compostos indólicos) está representado pelos quadrados e o teste para detecção da presença do gene *nifH* está representado pelos triângulos. Os diferentes tamanhos das bolas correspondem a variação no tamanho dos halos nos seguintes testes: FCA – mineralização de fósforo orgânico (bolas vermelhas); NBRIP – solubilização de fósforo inorgânico (bolas roxas); CAS – produção de sideróforos (bolas verdes) e SAMs – produção de substâncias antimicrobianas (bolas amarelas). Fonte: figura de autoria própria gerada na plataforma iTOL v6.

As sequências das estirpes isoladas e das bactérias que possuíram maior identidade nos bancos de dados RDP e BLASTn também foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética. Dessa forma, foi possível avaliar quais espécies do banco de dados eram filogeneticamente mais similares (incluindo deleções, inserções e substituições nucleotídicas) às estirpes isoladas. Foram geradas 3 árvores filogenéticas utilizando o *software* MEGA 10 (**Figuras 20, 21 e 22**).

Na **Figura 20**, os clados com as estirpes que mostraram uma maior similaridade com bactérias da família Enterobacteriaceae foram colapsados para melhor visualização da árvore filogenética. É possível notar que a estirpe E69 apresentou similaridade com as espécies *Pseudomonas reinekei*, *P. moraviensis* e *P. fluorescens* e a estirpe E108 com as espécies *Mycolicibacterium fortuitum*, *M. mucogenicum* e *M. phocaicum*. Do filo Firmicutes, as estirpes E97, E95 e E92 apresentaram similaridade com as espécies *Bacillus cereus* e *B. thuringiensis*, enquanto as estirpes E45 e E49 com *Bacillus* sp., não sendo possível a identificação a nível de espécie. A estirpe E238 apresentou similaridade com a espécie *Paenibacillus polymyxa* e a estirpe E12 com as espécies *Staphylococcus pasteurii* e *S. warneri*. Da família Erwiniaceae, as estirpes E66, E80, E63, E35 e E88 apresentaram similaridade com as espécies *Pantoea vagans* e *P. agglomerans*.

A **Figura 21** mostra a mesma árvore filogenética, mas neste caso com os clados referentes à família Enterobacteriaceae em evidência e os demais clados colapsados. É possível notar a formação de um agrupamento filogenético com as sequências com similaridade às espécies *Raoultella ornithinolytica*, *R. terrigena* e *Klebsiella variicola*, incluindo as seguintes estirpes isoladas: E1, E4, E6, E14, E26, E27, E53, E60, E62, E79, E133, E152 e E162. Além disso, a estirpe E101 apresentou similaridade com a espécie *Klebsiella oxytoca*; a estirpe E158 com as espécies *Citrobacter freundii* e *C. braakii*; e as estirpes E8, E11, E15, E16, E23, E29, E68, E148 e E179 com as espécies *Enterobacter asburiae* e *E. cloacae*. Ainda, é possível notar a formação de dois agrupamentos filogenéticos relacionados ao gênero *Serratia*, que foram colapsados para melhor visualização nesta figura.

A **Figura 22** mostra uma árvore filogenética com as sequências que apresentaram uma maior similaridade com as espécies do gênero *Serratia*. Os demais agrupamentos filogenéticos foram ocultados para melhor visualização dos dados. É possível notar que foram formados dois grandes agrupamentos filogenéticos. O primeiro agrupamento incluiu 21 estirpes isoladas: E17, E33, E34, E50, E52, E54, E55, E57, E64, E67, E72, E77, E78, E81, E102, E114, E126, E141,

E147, E160 e E187, apresentando similaridade com as espécies *Serratia entomophila*, *S. ficaria*, *S. plymuthica*, *S. liquefaciens* e *S. grimesii*. Já o segundo agrupamento, que inclui 17 estirpes isoladas, foi formado pelas estirpes E177, E181, E182, E183, E189, E190, E193, E194, E197, E198, E199, E203, E204, E206, E208, E209, E210 que apresentaram similaridade com as espécies *S. nematodiphila*, *S. surfactantfaciens*, *S. marcescens* e *S. ureilytica*.

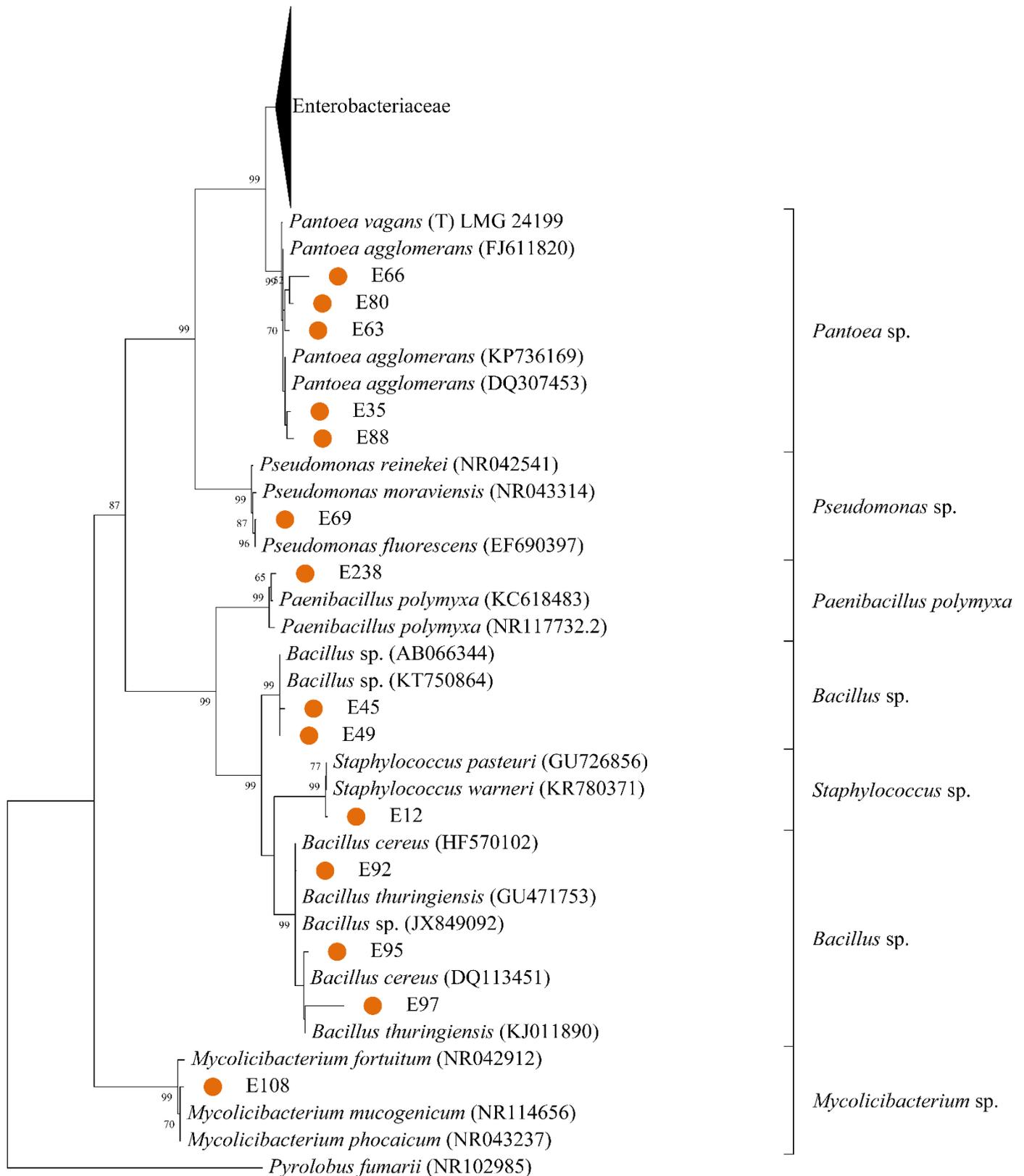


Figura 20. Árvore filogenética mostrando a similaridade das estirpes isoladas através do sequenciamento de parte do gene *rrs*, comparando com as sequências das estirpes de maior identidade depositadas no banco de dados RDP (*Ribosomal Database Project*) e BLASTn. As bolas laranjas destacam as estirpes isoladas e os colchetes enfatizam a classificação taxonômica mais provável das estirpes. Os clados referentes às estirpes que apresentaram similaridade com a família Enterobacteriaceae foram colapsados nesta figura. A análise foi gerada utilizando o software MEGA 10, com o método *Maximum likelihood* e com um *bootstrap* de 500. Fonte: figura de autoria própria gerada no software MEGA 10.

