

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL

**Comunidades de bactérias endofíticas e epifíticas
associadas à cana-de-açúcar e prospecção de promotores
de crescimento em plantas**

Luis Guillermo Teheran Sierra

Microbiologista

2020

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS JABOTICABAL**

**Comunidades de bactérias endofíticas e epifíticas
associadas à cana-de-açúcar e prospecção de promotores
de crescimento em plantas**

Luis Guillermo Teheran Sierra

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Soares

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Microbiologia
Agropecuária

S572c

Sierra, Luis Guillermo Teheran

Comunidades de bactérias endofíticas e epifíticas associadas à cana-de-açúcar e prospecção de promotores de crescimento em plantas / Luis Guillermo Teheran Sierra. -- Jaboticabal, 2020
136 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Daniel Guariz Pinheiro

Coorientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro

1. Amplicon. 2. Culturômica. 3. PGPB. 4. Saccharum sp.. 5.
Simbiose. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: COMUNIDADES DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E EPITÍFICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR E PROSPECÇÃO DE PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

AUTOR: LUIS GUILLERMO TEHERAN SIERRA

ORIENTADOR: DANIEL GUARIZ PINHEIRO

COORDINADORA: MARIA INES TIRABOSCHI FERRO

COORDINADOR: MARCOS ANTÔNIO SOARES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. DANIEL GUARIZ PINHEIRO
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. TSAI SIU MUI
Centro de Energia Nuclear na Agricultura / USP - Piracicaba, SP
(VIDEOCONFERÊNCIA)



Pós-Doutorando JADERSON SILVEIRA LEITE ARMANHI
Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética-CBMEG/UNICAMP / Campinas/SP
(VIDEOCONFERÊNCIA)



Prof. Dr. JACKSON ANTONIO MARCONDES DE SOUZA
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal
(VIDEOCONFERÊNCIA)



Pesquisadora Dra. KÁTIA CRISTINA KUPPER
Centro de Citricultura / IAC / Instituto Agronômico de Campinas - Cordeirópolis/SP
(VIDEOCONFERÊNCIA)



Jaboticabal, 11 de setembro de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luis Guillermo Teheran Sierra, nascido em 27 de fevereiro de 1981, em Magangué, Bolívar, Colômbia. Filho de Apolonia Sierra Iles e Guillermo Teheran Avila. Iniciou sua graduação em Microbiologia em fevereiro de 1999 na Universidad Libre, Seccional Barranquilla, Colômbia, concluindo seu curso em dezembro de 2004. Concluiu o curso de mestrado em Microbiologia Molecular pela mesma instituição em maio de 2016 sob orientação do Prof. Dr. Rubén Jaramillo Lanchero. Em agosto de 2016 ingressou no curso de Doutorado em Microbiologia Agropecuária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – (FCAV-UNESP), na cidade de Jaboticabal, SP, sob a orientação do Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro, e coorientação da Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro e o Prof. Dr. Marcos Antônio Soares. Foi financiado com crédito educativo para estudos de Doutorado do Programa “Bolívar Gana con Ciencia” do estado de Bolívar, Colômbia e a “Fundación Centro de Estudios Interdisciplinarios Básicos y aplicados, CeIBA”. Durante o doutorado teve a oportunidade de participar do projeto “Perfis metagenômicos de comunidades microbianas associadas a cana-de-açúcar sob cultivo orgânico versus convencional e prospecção de microrganismos promotores de crescimento em plantas”, financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo FAPESP no: 2017/09008-5, do qual se desprende o presente trabalho.

Sub tuum praesidium confugimus
vita, dulcedo, et spes nostra.

Este trabajo, en este punto de mi vida, no sería posible sin el amor, comprensión y el apoyo incondicional de mi esposa Lina Marcela Silvera Cruz, quien junto a nuestras hijas Daniela y Andrea me acompañaron gran parte del periodo de estudios en Brasil, convirtiéndose esta etapa, en la mejor experiencia de nuestra vida personal y familiar. A ustedes está dedicado este trabajo.

A mis padres Guillermo y Apolonia (*in memoriam*), quienes siempre se esforzaron por un futuro mejor para su familia.

A mis queridas hermanas, Mari, Nadia y Jeny, por el apoyo antes y durante el periodo de estudios en Brasil.

A la familia Silvera Cruz, gracias por el apoyo y la ayuda permanente en esta etapa de nuestra vida familiar.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Daniel Guariz Pinheiro, pela oportunidade, ensinamentos, sugestões e principalmente pela confiança em mim depositada.

À professora Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pela oportunidade de ser seu coorientado, pelo apoio acadêmico permanente e incentivos.