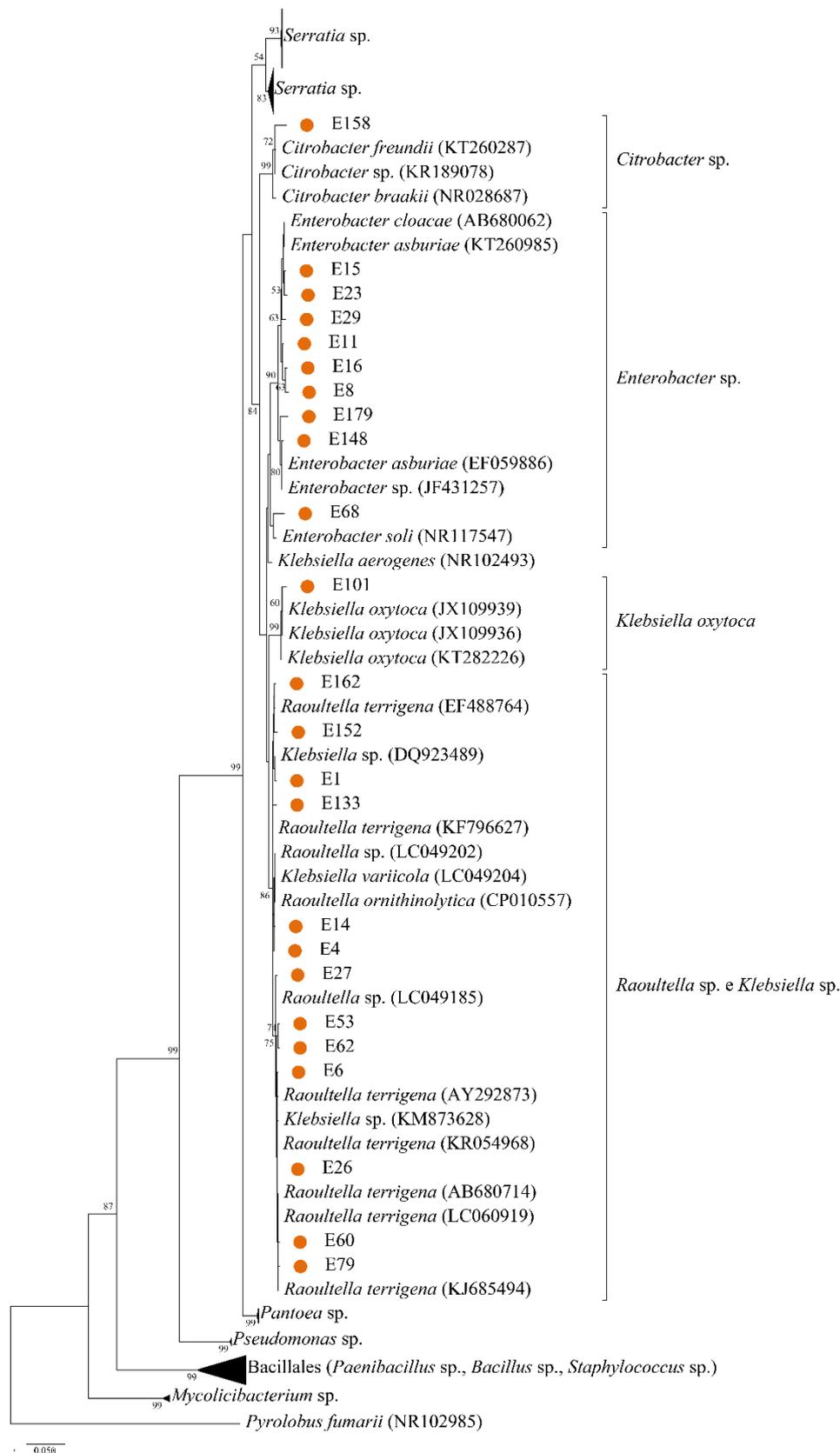


Figura 21. Árvore filogenética mostrando a similaridade das estirpes isoladas através do sequenciamento de parte do gene *rrs*, comparando com as sequências das estirpes de maior identidade depositadas no banco de dados RDP (*Ribosomal Database Project*) e BLASTn. As bolas laranjas destacam as estirpes isoladas e os colchetes enfatizam a classificação taxonômica mais provável das estirpes. Com exceção do gênero *Serratia*, os clados referentes às estirpes que apresentaram uma maior similaridade com a família Enterobacteriaceae estão em evidência nesta figura e os demais clados estão colapsados. A análise foi gerada utilizando o *software* MEGA 10, com o método *Maximum likelihood* e com um *bootstrap* de 500. Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* MEGA 10.

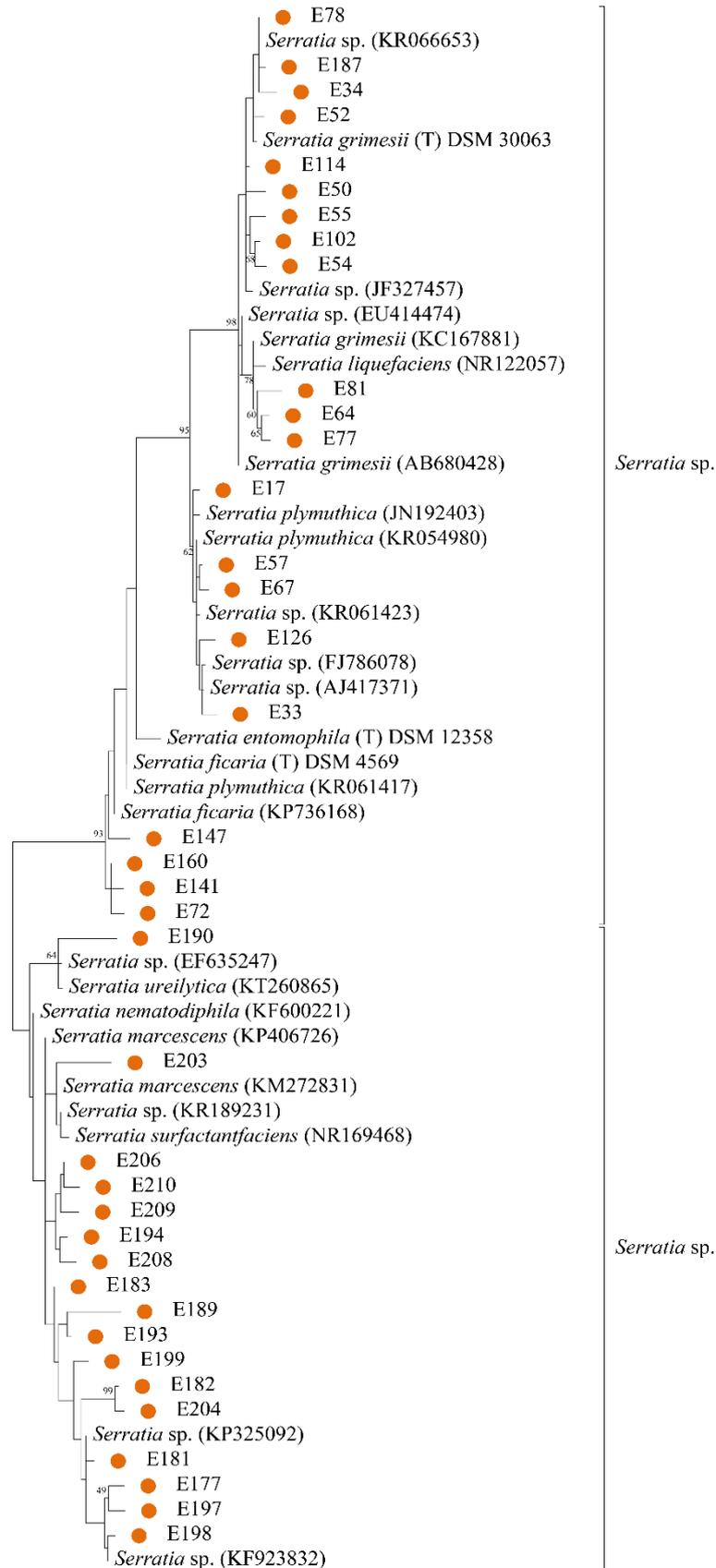
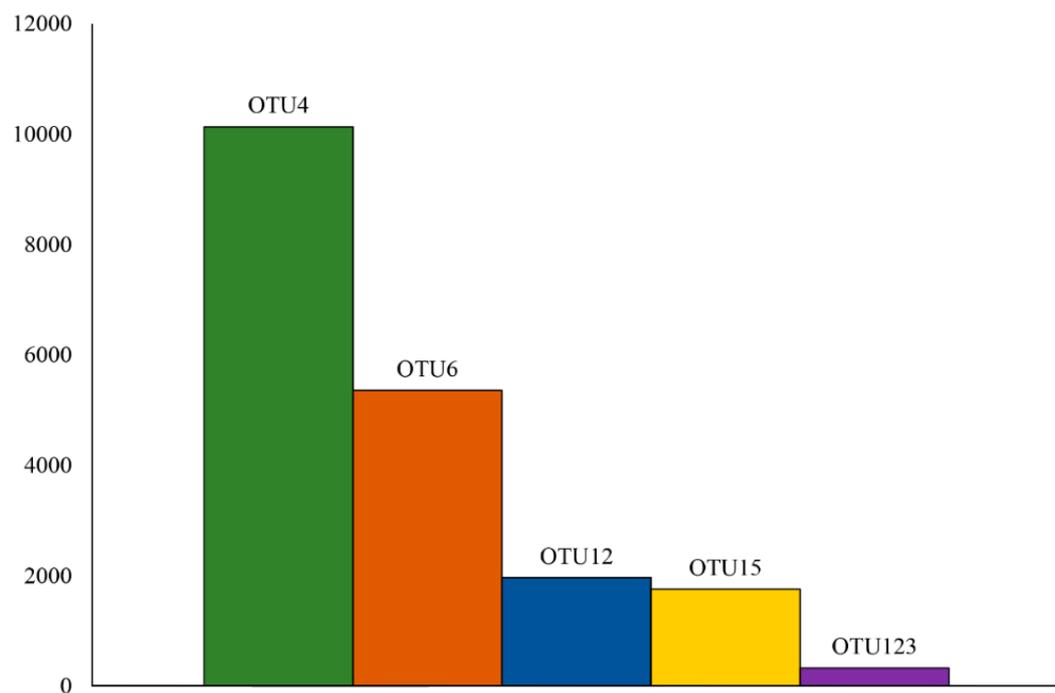


Figura 22. Árvore filogenética mostrando a similaridade das estirpes isoladas através do sequenciamento de parte do gene *rrs*, comparando com as sequências das estirpes de maior identidade depositadas no banco de dados RDP (*Ribosomal Database Project*) e BLASTn. As bolas laranjas destacam as estirpes isoladas e os colchetes enfatizam a classificação taxonômica mais provável das estirpes. A figura evidencia os dois agrupamentos com similaridade a espécies do gênero *Serratia* e os demais agrupamentos foram ocultados. A análise foi gerada utilizando o *software* MEGA 10, com o método *Maximum likelihood* e com um *bootstrap* de 500. Fonte: figura de autoria própria gerada no *software* MEGA 10.

5.2. Comparação entre a composição da comunidade bacteriana total endofítica e as estirpes isoladas da região endofítica da capuchinha

A fim de correlacionar os resultados obtidos nas duas técnicas de estudo de microbiomas utilizadas (dependente e independente de cultivo) foi feita uma comparação entre as sequências obtidas pelo sequenciamento da comunidade bacteriana total e das estirpes isoladas, ambas da região endofítica da capuchinha. Foram identificadas 5 OTUs compartilhadas entre as sequências da comunidade bacteriana total das 5 réplicas das amostras da região endofítica e as sequências das estirpes isoladas (**Figura 23**).

Cerca de 10.000 sequências foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* (correspondendo a OTU4) na comunidade bacteriana endofítica, semelhante às sequências das estirpes isoladas E45 e E49. Do mesmo modo, 5.357 sequências foram identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (OTU6), semelhante à sequência da estirpe E69. Aproximadamente 2.000 sequências foram identificadas como pertencentes ao gênero *Bacillus* (OTU12) – diferentes das citadas anteriormente – semelhantes às estirpes E92 e E95. Além disso, 1.772 sequências foram identificadas como pertencentes ao gênero *Serratia* (OTU15), semelhantes às estirpes isoladas: E17, E33, E34, E50, E52, E54, E55, E57, E64, E67, E75, E77, E81, E102, E114 e E126. Por fim, 327 sequências foram identificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* (OTU 123) na comunidade bacteriana endofítica, com semelhança à sequência da estirpe E12.



| | |
|-------------------------|--|
| ■ <i>Bacillus</i> | E45, E49 |
| ■ <i>Pseudomonas</i> | E69 |
| ■ <i>Bacillus</i> | E92, E95 |
| ■ <i>Serratia</i> | E17, E33, E34, E50, E52, E54, E55, E57, E64, E67, E75, E77, E78, E81, E102, E114, E126 |
| ■ <i>Staphylococcus</i> | E12 |

Figura 22. OTUs compartilhadas entre as sequências de parte do gene *rrs* das estirpes isoladas da capuchinha e da comunidade bacteriana total da região endofítica da capuchinha. O eixo y mostra o número de sequências de cada uma das 5 OTUs compartilhadas. A tabela mostra a classificação taxonômica mais próxima das OTUs a nível de gênero e as estirpes isoladas que foram incluídas nas respectivas OTUs. Fonte: figura de autoria própria gerada com auxílio do *software* Microsoft Excel.

6. DISCUSSÃO

A interação entre microrganismos-planta é influenciada principalmente pela composição dos exsudatos radiculares liberados pela planta e pela composição físico-química do solo (MARSCHNER *et al.*, 2001). Nesse contexto, a utilização de adubação orgânica favorece a fertilidade do solo e, conseqüentemente, resulta em um aumento na biomassa microbiana e favorece a interação metabólica entre esses microrganismos (MBUTHIA *et al.*, 2015). É possível observar na **Tabela 1** que as características físico-químicas do solo, como por exemplo, o pH (próximo de 5,9), a concentração de fósforo (P – acima de 80mg/dm³), relação carbono e nitrogênio (C/N – abaixo de 20) e os teores de cálcio (Ca – acima de 4cmolc/dm³) e magnésio (Mg – acima de 1cmolc/dm³), estavam nas concentrações ideais para o cultivo agrícola (CARDOSO, FERNANDES & FERNANDES, 2009; PREZOTTI & GUARÇONI, 2013). Além disso, a ausência de alumínio (Al) no solo também é um fator que favorece a fertilidade, visto que a presença de Al pode ser tóxica às plantas, interferir no crescimento radicular e afetar a absorção de nutrientes (CARDOSO, FERNANDES & FERNANDES, 2009).

As condições bióticas e abióticas que afetam o solo – como o pH, a temperatura e a concentração de oxigênio – são altamente variáveis e influenciam a estrutura da comunidade microbiana (FIERER, 2017). A proximidade do solo à raiz de plantas também é um fator que influencia a comunidade microbiana, devido à liberação de exsudatos radiculares pela planta (FIERER, 2017). Esses exsudatos alteram a composição físico-química do solo associado à planta devido a uma maior disponibilidade de nutrientes e podem levar a alterações no pH e na disponibilidade de água, por exemplo (SANTOYO *et al.*, 2016). Por isso, a rizosfera é uma região que irá propiciar uma maior competição entre microrganismos, favorecendo principalmente aqueles que possuem maior motilidade e capacidade de produção de polissacarídeos, característica importante para a adesão à raiz da planta (SANTOYO *et al.*, 2016). Ainda, uma parcela menor dos microrganismos que colonizam a região rizosférica é capaz de colonizar os tecidos internos da planta. Os microrganismos endofíticos necessitam de mecanismos para sobreviver ao sistema imune da planta e parece existir genes específicos associados à colonização endofítica (LIU *et al.*, 2017).

Além disso, a utilização de compostos orgânicos para adubação parece resultar em uma maior proliferação de PGPB (KURODA *et al.*, 2020), no aumento da atividade supressora contra microrganismos fitopatogênicos (ZHAO *et al.*, 2018) e na possível melhora da

produtividade agrícola (WANG *et al.*, 2016). No presente trabalho, 95% das estirpes bacterianas isoladas do interior das raízes de capuchinha apresentaram pelo menos uma característica de PGPB, sendo cerca de 40% das estirpes positivas para pelo menos 4 dos testes realizados para caracterizar as PGPB (**Figura 18b**). Portanto, possivelmente há uma influência da adubação orgânica na proliferação de PGPB associadas às raízes de capuchinha.

É importante ressaltar que a técnica de isolamento de bactérias apresenta limitações. O meio de cultura, a temperatura e o tempo de incubação utilizados são apenas alguns dos fatores que contribuem para “A Grande Anomalia da Contagem da Placa”: apenas uma pequena parcela dos microrganismos totais presentes na natureza é recuperada através da técnica de isolamento (EPSTEIN, 2009). Além disso, diferentes microrganismos podem apresentar a mesma morfologia colonial e/ou uma única estirpe também pode apresentar morfologias coloniais diferentes (SOUSA *et al.*, 2013). Portanto, a seleção dos diferentes morfotipos coloniais é um processo influenciado por potenciais erros humanos e pode resultar na perda de informações.

Além disso, os testes realizados para a detecção de características de PGPB também apresentam limitações. A produção de CI, por exemplo, é fortemente influenciada pela temperatura e quantidade de triptofano no meio (HARIKRISHNAN, SHANMUGAIAH & BALASUBRAMANIAN, 2014). Diferentes estirpes bacterianas também podem atingir o pico de produção de CI antes ou depois de 72 horas, variando entre o 2º e o 8º dia de incubação (BHARUCHA, PATEL & TRIVEDI, 2013). No presente trabalho, os resultados referentes tanto à produção de CI quanto às outras metodologias que utilizaram meios de cultura (SAMs, CAS, FCA, NBRIP) podem ter sido influenciados pelos fatores citados. Entretanto, os testes realizados possibilitam uma compreensão preliminar do potencial das estirpes isoladas e podem ser aprofundados futuramente, como por exemplo, através de testes para quantificação de fosfato solubilizado em meio líquido contendo fosfato de cálcio (SARIKHANI, KHOSHRU & GREINER, 2019).

A técnica de PCR também possui vieses, como por exemplo, a especificidade dos iniciadores utilizados (WOODMAN, 2008). A PCR que utiliza parte da colônia bacteriana como fonte de DNA molde pode contribuir para o aparecimento de falsos negativos por diversos motivos, como a quantidade de colônia inserida em cada reação de PCR (maior quantidade de debris celulares podem interferir na reação; WOODMAN, 2008). Essa variedade de fatores pode explicar a baixa porcentagem de bactérias positivas para o teste de detecção do gene *nifH* (**Figura 18a**). Posteriormente, a realização de testes quantitativos será necessária para uma

caracterização mais precisa das estirpes selecionadas. A técnica de redução de acetileno por cromatografia gasosa, por exemplo, pode ser utilizada para comprovar a capacidade de fixação de nitrogênio das estirpes (SOPER, SIMON & JAUSS, 2021).

Apesar das limitações inerentes às técnicas dependentes de cultivo e moleculares utilizadas, essas metodologias são fundamentais para o estudo de comunidades microbianas. As técnicas de isolamento possibilitam a recuperação de microrganismos que podem não ser detectados pela técnica de sequenciamento, devido a especificidade dos iniciadores, por exemplo (GUTIERREZ *et al.*, 2015). No presente estudo, o sequenciamento da comunidade bacteriana total não foi capaz de detectar uma alta abundância relativa do gênero *Serratia* na região endofítica da capuchinha (**Figura 13c**); entretanto, as estirpes isoladas da região endofítica foram majoritariamente pertencentes a este gênero (**Tabela 3**). Sendo assim, a associação de técnicas de isolamento e moleculares podem trazer uma compreensão mais exata da microbiota das plantas.

O sequenciamento de parte do gene *rrs* da comunidade bacteriana total foi realizado para analisar a estrutura e a composição da comunidade bacteriana associada à capuchinha. Em relação à alfa-diversidade da comunidade bacteriana é possível notar na **Tabela 2** e **Figura 9** que houve uma tendência de redução gradual de riqueza e diversidade da comunidade bacteriana do solo não-rizosférico para a rizosfera e para a região endofítica. Esse padrão foi observado em vários outros estudos (SEGHERS *et al.*, 2004; EDWARDS *et al.*, 2015; YAMAMOTO *et al.*, 2018) e nos leva a crer que quanto mais íntima é a interação bactéria-planta, mais especializadas são as bactérias capazes de colonizar a planta. Além disso, a análise de beta-diversidade (**Figura 10**) mostra que houve uma tendência de separação entre as comunidades bacterianas endofítica, rizosférica e do solo não-rizosférico, e foi estatisticamente significativa a separação da comunidade do solo não-rizosférico das demais. Esse resultado mostra que ocorre uma compartimentalização da comunidade bacteriana, que possuiu uma estrutura da comunidade particular em cada microambiente analisado.

A análise das OTUs formadas a partir do sequenciamento revelou que os filos mais abundantes na comunidade bacteriana endofítica e rizosférica foram Proteobacteria (54,5% e 60,9%, respectivamente), Actinobacteria (8,6% e 10,5%, respectivamente) e Firmicutes (16% e 5,68%, respectivamente), totalizando mais de 77% da população das amostras das regiões endofítica e rizosférica. Já na comunidade bacteriana do solo não-rizosférico, os filos de maior abundância relativa foram Proteobacteria (41,8%), Actinobacteria (19,2%) e Acidobacteria

(9,3%). Esses resultados corroboram com outros trabalhos realizados em outras espécies de plantas, em solos ricos em matéria orgânica e com os resultados semelhantes aos obtidos no isolamento de bactérias da região endofítica da capuchinha (HARDOIM *et al.*, 2015; BARKA *et al.*, 2016; PROENÇA *et al.*, 2017; TIAN & ZHANG, 2017; WANG *et al.*, 2018; **Tabela 3**).