Ao professor Marcos Soares, pela oportunidade de ser seu coorientado, pelos ensinamentos, ajuda experimental e pelos aportes neste trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Bioinformática, Michelli Funnicelli, Lucas Amoroso, Rafael da Silva, Maria Fernanda Campanari e André Aquino pelo convívio, ajuda com experimentos, análises e suporte.

Aos professores Jesus Aparecido Ferro, Jairo Cazetta, Eliana de Macedo Lemos, Tiago Santana Balbuena, João Pizauro, Mara Cruz, Antonio de Goes e Rita De Cássia Panizzi por sempre abrir as portas dos seus laboratórios, disponibilizar reagentes, equipamentos e recursos computacionais, pela amizade e conversas científicas.

Aos pós-doutorandos Flávia Carvalho, Helen Penha, Danillo Alvarenga e Rafael Marini pela amizade, apoio técnico, e as conversas acadêmicas.

Ao pessoal do CREBIO Agda Facincani e Mariza Mota pelo apoio técnico permanente, a grande experiência compartilhada e a amizade nesses quatro anos.

A todo o pessoal técnico e administrativo do Departamento de Tecnologia que sempre me deram ajuda em alguns dos experimentos, orientações sobre diferentes processos e procedimentos, os quais facilitaram meu trabalho e a vida acadêmica na Unesp.

Aos amigos e colegas de bancada do Laboratório de Proteômica Vegetal: Amanda Baldassi, Gabriel Lemes, Patricia Sitta, Felipe Rodrigues, Leticia Moretto e Naiara Zancanari; obrigado pela amizade, a permanente troca de ideias e as conversas com café.

Aos amigos do LBM da FCAV/UNESP/Jaboticabal, Michelle Penha, Ana Buzinari, Amanda Oliveira, Catarina Mardegan, Jéssica Mello, Flavia Campos, Iashilei Pasquini, Daniela Konrad e Juliana Vantini, pela amizade e excelente convívio.

Aos amigos do programa de pós-graduação em Microbiologia Agropecuária, Wellington Omori, Natalia Sarmanho, Pâmela Maldaner e Bárbara Bonfá, obrigado pela amizade e as dicas.

A Elwi Machado, Yani Aranguren, Fernando Rodas y Wilmar Botello, gracias por la amistad, ayuda permanente y los buenos consejos en estos cuatro años.

À Universidade Estadual Paulista – Unesp, Campus de Jaboticabal, pela oportunidade de realização do doutorado e ao Conselho do Programa de Pósgraduação em Microbiologia Agropecuária do qual tive a oportunidade de fazer parte como representante dos alunos.

Aos amigos que fiz em Jaboticabal, que foram uma segunda família para minha família, por serem o apoio nos momentos difíceis quando precisamos e também nos momentos felizes por estarem sempre presentes. De vocês aprendi que nada acontece por acaso.

Al departamento de Bolívar en Colombia, por el programa “Bolívar Gana con Ciencia”, el cual me abrió las puertas para poder realizar mis estudios de doctorado y a la Fundación CeIBA, por el soporte administrativo durante el tiempo de estudios.

Às demais pessoas que não foram citadas aqui e que colaboraram direta ou indiretamente para o sucesso deste trabalho.

Ao Brasil, obrigado pela hospitalidade e oportunidade, a saudade já é grande. Gratidão total.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. Cana-de-açúcar: importância	6
2.2. Microrganismos associados às plantas.....	8
2.3. Microrganismos promotores de crescimento em plantas (“plant growth-promoting microorganisms – pgpm”)	10
2.4 Microbioma fundamental associado às plantas e construção de comunidades sintéticas	16
2.5 Culturômica como ferramenta para o acesso e prospecção do microbioma cultivável associado às plantas.....	17
2.6 Metagenômica e metataxonômica: ferramentas independentes de cultura para o acesso ao microbioma	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1. Coleta de Material vegetal	22
3.2. Processamento do material vegetal para obtenção de comunidades endofíticas e epifíticas	22
3.3. Cultura de comunidades microbianas	26
3.4. Isolamento de comunidades e condições de cultivo	28
3.5. Avaliação do potencial de gramas para prospecção em larga escala de comunidades e isolados bacterianos	29
3.6. Seleção de comunidade com perfil para promoção de crescimento em plantas	31
3.7. Avaliação do potencial de produção de ácido 3-indol acético (AIA) e solubilização de fosfatos	33
3.8. Avaliação da promoção de crescimento em casa de vegetação.....	34
3.9. Caracterização de traços funcionais de promoção de crescimento vegetal	35
3.9.1. Produção de sideróforos.....	35
3.9.2. Quantificação da atividade de ACC desaminase.....	36
3.9.3. Produção de biofilme	37