A formação de OTUs associadas ao filo Proteobacteria foi dominante nas comunidades bacterianas dos três microambientes analisados, sendo significativamente mais abundante na comunidade rizosférica do que na comunidade do solo não-rizosférico (**Figura 11**). Este filo inclui microrganismos de vida livre, fitopatogênicos e potenciais PGPB (BRUTO *et al.*, 2014), o que poderia explicar uma maior abundância relativa próximo à planta. Deste filo, os gêneros *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sphingomonas* se destacaram na comunidade bacteriana rizosférica (**Figura 13**). Os gêneros *Pseudomonas* e *Sphingomonas* incluem espécies que apresentam a capacidade de promoção de crescimento da planta como, por exemplo, através de mecanismos de tolerância a estresse hídrico (LUGTENBERG, DEKKERS & BLOEMBERG, 2001; LUO *et al.*, 2019). Já o gênero *Rhizobium*, comumente presente na região rizosférica de plantas, possui espécies simbióticas e de vida-livre associadas à fixação biológica de nitrogênio (WHEATLEY *et al.*, 2020).

Uma maior abundância relativa da família Enterobacteriaceae também foi observada na comunidade bacteriana rizosférica (**Figura 12**). Devido aos nutrientes liberados pelos exsudatos radiculares da planta, é comum encontrar na região rizosférica espécies da família Enterobacteriaceae, pois esta família é diversa e inclui bactérias especializadas na metabolização de diferentes compostos. Bactérias da família Enterobacteriaceae são consideradas boas candidatas para o desenvolvimento de bioinoculantes, devido a sua diversidade metabólica (BARRAQUIO *et al.*, 2000). Entretanto, é importante avaliar a patogenicidade das estirpes individualmente, visto que muitas espécies associadas à família Enterobacteriaceae são consideradas patógenos humanos (SANTOS, NOGUEIRA & HUNGRIA, 2019).

Já os filios Actinobacteria e Acidobacteria foram significativamente mais abundantes na comunidade do solo não-rizosférico do que nas regiões endofítica e rizosférica (**Figura 11**). De uma forma geral, Acidobacteria e Actinobacteria são filios ubíquos no solo, comumente presentes em solos ricos em matéria orgânica e incluem bactérias que são consideradas peças-chave na funcionalidade do solo (BARKA *et al.*, 2016; KALAM *et al.*, 2020). Além disso, o filo Verrucomicrobia também foi significativamente maior na comunidade bacteriana do solo

não rizosférico do que na comunidade endofítica e rizosférica (**Figura 11**). A relevância de Verrucomicrobia no solo tem sido associada à presença de organismos eucarióticos, como nematóides, que modulam a microbiota local e podem aumentar a abundância relativa desse filo (BERGMANN *et al.*, 2011).

A análise LEfSe mostrou que as OTUs associadas às ordens Actinomycetales e Myxococcales foram enriquecidas na comunidade do solo não-rizosférico quando comparadas com as da rizosfera e endofítica (**Figuras 15 e 16**). De uma forma geral, os táxons mais enriquecidos na comunidade do solo não-rizosférico estão associados à degradação de compostos orgânicos no solo. A abundância relativa de Myxococcales é maior em solos de agricultura orgânica, quando comparada a solos de agricultura convencional, visto que esta ordem inclui bactérias extremamente adaptadas às mais diversas condições do solo e possuem um papel importante na regulação da comunidade bacteriana do solo por possuírem atividade predatória contra outros microrganismos (WANG *et al.*, 2020). A ordem Actinomycetales, normalmente encontrada em maior abundância relativa no solo, possui espécies associadas à degradação de metais pesados e de compostos orgânicos (YEAGER *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2018).

Na comunidade bacteriana rizosférica, as OTUs correspondentes à ordem Rhizobiales foram enriquecidas quando comparada com as comunidades de solo não-rizosférico e endofítica (**Figuras 15 e 17**). Esta ordem inclui bactérias fixadoras de nitrogênio, como por exemplo, bactérias do gênero *Rhizobium* (WANG *et al.*, 2020). Por fim, na comunidade bacteriana endofítica, as OTUs associadas à família Rhodospirillaceae que também inclui espécies associadas ao ciclo do nitrogênio (BALDANI *et al.*, 2014) foram enriquecidas em relação às comunidades do solo não-rizosférico e da rizosférica (**Figuras 16 e 17**).

É possível notar na **Figura 12** que as OTUs associadas às famílias Burkholderiaceae e Planococcaceae foram dominantes na comunidade bacteriana endofítica e apresentaram uma abundância relativa significativamente maior que nas comunidades de R e S. Ambas as famílias citadas incluem espécies que possuem características de PGPB (DAI, LIU & WANG, 2014; SHURINGIN *et al.*, 2020). Entretanto, a alta abundância relativa da família Burkholderiaceae parece estar associada à dominância do gênero *Ralstonia* na região endofítica (**Figura 13**), conforme será discutido a seguir. Além disso, os gêneros *Pseudomonas* e *Paenibacillus* também foram dominantes na região endofítica, sendo o gênero *Paenibacillus* significativamente mais abundante na comunidade endofítica do que na rizosférica (**Figura 17**). É importante ressaltar

que estirpes de ambos os gêneros foram isoladas da região endofítica da capuchinha (**Tabela 2**), corroborando com este resultado. As espécies *Pseudomonas fluorescens* (DAVID, CHANDRASEHAR & SELVAM, 2018), *Pseudomonas entomophila* (ANSARI & AHMAD, 2018), *Paenibacillus polymyxa* (PADDA, PURI & CHANWAY, 2017) e *Paenibacillus elgii* (KIM, HUR & PARK, 2019) são alguns exemplos de PGPB com potencial para aplicação como bioinoculantes.

O gênero *Ralstonia* compreende espécies patogênicas oportunistas e fitopatogênicas. As espécies patogênicas oportunistas são transmitidas em humanos principalmente através de soluções aquosas contaminadas, como água para injetáveis, e se estabelecem principalmente em hospedeiros imunossuprimidos (RYAN & ADLEY, 2014). Atualmente, as espécies fitopatogênicas estão agrupadas em um complexo de espécies, chamado RSSC (*Ralstonia solanacearum species complex*) que possuem diferentes características fenotípicas, genotípicas e hospedeiros suscetíveis variados, podendo afetar mais de 200 espécies de plantas (HAYWARD, 1991; RYAN & ADLEY, 2014).

As diferentes estirpes que compõem o RSSC causam uma doença – comumente chamada de “murcha bacteriana” – que se inicia pela colonização na região rizosférica da planta, seguida de invasão da região endofítica e disseminação pela planta (GENIN & DENNY, 2012). Os sintomas variam entre os diferentes hospedeiros e podem envolver a murcha e o amarelamento das folhas jovens e a obstrução vascular da planta devido à multiplicação do patógeno e à produção de polissacarídeos pelo mesmo (GARCÍA, KERNS & THIESSEN, 2019). Em 2012, a doença causada pelo RSSC foi considerada a segunda fitopatologia de maior importância econômica e científica no mundo (MANSFIELD *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que raramente são encontradas abundâncias relativas do gênero *Ralstonia* superiores a 1% em plantas saudáveis (HU *et al.*, 2020). Em 2020, Elsayed e colaboradores observaram que tomateiros contaminados com *R. solanacearum* apresentaram uma abundância relativa do gênero de aproximadamente 35% na região rizosférica, enquanto rizosferas não-contaminadas apresentaram uma abundância relativa de 0%. As plantas contaminadas morreram 14 dias após a infecção. Em 1976, Olssen realizou uma contaminação artificial de diversas espécies de plantas com *R. solanacearum* e observou que a capuchinha era uma das plantas que apresentavam susceptibilidade ao fitopatógeno. Entretanto, não há na literatura trabalhos que descrevam uma contaminação natural da capuchinha por *R. solanacearum*.

Campisano e colaboradores (2014) também encontraram uma alta abundância relativa do gênero *Ralstonia* na região endofítica de videiras e associaram o caso ao final do ciclo vegetativo da planta. Outros trabalhos descreveram uma alta abundância relativa do gênero *Ralstonia* em alface (JACKSON *et al.*, 2013) e em árvores no outono e inverno (SHEN & FULTHORPE, 2015). Entretanto, em nenhum dos trabalhos citados as plantas apresentavam sintomas. É possível notar na **Figura 3** a presença de sintomas na capuchinha, como amarelamento e murcha das folhas e flores. Portanto, é levantada a hipótese de que as plantas de capuchinha coletadas poderiam estar infectadas por um microrganismo fitopatogênico no momento da coleta, potencialmente associado ao RSSC.

Em 2010, Sarr e colaboradores analisaram uma possível estirpe de *Ralstonia* endofítica que aparentemente possuía uma relação não-patogênica com o hospedeiro. Posteriormente, a estirpe foi reclassificada no gênero *Cupriviadus*. Ainda, Wei e colaboradores (2013) isolaram uma estirpe de *Ralstonia picketti* com atividade contra o *Ralstonia solanacearum*, sendo assim uma possível candidata a utilização como bioinoculante. Por fim, Zhang e colaboradores (2011) também isolaram uma estirpe endofítica do gênero *Ralstonia* capaz de promover crescimento em plantas. Portanto, estudos mais detalhados serão necessários para determinar a relação ecológica entre o gênero *Ralstonia* e a capuchinha. Ainda, é necessário elucidar se há de fato uma correlação negativa entre a abundância relativa do gênero *Ralstonia* na região endofítica e rizosférica e se este fator pode estar associado à fitopatologia do RSSC e ao desenvolvimento de sintomas na planta (**Figura 14**).

Em relação à seleção e à identificação de PGPB, 76 estirpes isoladas foram identificadas molecularmente e foram distribuídas entre 11 gêneros diferentes, sendo 1 gênero do filo Actinobacteria, 3 do filo Firmicutes e 7 do filo Proteobacteria (**Tabela 3**). O gênero *Mycolicibacterium*, do filo Actinobacteria, foi criado em 2018 pela presença de diferenças filogenéticas entre algumas espécies do gênero *Mycobacterium* (GUPTA, LO & SON, 2018). Neste novo gênero, estão incluídas estirpes que possuem genes associados à promoção de crescimento e à indução de tolerância a estresses bióticos e abióticos em plantas e, portanto, possíveis candidatas para serem utilizadas como bioinoculantes (DEL BARRIO-DUQUE *et al.*, 2019).

O gênero *Bacillus* pertencente ao filo Firmicutes é um dos mais estudados para uso como bioinoculante e possui espécies com propriedades variadas de disponibilização de nutrientes e hormônios para a planta, atividade contra fitopatógenos e tolerância a estresses hídrico e salino

(BOKHARI *et al.*, 2019). Ainda, o gênero *Paenibacillus* inclui espécies capazes de fixar o nitrogênio atmosférico, solubilizar o fosfato, produzir sideróforos e liberar fitormônios (DAUD *et al.*, 2019). Apesar do gênero *Staphylococcus* não ser comumente utilizado como inoculante, Jayakumar e colaboradores (2020) isolaram uma bactéria endofítica da cúrcuma (*Curcuma longa*), identificada molecularmente como pertencente ao gênero *Staphylococcus*, capaz de tolerar estresse hídrico, produzir CI e favorecer a captação de macro e micronutrientes para a planta. O inóculo desta estirpe de *Staphylococcus* sp. *in vivo* em plantas da espécie *Vigna unguiculata* (feijão-fradinho) foi capaz de promover o crescimento da planta, mesmo em condições de estresse hídrico. Os autores propuseram então a utilização desta estirpe como bioinoculante (JAYAKUMAR *et al.*, 2020).

Os gêneros identificados como pertencentes ao filo Proteobacteria também podem promover o crescimento de plantas. O gênero *Pantoea* possui espécies cujas estirpes estão principalmente associadas à solubilização de fosfato inorgânico (CHEN *et al.*, 2014, **Figura 19**). Já o gênero *Enterobacter* inclui estirpes endofíticas capazes de se adaptar a diferentes espécies de plantas e também podem conferir resistência a fatores de estresse (ANDRÉS-BARRAO *et al.*, 2017). A utilização de bactérias pertencentes aos gêneros *Klebsiella* e *Serratia* como bioinoculantes tem sido bastante explorada, principalmente devido à capacidade de diferentes estirpes serem fixadoras de nitrogênio e apresentarem atividade contra fitopatógenos, respectivamente (LIU *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2015; **Figura 19**). O gênero *Raoutella* inclui apenas quatro espécies bacterianas e se trata de uma subdivisão do gênero *Klebsiella*. Em 2014, Hudson e colaboradores ressaltaram que os gêneros *Klebsiella* e *Raoutella* são geneticamente similares entre si, dificultando a separação filogenética entre as espécies dos gêneros e sugerindo o abandono do gênero *Raoutella*. Entretanto, a separação filogenética entre os dois gêneros continuou sendo utilizada em trabalhos posteriores (SÊKOWSKA, MIKUCKA & GOSPODAREK-KOMKOWSKA, 2018; SÊKOWSKA *et al.*, 2020). Recentemente a reunificação dos gêneros *Klesbiella* e *Raoultella* foi novamente proposta (MA *et al.*, 2021).

Por fim, foi realizada uma comparação entre as OTUs formadas a partir do sequenciamento da comunidade bacteriana total endofítica e das estirpes isoladas da região endofítica da capuchinha (**Figura 22**). As estirpes presentes de forma viável e cultivável na comunidade bacteriana das 5 diferentes plantas de capuchinha foram: E45 e E49 (*Bacillus* sp.); E69 (*Pseudomonas* sp.); E92 e E95 (*Bacillus* sp.); E17, E33, E34, E50, E52, E54, E55, E57, E64, E67, E75, E77, E78, E81, E102, E114 e E126 (*Serratia* sp.) e E12 (*Staphylococcus* sp.). É levantada a hipótese de que em uma aplicação destas estirpes como bioinoculantes, a

colonização prévia das mesmas na capuchinha poderia facilitar o estabelecimento dessas bactérias na planta. Ainda nos resta comprovar se as estirpes isoladas, pertencentes a cada um dos gêneros, são diferentes ou tem origem clonal. Para esclarecer esta dúvida, levando em uma BOX-PCR das estirpes do gênero *Bacillus* e *Serratia* pode auxiliar na detecção de potenciais clones. Posteriormente, estudos *in vivo* em casa de vegetação também serão necessários para avaliar o potencial de promoção de crescimento das estirpes isoladas da capuchinha.

7. CONCLUSÕES

- Os três microambientes analisados (solo não-rizosférico, rizosfera e região endofítica) apresentam uma composição da comunidade bacteriana específica a cada um deles.
- Em relação à alfa-diversidade da comunidade bacteriana total, foi observado que quanto maior a influência da comunidade bacteriana pela planta, menor a diversidade e a riqueza de espécies bacterianas encontradas na região endofítica da capuchinha.
- Os táxons mais enriquecidos nas comunidades bacterianas presentes na rizosfera e no interior das raízes de capuchinha estão associados à disponibilização de nutrientes, como fósforo e nitrogênio, para a planta.
- A comunidade bacteriana do solo não-rizosférico apresentou uma maior abundância relativa dos filos Actinobacteria e Acidobacteria. Estes filos incluem bactérias consideradas peças-chave na degradação de compostos orgânicos no solo.
- Setenta e seis estirpes bacterianas endofíticas isoladas foram positivas para pelo menos 4 dos 6 testes de seleção de PGPB realizados e foram identificadas molecularmente. A maioria das estirpes isoladas pertencem aos gêneros *Serratia*, *Klebsiella* e *Raoutella*.
- Vinte e três estirpes bacterianas isoladas da capuchinha, associadas aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Serratia*, foram encontradas pelos dois métodos de análise utilizados (isolamento e sequenciamento). A utilização destas estirpes para o desenvolvimento de um possível bioinoculante é promissora. Entretanto, ainda são necessários testes *in vivo* em casa de vegetação e, posteriormente, em campo para avaliar a capacidade de promoção de crescimento da capuchinha pelas estirpes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDI, H. & WILLIAMS, L. J. **Newman-Keuls test and Tukey test.** *Encyclopedia of research design*, 1-11, 2010.
- ABREU, N.C. & DINIZ, J.C. **As Vantagens da Introdução das Plantas Alimentícias Não Convencionais na Alimentação dos Beneficiários do Bolsa Família da Estratégia Saúde da Família Bernardo Valadares, em Sete Lagoas - MG.** *Revista Brasileira de Ciências da Vida*, 5(4), 1-16, 2017.
- ANDERSON, M. J. **Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA).** *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online*, 1-15, 2014.
- ANDRÉS-BARRAO, C., LAFI, F.F., ALAM, I., DE ZÉLICOURT, A., EIDA, A.A., BOKHARI, A., ALZUBAIDY, H., BAJIC, V.B., HIRT, H. & SAAD, M.M. **Complete Genome Sequence Analysis of *Enterobacter* sp. SA187, a Plant Multi-Stress Tolerance Promoting Endophytic Bacterium.** *Frontiers in Microbiology*, 8, 2023, 2017.
- ANGEL, R., NEPEL, M., PANHÖLZL, C., SCHMIDT, H., HERBOLD, C. W., EICHORST, S. A. & WOEBKEN, D. **Evaluation of Primers Targeting the Diazotroph Functional Gene and Development of NifMAP - A Bioinformatics Pipeline for Analyzing *nifH* Amplicon Data.** *Frontiers in Microbiology*, 9, 703, 2018.
- ANNAPURNA, K., KUMAR, A., LAKKINENI, V., GOVINDASAMY, V., BOSE, P. & RAMADOSS, D. **PGPR-Induced Systemic Resistance (ISR) in Plant Disease Management.** In: *Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management* (Springer, Berlin, Heidelberg), 405-425, 2013.
- ANSARI, F. A. & AHMAD, I. **Biofilm development, plant growth promoting traits and rhizosphere colonization by *Pseudomonas entomophila* FAP1: a promising PGPR.** *Advances in Microbiology*, 8(03), 235, 2018.
- BABALOLA, O. **Beneficial bacteria of agricultural importance.** *Biotechnology Letters*, 32, 1559-1570, 2010.
- BALDANI, J. I., VIDEIRA, S. S., DOS SANTOS TEIXEIRA, K. R., REIS, V. M., DE OLIVEIRA, A. L. M., SCHWAB, S., SOUZA, E.M., PEDRAZA, R.O., BALDANI, V.L.D. & HARTMANN, A. **The family Rhodospirillaceae.** In: *The prokaryotes* (Springer, Berlin, Heidelberg), 533-618, 2014.
- BARKA, E. A., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., KLENK, H. P., CLÉMENT, C., OUHDOUCH, Y. & VAN WEZEL, G.P. **Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80, 1–43, 2016.
- BARRAQUIO, W.L., SEGUBRE, E.M., GONZALEZ, M.S, VERMA, S.C., JAMES, E.K., LADHA, J.K. & TRIPATHI, A.K. **Diazotrophic enterobacteria: What is their role in the rhizosphere of rice?** In: *The Quest for Nitrogen Fixation in Rice* (IRRI, Philippines), 93–118, 2000.
- BASU, A., PRASAD, P., DAS, S.N., KALAM, S., SAYYED, R.Z., REDDY, M.S. & EL ENSHASY, H. **Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects.** *Sustainability*, 13(3), 1140, 2021.
- BAZYLKO, A., GRANICA, S., FILIPEK, A., PIWOWARSKI, J.P., STEFAŃSKA, J., OSIŃSKA, E. & KISS, A.K. **Comparison of antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activity and chemical composition of aqueous and hydroethanolic extracts of the herb of *Tropaeolum majus* L.** *Industrial Crops and Products*, 50, 88-94, 2013.
- BÉLANGER, J. & PILLING, D. **The State of the World's Biodiversity for Food and Agriculture in FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture Assessments.** In: *Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO* (Rome, Italy), 572, 2019.

BÉLIVEAU, A., LUCOTTE, M., DAVIDSON, R., PAQUET, S., MERTENS, F., PASSOS, C. J. & ROMANA, C. A. **Reduction of soil erosion and mercury losses in agroforestry systems compared to forests and cultivated fields in the Brazilian Amazon.** *Journal of environmental management*, 203(Pt1), 522–532, 2017.

BENEDUZI, A., AMBROSINI, A. & PASSAGLIA, L. M. **Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents.** *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 (suppl)), 1044-1051, 2012.

BENT, E., TUZUN, S., CHANWAY, C.P. & ENEBAK, S. **Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria.** *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 793-800, 2001.

BERGMANN, G., BATES, S., EILERS, K., LAUBER, C., CAPORASO, J., WALTERS, W., KNIGHT, R. & FIERER, N. **The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities.** *Soil Biology and Biochemistry*, 43, 1450–1455, 2011.

BHARUCHA, U., PATEL, K. & TRIVEDI, U.B. **Optimization of Indole Acetic Acid Production by Pseudomonas putida UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*).** *Agricultural Research*, 2, 215–221, 2013.

BISWAS, K.R. & RAHMATULLAH, M. **A Survey of Non-conventional Plants Consumed During Times of Food Scarcity in Three Adjoining Villages of Narail and Jessore Districts, Bangladesh.** *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 5, 1-5, 2011.