3.9.4.	Solubilização de Zinco.....	38
3.9.5.	Produção de HCN e quitinase	39
3.9.6.	Tolerância á NaCl e glicerol.....	39
3.9.7.	Proteases, lipases e esterases.....	40
3.9.8.	Atividade celulase e amilase	40
3.10.	Amplificação do gene da dinitrogenase redutase <i>nifH</i>	41
3.11.	Classificação (“Ranking”) das comunidades.....	42
3.12.	Perfil de metabolismo de fontes de carbono para comunidades	43
3.13.	Sequenciamento de comunidades em plataforma Illumina e análises bioinformáticas.....	44
4.	RESULTADOS	46
4.1.	Prospecção de comunidades bacterianas a partir de rizosfera e tecidos da cana-de-açúcar	46
4.2.	Seleção de gramínea como modelo para prospecção da promoção de crescimento in planta	47
4.3.	Comunidades endofíticas e epifíticas de cana-de-açúcar promovem o crescimento em <i>Cynodon dactylon</i>	48
4.4.	Prospecção de promoção de crescimento em <i>B. ruziziensis</i>	53
4.5.	Perfil de traços de promoção de crescimento vegetal.....	54
4.6.	Avaliação do perfil de promoção de crescimento.....	59
4.7.	Composição taxonômica das comunidades de bactérias endofíticas e epifíticas de cana-de-açúcar	62
5.	DISCUSSÃO	83
6.	CONCLUSÕES.....	89
7.	REFERÊNCIAS	90
	APÊNDICE.....	116

COMUNIDADES DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS E EPIFÍTICAS ASSOCIADAS À CANA-DE-AÇÚCAR E PROSPECÇÃO DE PROMOTORES DE CRESCIMENTO EM PLANTAS

RESUMO – As bactérias associadas a plantas constituem apenas um dos grupos que conformam o microbioma, o qual é responsável pela nutrição, saúde e homeostase geral da planta. A prospecção de bactérias com traços de promoção de crescimento é uma alternativa para o aproveitamento do microbioma cultivável das plantas e é a principal fonte dos microrganismos benéficos usados como inoculantes. O presente estudo teve como objetivo investigar as comunidades de bactérias associadas aos diferentes tecidos (ambientes) de cana-de-açúcar sob duas formas de cultivo contrastantes, na forma de comunidades, tanto endofíticas como epifíticas, com capacidade de promoção de crescimento vegetal. Foram prospectadas 944 comunidades usando um meio de cultura proposto pelo grupo para conformar um banco de comunidades. Posteriormente foram testadas com experimentos *in planta* usando a gramínea *Cynodon dactylon* (grama bermuda). Posteriormente foram feitos testes de seleção baseados em características fenotípicas tais como a produção de ácido indol-acético - AIA e a capacidade de solubilização de fosfatos. Um grupo final de 17 comunidades foi caracterizado em profundidade, na busca de traços de promoção de crescimento vegetal em *Brachiaria ruziziensis* e outras características fisiológicas. Para identificar os membros das comunidades selecionadas, foi amplificada e sequenciada a região hipervariável V3-V4 do gene 16s rDNA na plataforma Illumina, acessando a abundância e riqueza de espécies em cada uma delas, potencial metabólico e redes de co-ocorrência, chegando no final, na identificação de 34 gêneros e 24 espécies distribuídas entre os filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes e Actinobacteria. Foram identificados ademais, vários gêneros com alto nível de centralidade nas análises de redes: *Chryseobacterium*, *Leucobacter* e *Pseudomonas*. Finalmente foram classificadas as melhores cinco comunidades promotoras de crescimento em plantas a partir das análises e testes realizados, das quais, quatro vêm de cana-de-açúcar convencional e uma de cultura orgânica, quatro de colmo, e uma de folha. Das cinco, três pertencem ao nicho endofítico e dois epifíticos, as quais tem potencial para serem exploradas como inoculantes biológicos.