BOKHARI, A., ESSACK, M., LAFI, F.F. ANDRES-BARRAO, C., JALAL, R., ALAMOUDI, S., RAZALI, R., ALZUBAIDY, H., SHAH, K.H., SIDDIQUE, S., BAJIC, V.B., HIRT, H. & SAAD, M.M. **Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance.** *Scientific Reports*, 9, 18154, 2019.

BRONDANI, J., CUELHO, C., MARANGONI, L., LIMA, R., GUEX, C., BONILHA, I. & MANFRON, M. **Traditional usages, botany, phytochemistry, biological activity and toxicology of *Tropaeolum majus* L. - A review.** *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 15, 77-86, 2016.

BRUTO, M., PRIGENT-COMBARET, C., MULLER, D. & MOËNNE-LOCCOZ, Y. **Analysis of genes contributing to plant-beneficial functions in plant growth-promoting rhizobacteria and related Proteobacteria.** *Scientific Reports*, 4, 6261, 2014.

BUTNARIU, M. & BOSTAN, C. **Antimicrobial and anti-inflammatory activities of the volatile oil compounds from *Tropaeolum majus* L. (Nasturtium).** *Journal of Biotechnology*, 10, 5900-5909, 2010.

CAMPISANO, A., ANTONIELLI, L., PANCHER, M., YOUSAF, S., PINDO, M. & PERTOT, I. **Bacterial endophytic communities in the grapevine depend on pest management.** *PloS one*, 9(11), e112763, 2014.

CAPORASO, J.G., LAUBER C.L., WALTERS, W.A., BERG-LYONS, D., LOZUPONE, C.A., TURNBAUGH, P.J., FIERER, N. & KNIGHT, R. **Global patterns of 16s rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 4516–4522, 2010.

CARDOSO, E. L., FERNANDES, A. H. B. M. & FERNANDES, F. A. **Análise de solos: finalidade e procedimentos de amostragem.** *Embrapa Pantanal-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*, 2009.

CASSETARI, A.S., GOMEZ, S.P.M. & SILVA, M.C.P. **Fixação biológica de nitrogênio associativa e de vida livre.** In: *Microbiologia do Solo* (ESALQ, Piracicaba), 2, 134 – 147, 2016.

CHEN, L., HAO, Z., LI, K., SHA, Y., WANG, E., SUI, X., MI, G., TIAN, C. & CHEN, W. **Effects of growth-promoting rhizobacteria on maize growth and rhizosphere microbial community under conservation tillage in Northeast China.** *Microbial Biotechnology*, 14(2), 535-550, 2021.

CHEN, L., LUO, S., XIAO, X., GUO, H., CHEN, J., WAN, Y., LI, B., XU, T., XI, Q., RAO, C., LIU, C. & ZENG, G. **Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils.** *Applied Soil Ecology*, 46, 383–389, 2010.

CHEN, Y., FAN, J.-B., DU, L., XU, H., ZHANG, Q.-H. & HE, Y.-Q. **The application of phosphate solubilizing endophyte *Pantoea dispersa* triggers the microbial community in red acidic soil.** *Applied Soil Ecology*, 84, 235–244, 2014.

CHONCHOL, J. **A soberania alimentar.** *Estudos Avançados*, 19(55), 33-48, 2005.

COLE, J. R., WANG, Q., CARDENAS, E., FISH, J., CHAI, B., FARRIS, R. J., KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S., MCGARRELL, D. M., MARSH, T., GARRITY, G. M. & TIEDJE, J. M. **The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis.** *Nucleic Acids Research*, 37(Database issue), D141–D145, 2009.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.** *Rio de Janeiro: Imprensa Nacional*, 1, 669-674, 1984.

COTTA, S. R., DA MOTA, F. F., TUPINAMBÁ, G., ISHIDA, K., ROZENTAL, S., E SILVA, D. O., SILVA, A.J.R., RIZZO, H.R., ALVIANO, D.S., ALVIANO, C.S. & SELDIN, L. **Antimicrobial activity of *Paenibacillus kribbensis* POC 115 against the dermatophyte *Trichophyton rubrum*.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 953-962, 2012.

CREWS, T., CARTON, W. & OLSSON, L. **Is the future of agriculture perennial? Imperatives and opportunities to reinvent agriculture by shifting from annual monocultures to perennial polycultures.** *Global Sustainability*, 1, E11, 2018.

DAI, J. X., LIU, X. M. & WANG, Y. J. **Diversity of endophytic bacteria in *Caragana microphylla* grown in the desert grassland of the Ningxia Hui autonomous region of China.** *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 2349-2358, 2014.

DAUD, N.S., MOHD DIN, A.J., ROSLI, M.A., AZAM, Z.M., OTHMAN, N. & SARMIDI, M.R. ***Paenibacillus polymyxa* bioactive compounds for agricultural and biotechnological applications.** *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 18, 101092, 2019.

DAVID, B. V., CHANDRASEHAR, G. & SELVAM, P. N. ***Pseudomonas fluorescens*: a plant-growth-promoting rhizobacterium (PGPR) with potential role in biocontrol of pests of crops.** In: *Crop improvement through microbial biotechnology* (Elsevier), 221-243, 2018.

DEL BARRIO-DUQUE, A., LEY, J., SAMAD, A., ANTONIELLI, L., SESSITSCH, A. & COMPANT, S. **Beneficial Endophytic Bacteria-*Serendipita indica* Interaction for Crop Enhancement and Resistance to Phytopathogens.** *Frontiers in Microbiology*, 10, 2888, 2019.

EDWARDS, J., JOHNSON, C., SANTOS-MEDELLÍN, C., LURIE, E., PODISHETTY, N. K., BHATNAGAR, S., EISEN, J.A. & SUNDARESAN, V. **Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(8), E911-E920, 2015.

ELSAYED, T. R., JACQUIOD, S., NOUR, E. H., SØRENSEN, S. J. & SMALLA, K. **Biocontrol of bacterial wilt disease through complex interaction between tomato plant, antagonists, the indigenous rhizosphere microbiota, and *Ralstonia solanacearum*.** *Frontiers in Microbiology*, 10, 2835, 2020.

EPSTEIN, S. S. **Uncultivated microorganisms.** *Springer Science & Business Media*, 10(1), 2009.

FERREIRA, R. B. G., VIEIRA, M. C. & ZÁRETE, N. A. H. **Análise de crescimento de *Tropaeolum majus* ‘jewel’ em função de espaçamentos entre plantas.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 7(1), 57-66, 2004.

FIERER, N. **Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome.** *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579-590, 2017.

FORMAGIO, A., MASETTO, T., VIEIRA, M., ZÁRATE, N., COSTA, W., TREVIZAN, L. & SARRAGIOTTO, M. **Allelopathy potential of *Tropaeolum majus* L on picão-preto seeds germination and initial seedling growth.** *Ciência Rural*, 42, 83-89, 2011.

FROWD, J. & TOMLINSON, J. **Relationships between a parsley virus, nasturtium ringspot virus and broad bean wilt virus.** *Annals of Applied Biology*, 72, 189-195, 1972.

GARCÍA, R. O., KERNS, J. P. & THIESSEN, L. ***Ralstonia solanacearum* species complex: a quick diagnostic guide.** *Plant Health Progress*, 20(1), 7-13, 2019.

GARZÓN, G. & WROLSTAD, R. **Major anthocyanins and antioxidant activity of Nasturtium flowers (*Tropaeolum majus*).** *Food Chemistry*, 114, 44-49, 2009.

GASPAROTTO JUNIOR, A., PRANDO, T. B., LEME, T., GASPAROTTO, F. M., LOURENÇO, E. L., RATTMANN, Y. D., DA SILVA-SANTOS, J. E., KASSUYA, C. A. & MARQUES, M. C. **Mechanisms underlying the diuretic effects of *Tropaeolum majus* L. extracts and its main component isoquercitrin.** *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1), 501-509, 2012.

GENIN, S. & DENNY, T. P. **Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex.** *Annual review of phytopathology*, 50, 67-89, 2012.

GLICK, B. R. **Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications.** *Scientifica* 2012, 15, 2012.

GOLZE, V. & SOUZA, T. **Aceitabilidade de alimentação à base de capuchinha (*Tropaeolum majus*).** *Revista Brasileira De Agroecologia*, 3(2), 2009.

GRAÇA, J.V. & BUDNIK, K. **Partial Characterization of Nasturtium Mosaic Potyvirus.** *Journal of Phytopathology*, 139, 93-96, 1993.

GUPTA, R.S., LO, B. & SON, J. **Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus *Mycobacterium* into an Emended Genus *Mycobacterium* and Four Novel Genera.** *Frontiers in Microbiology*, 9, 67, 2018.

GUTIERREZ, T., BIDDLE, J.F., TESKE, A. & AITKEN, M.D. **Cultivation-dependent and cultivation-independent characterization of hydrocarbon-degrading bacteria in Guaymas Basin sediments.** *Frontiers in Microbiology*, 6, 695, 2015.

HALL, T., BIOSCIENCES, I. & CARLSBAD, C. **BioEdit: an important software for molecular biology.** *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(1), 60-61, 2011.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T. & RYAN, P.D. **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis.** *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9, 2001.

HARDOIM, P.R., VAN OVERBEEK, L.S., BERG, G., PIRTTILA, 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*, 79, 293-320, 2015.

HARIKRISHNAN, H., SHANMUGAIAH, V. & BALASUBRAMANIAN, N. **Optimization for production of Indole acetic acid (IAA) by plant growth promoting *Streptomyces* sp. VSMGT1014 isolated from rice rhizosphere.** *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3, 158-71, 2014.

HAYWARD, A. C. **Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*.** *Annual review of phytopathology*, 29(1), 65-87, 1991.

HU, Q., TAN, L., GU, S., XIAO, Y., XIONG, X., ZENG, W. A., FENG, K., WEI, Z. & DENG, Y. **Network analysis infers the wilt pathogen invasion associated with non-detrimental bacteria.** *NPJ biofilms and microbiomes*, 6(1), 1-8, 2020.

HUDSON, C.M., BENT, Z.W., MEAGHER, R.J. & WILLIAMS, K.P. **Resistance Determinants and Mobile Genetic Elements of an NDM-1-Encoding *Klebsiella pneumoniae* Strain.** *PLOS ONE*, 9(6), e99209, 2014.

JACKSON, C. R., RANDOLPH, K. C., OSBORN, S. L. & TYLER, H. L. **Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables.** *BMC microbiology*, 13(1), 1-12, 2013.

JAYAKUMAR, A., KRISHNA, A., NAIR, I.C. & RADHAKRISHNAN, E. K. **Drought-tolerant and plant growth-promoting endophytic *Staphylococcus* sp. having synergistic effect with silicate supplementation.** *Archives of Microbiology*, 202, 1899–1906, 2020.

JIMÉNEZ-GÓMEZ, A., SAATI-SANTAMARÍA, Z., KOSTOVCIK, M., RIVAS, R., VELÁZQUEZ, E., MATEOS, P.F., MENÉNDEZ, E. & GARCÍA-FRAILE, P. **Selection of the Root Endophyte *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 as Plant Growth Promoter for *Brassica napus* L. Crops.** *Agronomy*, 10(11), 1788, 2020.

KALAM, S., BASU, A., AHMAD, I., SAYYED, R.Z., EL-ENSHASY, H.A., DAILIN, D.J. & SURIANI, N.L. **Recent Understanding of Soil Acidobacteria and Their Ecological Significance: A Critical Review.** *Frontiers in Microbiology*, 11, 580024, 2020.

KEROVUO, J., LAURAEUS, M., NURMINEN, P., KALKKINEN, N. & APAJALAHTI, J. **Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*.** *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64, 2079-2085, 1998.

KIM, Y. C., HUR, J. Y. & PARK, S. K. **Biocontrol of *Botrytis cinerea* by chitin-based cultures of *Paenibacillus elgii* HOA73.** *European Journal of Plant Pathology*, 155(1), 253-263, 2019.

KING, E.O., WARD, M.K. & RANEY, D.E. **Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein.** *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301–307, 1954.

KINUPP, V. & BARROS, I. **Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28(4), 846-857, 2008.

KINUPP, V. F. & LORENZI, H. **Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas.** São Paulo, Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 1-745, 2014.

KINUPP, V.F. & BARROS, I.B.I. **Riqueza de Plantas Alimentícias Não Convencionais na Região Metropolitana de Porto Alegre, Rio Grande do Sul.** *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5(1), 63-65, 2007.

KINUPP, V.F. **Plantas Alimentícias Não-Convencionais (PANC): uma Riqueza Negligenciada.** In: *Anais da 61ª Reunião Anual da SBPC* (Manaus), 1-4, 2009.

KUMAR, S., STECHER, G., LI, M., KNYAZ, C. & TAMURA, K. **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.** *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549, 2018.

KURODA, K., KURASHITA, H., ARATA, T., MIYATA, A., KAWAZOE, M., NOBU, M.K., NARIHIRO, T., OHIKE, T., HATAMOTO, M., MAKI, S. & YAMAGUCHI, T. **Influence of green tuff fertilizer application on soil microorganisms, plant growth, and soil chemical parameters in green onion (*Allium fistulosum* L.) cultivation.** *Agronomy*, 10, 1-929, 2020.

LANE, D. J. **16S/23S rRNA sequencing.** *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, 115-175, 1991.

LEGENDRE, P. & BORCARD, D. **Box–Cox-chord transformations for community composition data prior to beta diversity analysis.** *Ecography*, 41, 1820-1824, 2018.

LETUNIC, I. & BORK, P. **Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation.** *Nucleic acids research*, 49(W1), W293-W296, 2021.

LIBERATO, P., TRAVASSOS, D. & SILVA, G. **PANC - Plantas Alimentícias Não Convencionais e Seus Benefícios Nutricionais.** *Environmental Smoke*, 2, 102-111, 2019.

LIN, L., WEI, C., CHEN, M., WANG, H., LI, Y., LI, Y., LITAO, Y. & AN, Q. **Complete genome sequence of endophytic nitrogen-fixing *Klebsiella variicola* strain DX120E.** *Standards in Genomic Sciences*, 10, 22, 2015.

LIU, H., XIONG, W., ZHANG, R., HANG, X., WANG, D., LI, R. & SHEN, Q. **Continuous application of different organic additives can suppress tomato disease by inducing the healthy rhizospheric microbiota through alterations to the bulk soil microflora.** *Plant and Soil*, 423(1), 229-240, 2018.

LIU, X., JIA, J., ATKINSON, S., CÁMARA, M., GAO, K., LI, H. & CAO, J. **Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1465–1471, 2010.

LOPER, J. E. & BUYER, J. S. **Siderophores in microbial interactions on plant surfaces.** *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4(1), 5-13, 1991.

LOPES, C.V.A. & ALBUQUERQUE, G.S.C. **Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática.** *Saúde em Debate*, 42(117), 518-534, 2018.

LUGTENBERG, B.J., DEKKERS, L. & BLOEMBERG, G.V. **Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*.** *Annual Review of Phytopathology*, 39, 461–490, 2001.

LUO, Y., WANG, F., HUANG, Y., ZHOU, M., GAO, J., YAN, T., SHENG, H. & AN, L. ***Sphingomonas* sp. Cra20 Increases Plant Growth Rate and Alters Rhizosphere Microbial Community Structure of *Arabidopsis thaliana* Under Drought Stress.** *Frontiers in Microbiology*, 10, 1221, 2019.

MA, Y., WU, X., LI, S., TANG, L., CHEN, M. & AN, Q. **Proposal for reunification of the genus *Raoultella* with the genus *Klebsiella* and reclassification of *Raoultella electrica* as *Klebsiella electrica* comb. nov.** *Research in Microbiology*, 103851, 2021.

MAMULA, D. & LJUBESIC, N. **Identification of turnip mosaic virus in *Tropaeolum majus*.** *Acta Botanica Croatica*, 34, 33-42, 1975.

MANSFIELD, J., GENIN, S., MAGORI, S., CITOVSKEY, V., SRIARIYANUM, M., RONALD, P., DOW, M., VERDIER, V., BEER, S.V., MACHADO, M.A., TOTH, I., SALMOND, G. & FOSTER, G. D. **Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology.** *Molecular plant pathology*, 13(6), 614-629, 2012.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de hortaliças não convencionais.** In: MAPA/ACS, (Brasília), 1-92, 2010.

MARSCHNER, P., YANG, C.H., LIEBEREI, R. & CROWLEY, D.E. **Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere.** *Soil Biology & Biochemistry*, 33, 1437 – 1445, 2001.

MASSOL-DEYA, A.A., ODELSON, D.A., HICKEY, R.F. & TIEDJE, J.M. **Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA).** *Molecular microbial ecology manual.* Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1-8, 1995.

MAY, A., COELHO, L. F., PEDRINHO, A., BATISTA, B. D., MENDES, L. W., MENDES, R., MORANDI, M.A.B., BARTH, G., VIANA, R.S. & VILELA, E. S. D. **The use of indigenous bacterial community as inoculant for plant growth promotion in soybean cultivation.** *Archives of Agronomy and Soil Science*, 1-16, 2021.

MBUTHIA, L.W., ACOSTA-MARTÍNEZ, V., DEBRUYN, J., SCHAEFFER, S., TYLER, D., ODOI, E., MPHESHEA, M. WALKER, F. & EASH, N. **Long term tillage, cover crop, and fertilization effects on**

microbial community structure, activity: Implications for soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 89, 24–34, 2015.

MCKIGHT, P. E. & NAJAB, J. **Kruskal-wallis test.** *The corsini encyclopedia of psychology*, 1-1, 2010.

MLCEK, J. & ROP, O. **Fresh edible flowers of ornamental plants—A new source of nutraceutical foods.** *Trends in Food Science & Technology*, 22(10), 561-569, 2011.

NAUTIYAL, C. S. **An effect microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms.** *FEMS Microbiology Letters*, 170(1), 265-270, 1999.

OLSSON, K. **Experience of brown rot caused by *Pseudomoms solanacearum* in Sweden.** *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 6, 199-207, 1976.

PADDA, K. P., PURI, A. & CHANWAY, C. P. ***Paenibacillus polymyxa*: a prominent biofertilizer and biocontrol agent for sustainable agriculture.** In: *Agriculturally important microbes for sustainable agriculture* (Springer, Singapore), 165-191, 2017.

PINTÃO, A. M., PAIS, M. S., COLEY, H., KELLAND, L. R. & JUDSON, I. R. ***In vitro* and *in vivo* antitumor activity of benzyl isothiocyanate: a natural product from *Tropaeolum majus*.** *Planta medica*, 61(3), 233–236, 1995.

PRADHANANG, P.M., ELPHINSTONE, J.G. & FOX, R.T.V. **Identification of crop and weed hosts of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 in the hills of Nepal.** *Plant Pathology*, 49, 403-413, 2000.

PREZOTTI, L. C. & GUARÇONI, A. **Guia de interpretações de análise de solo e foliar.** INCAPER (Vitória), 104, 2013

PROENÇA, D.N., FRANCISCO, R., KUBLIK, S. SCHÖLER, A., VESTERGAARD, G., SCHLOTTER, M. & MORAIS, P.V. **The Microbiome of Endophytic, Wood Colonizing Bacteria from Pine Trees as Affected by Pine Wilt Disease.** *Scientific Reports*, 7, 4205, 2017.

QUAST, C., PRUESSE, E., YILMAZ, P., GERKEN, J., SCHWEER, T., YARZA, P., PEPLIES, J., & GLÖCKNER, F. O. **The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools.** *Nucleic acids research*, 41(Database issue), D590–D596, 2013.

REIS, F.C. **Componentes de produção de capuchinha (*Tropaeolum majus* L.), influenciados pela aplicação de nitrogênio e fósforo em um latossolo vermelho distrófico.** 2006, 28f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Grande Dourados, 2006.

RICOTTA, C. & PODANI, J. **On some properties of the Bray–Curtis dissimilarity and their ecological meaning.** *Ecological Complexity*, 31, 201–205, 2017.

RODRIGUES, H., CIELO, D., GÓMEZ-CORONA, C., SILVEIRA, A., MARCHESAN, T., GALMARINI, M.V. & RICHARDS, N. **Eating flowers? Exploring attitudes and consumers' representation of edible flowers.** *Food Research International.* *Food Research International*, 100(2), 227-234, 2017.

RODRÍGUEZ, H. & FRAGA, R. **Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion.** *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319–339, 1999.

ROSADO, A. S. & SELDIN, L. **Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymyxa*.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, 521–528, 1993.

RUSSOMANNO, O. M. R. & KRUPPA, P. C. **Doenças fúngicas das plantas medicinais, aromáticas e condimentares – parte aérea.** *Biológico, São Paulo*, 72(1), 31-37, 2010.

RYAN, M. P., & ADLEY, C. C. ***Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens.** *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 33(3), 291-304, 2014.

SALVI, J. & KATEWA, S.S. **A review: Underutilized wild edible plants as a potential source of alternative nutrition.** *International Journal of Botany Studies*, 1(4), 32-36, 2016.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. & MANIATIS, T. **Molecular cloning - a laboratory manual.** *Cold Spring Harbor Press*, 5, 1989.

SANTOS, M. & GLASS, V. **Atlas do agronegócio:fatos e números sobre as corporações que controlam o que comemos.** *Fundação Heinrich Böll*, 1-60, 2018.

SANTOS, M.S., NOGUEIRA, M.A. & HUNGRIA, M. **Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture.** *AMB Express* 9, 205, 2019.

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

SARIKHANI, M. R., KHOSHROU, B. & GREINER, R. **Isolation and identification of temperature tolerant phosphate solubilizing bacteria as a potential microbial fertilizer.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(8), 1-10, 2019.

SARR, P. S., YAMAKAWA, T., ASATSUMA, S., FUJIMOTO, S., & SAKAI, M. **Investigation of endophytic and symbiotic features of *Ralstonia* sp. TSC1 isolated from cowpea nodules.** *African Journal of Microbiology Research*, 4(19), 1959-1963, 2010.

SCHLOSS, P.D., WESTCOTT, S.L., RYABIN, T., HALL, J.R., HARTMANN, M., HOLLISTER, E.B., LESNIEWSKI, R.A., OAKLEY, B.B., PARKS, D.H., ROBINSON, C.J., SAHL, J.W., STRES, B., THALLINGER, G.G., VAN HORN, D.J. & WEBER, C.F. **Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities.** *Applied Environmental Microbiology*, 75, 7537-41, 2009.

SCHULZ, V.S., SCHUMANN, C., WEISENBURGER, S., MÜLLER-LINDENLAUF, M., STOLZENBURG, K. & MÖLLER, K. **Row-Intercropping Maize (*Zea mays* L.) with Biodiversity-Enhancing Flowering-Partners—Effect on Plant Growth, Silage Yield, and Composition of Harvest Material.** *Agriculture*, 10, 524, 2020.

SCHULZE, A., ROBERTS, R. & PIETERSEN, G. **First Report of the Detection of *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) on *Tropaeolum majus*; *Hippeastrum* spp., and *Liatris* spp. in South Africa.** *Plant Disease*, 101(5), 846, 2017.

SCHWYN, B. & NEILANDS, J. B. **Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.** *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56, 1987.

SEGATA, N., IZARD, J., WALDRON, L., GEVERS, L., MIROPOLSKY, W.S. & GARRETT, C. **Metagenomic biomarker discovery and explanation.** *Genome Biology*, 12, R60, 2011.

SEGHES, D., WITTEBOLLE, L., TOP, E.M., VERSTRAETE, W. & SICILIANO, S. D. **Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community.** *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 1475–1482, 2004.

SÊKOWSKA, A., BOGIEL, T., WOŹNIAK, M. & GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. ***Raoultella* spp.—reliable identification, susceptibility to antimicrobials and antibiotic resistance mechanisms.** *Journal of Medical Microbiology*, 69(2), 233-238, 2020.

SÊKOWSKA, A., MIKUCKA, A. & GOSPODAREK-KOMKOWSKA, E. **Identification of *Raoultella* spp.: comparison of three methods.** *Indian Journal of Medical Microbiology*, 36(2), 197-200, 2018.

SHEN, S. Y. & FULTHORPE, R. **Seasonal variation of bacterial endophytes in urban trees.** *Frontiers in microbiology*, 6, 427, 2015.

SHURIGIN, V., EGAMBERDIEVA, D., LI, L., DAVRANOV, K., PANOSYAN, H., BIRKELAND, N. K., WIRTH, S. & BELLINGRATH-KIMURA, S. D. **Endophytic bacteria associated with halophyte *Seidlitzia rosmarinus* Ehrenb. ex Boiss. from saline soil of Uzbekistan and their plant beneficial traits.** *Journal of Arid Land*, 12(5), 730-740, 2020.

SILVA, T.P. **Fisiologia do desenvolvimento e senescência de flores de capuchinha (*Tropaeolum majus* L.).** 68f. Tese de Doutorado (Doutorado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Viçosa, 2012.

SILVA, T. F., COELHO, M. R., VOLLÚ, R. E., DE VASCONCELOS GOULART, F. R., ALVIANO, D. S., ALVIANO, C. S. & SELDIN, L. (2011). **Bacterial community associated with the trunk latex of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) grown in the northeast of Brazil.** *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3), 523-532, 2011.

SOPER, F.M., SIMON, C. & JAUSS, V. **Measuring nitrogen fixation by the acetylene reduction assay (ARA): is 3 the magic ratio?** *Biogeochemistry* 152, 345–351, 2021.

SOUSA, A. M., MACHADO, I., NICOLAU, A. & PEREIRA, M. O. **Improvements on colony morphology identification towards bacterial profiling.** *Journal of Microbiological Methods*, 95(3), 327-335, 2013.

SPAEPEN, S., VANDERLEYDEN, J. & REMANS, R. **Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling.** *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448, 2007.

STAMENKOVIC, S., BEŠKOSKI, V., KARABEGOVIC STANISAVLJEVIC, I., LAZIC, M. & NIKOLIC, N. **Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives.** *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16, e09R01, 2018.

SUN, W., XIAO, E., KRUMINS, V., HÄGGBLUM, M. M., DONG, Y., PU, Z., BAOQIN, L., WANG, Q., TANGFU, X. & LI, F. **Rhizosphere microbial response to multiple metal (loid) s in different contaminated arable soils indicates crop-specific metal-microbe interactions.** *Applied and environmental microbiology*, 84(24), e00701-18, 2018.

TAKAHASHI, S., TOMITA, J., NISHIOKA, K., HISADA, T. & NISHIJIMA, M. **Development of a Prokaryotic Universal Primer for Simultaneous Analysis of Bacteria and Archaea Using Next-Generation Sequencing.** *PLOS ONE*, 9(8), e105592, 2014.

TANG, Y. W. & BONNER, J. **The enzymatic inactivation of indoleacetic acid; some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings.** *Archives of Biochemistry*, 13(1), 11–25, 1947.

TIAN, X-Y. & ZHANG, C-S. **Illumina-Based Analysis of Endophytic and Rhizosphere Bacterial Diversity of the Coastal Halophyte *Messerschmidia sibirica*.** *Frontiers in Microbiology*, 8, 2288, 2017.

URIBE, D., SÁNCHEZ-NIEVES, J. & VANEGAS, J. **Role of microbial biofertilizers in the development of a sustainable agriculture in the Tropics.** In: *Soil Biology and Agriculture in the Tropics* (Springer, Berlin/Heidelberg, Germany), 235–250, 2010.

VAN LOON, L. C., BAKKER, P. A. & PIETERSE, C. M. **Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria.** *Annual Review of Phytopathology*, 36, 453-483, 1998.

WANG, L., YANG, F., E, Y., YUAN, J., RAZA, W., HUANG, Q. & SHEN, Q. **Long-Term Application of Bioorganic Fertilizers Improved Soil Biochemical Properties and Microbial Communities of an Apple Orchard Soil.** *Frontiers in Microbiology*, 7, 1893, 2016.

WANG, R., XIAO, Y., LV, F., HU, L., WEI, L., YUAN, Z. & LIN, H. **Bacterial community structure and functional potential of rhizosphere soils as influenced by nitrogen addition and bacterial wilt disease under continuous sesame cropping.** *Applied Soil Ecology*, 125, 117-127, 2018.

WANG, W., LUO, X., YE, X., CHEN, Y., WANG, H., WANG, L., WANG, Y., YANG, Y., LI, Z., CAO, H & CUI, Z. **Predatory Myxococcales are widely distributed in and closely correlated with the bacterial community structure of agricultural land.** *Applied Soil Ecology*, 146, 103365, 2020.

WEI, Z., HUANG, J., TAN, S., MEI, X., SHEN, Q. & XU, Y. **The congeneric strain *Ralstonia pickettii* QL-A6 of *Ralstonia solanacearum* as an effective biocontrol agent for bacterial wilt of tomato.** *Biological Control*, 65(2), 278-285, 2013.

WHEATLEY, R.M., FORD, B.L., LI, L., ARONEY, S.T.N., KNIGHTS, H.E., LEDERMANN, R., EAST, A.K., RAMACHANDRAN, V.K. & POOLE, P.S. **Lifestyle adaptations of *Rhizobium* from rhizosphere to symbiosis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 117, 23823–23834, 2020.

WOODMAN, M.E. **Direct PCR of intact bacteria (colony PCR).** *Current Protocols in Microbiology*, Appendix 3D, 2008.

YAMAMOTO, K., SHIWA, Y., ISHIGE, T., SAKAMOTO, H., TANAKA, K., UCHINO, M., TANAKA, N., OGURI, S., SAITOH, H. & TSUSHIMA, S. **Bacterial Diversity Associated With the Rhizosphere and Endosphere of Two Halophytes: *Glaux maritima* and *Salicornia europaea*.** *Frontiers in Microbiology*, 9, 2878, 2018.

YEAGER, C. M., GALLEGOS-GRAVES, L. V., DUNBAR, J., HESSE, C. N., DALIGAULT, H. & KUSKE, C. R. **Polysaccharide degradation capability of Actinomycetales soil isolates from a semiarid grassland of the Colorado Plateau.** *Applied and environmental microbiology*, 83(6), e03020-16, 2017.

ZANETTI, G. D., MANFRON, M. P., HOELZEL, S. C., PAGLIARIN, V. P. & MOREL, A. F. **Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L.** *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 22(2), 159-162, 2003.

ZHANG, Y. F., HE, L. Y., CHEN, Z. J., WANG, Q. Y., QIAN, M. & SHENG, X. F. **Characterization of ACC deaminase-producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*.** *Chemosphere*, 83(1), 57-62, 2011.

ZHAO, J., LIU, J., LIANG, H., HUANG, J., CHEN, Z., NIE, Y., WANG, C. & WANG Y. **Manipulation of the rhizosphere microbial community through application of a new bio-organic fertilizer improves watermelon quality and health.** *PLOS ONE*, 13(2), e0192967, 2018.