Palavras-chave: amplicon, culturômica, PGPB, *Saccharum* sp., simbiose

ENDOPHYTIC AND EPIPHYTIC BACTERIAL COMMUNITIES ASSOCIATED WITH SUGARCANE AND PROSPECTION OF PLANT GROWTH PROMOTERS

ABSTRACT – Plant-associated bacteria constitute only one of the groups that constitute the microbiome, responsible for homeostasis and boost the nutrition and health of the plant. Prospecting bacteria with plant growth-promotion traits is an alternative for exploiting the cultivable microbiome of plants and offers a primary source of beneficial microorganisms used as inoculants. This study aimed to investigate bacterial communities associated with soil and sugarcane tissues under two forms of contrasting agricultural management in the form of communities, both endophytic and epiphytic, with the capacity to promote plant growth. A total of 944 communities were obtained using a new proposed culture medium to form a community bank. Later they were tested with *in planta* experiments using *Cynodon dactylon* (bermudagrass). Subsequently, selection tests based on phenotypic characteristics such as the production of 3-indoleacetic acid - IAA and the ability to solubilize phosphate were performed. A final group of 17 communities was characterized in depth, searching for plant growth-promotion traits using *Brachiaria ruziziensis* and other physiological characteristics. For identification of the species that constitute each of the selected communities, the hypervariable region V3-V4 of the 16s rDNA gene was amplified and sequenced in the Illumina platform, accessing the abundance and richness of species, metabolic potential, and co-occurrence networks, identifying 34 genera and 24 species distributed among the phyla Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, and Actinobacteria. We point three genera with a high centrality level in the network analysis: *Chryseobacterium*, *Leucobacter*, and *Pseudomonas*. Finally, the five-best growth-promoting communities were classified from the analyses and tests performed, finding that four of them come from conventional sugar cane and one from organic culture, four from stalks, and one from the leaf. Of these five communities, three belong to the endophytic niche and two epiphytic, which can be explored as inoculants.

Keywords: amplicon, culturomics, PGPB, *Saccharum sp*, symbiosis

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é considerado uma das atividades mais importantes para a economia mundial, sendo a cultura responsável por fornecer matéria-prima para a produção de açúcar e etanol. A cana-de-açúcar pode ser considerada a principal fonte de biomassa para produção de biocombustíveis, devido à alta quantidade e disponibilidade dessa matéria prima a um custo reduzido (Cardona et al., 2010). Além disso, é uma planta C4 e possui uma alta taxa de conversão fotossintética, proporcionando maior acúmulo de biomassa.

A cultura de cana-de-açúcar sob manejo convencional segue um modelo intensivo e industrializado caracterizado pelo uso extensivo de áreas de cultura e de agroquímicos. Por outro lado, a consciência ambiental dos consumidores motivou a adoção de uma gestão agrícola mais sustentável. Nesse sentido a agricultura orgânica tem sido considerada uma alternativa à agricultura convencional para suprir a demanda mundial de alimentos sem a utilização de agrotóxicos nocivos à saúde humana e sem prejuízos ao meio ambiente (Heckman, 2006).

Os sistemas produtivos atuais devem enfrentar uma série de desafios: aumento de áreas produtivas, acesso e aproveitamento de recursos hídricos com fins produtivos, redução de impactos ambientais, como contaminações e emissões de carbono, visando a proteção e a conservação do meio ambiente e do ecossistema em geral (Godfray et al., 2010).

A agricultura orgânica apresenta uma abordagem mais holística para agricultura, em que seus princípios são baseados nas observações de Sir Howard (dos métodos de agricultores indianos do século XX), que ressalta a necessidade de uma compreensão integrada dos ciclos biogeoquímicos e dos processos biológicos direcionando para o manejo mais adequado considerando a inter-relação entre os fatores envolvidos, e destaca o papel essencial do húmus e matéria orgânica para a fertilidade do solo e nutrição da planta (Howard, 1943; Schipanski et al., 2017).

Os microrganismos associados às plantas são encontrados em diferentes compartimentos, desde o ambiente rizosférico até no interior das sementes, e estas constituem um dos importantes mecanismos de transmissão vertical de endófitos (Rezki et al., 2018). e a abundância e diversidade dos táxons associados à rizosfera e outros compartimentos que são influenciados pela planta. Além disso, outros fatores como práticas de cultivo - monocultura ou rotação de cultivos, tipo de fertilização, entre outros - também podem afetar o microbioma associado: monocultura ou rotação de cultivos, adubação, entre outros (Pariona-Llanos et al., 2010; Hartman et al., 2018).

Uma visão mais recente de estudos englobando as relações planta-microrganismo relatam a importância do holobionte, que consiste no conjunto de microrganismos hospedeiros e associados que habitam o interior e/ou a parte externa de seus tecidos (endosfera e filosfera). Esses microrganismos representados principalmente por bactérias e fungos são importantes na manutenção das plantas (Haney et al., 2015; Agler et al., 2016; de Souza et al., 2016) e, além disso, estão envolvidos em funções muito importantes para o hospedeiro, como o fornecimento de nutrientes das plantas e o aumento a resistência a estresses bióticos e/ou abióticos (Vandenkoornhuyse et al., 2015). Vários estudos relatam os benefícios à saúde da planta promovida pela microbiota atual, como: supressão de doenças (Liu et al., 2018; Sharma et al., 2018), aumento da aquisição de nutrientes (Van Der Heijden et al., 2016; Shukla et al., 2018), promoção de crescimento (Verma et al., 2018b), indução de resistência sistêmica (Sharma et al., 2018), entre outros.

A coexistência de microrganismos na rizosfera e nos tecidos da planta, seja na forma de endofíticos e epifíticos, é essencial na promoção do crescimento vegetal e estabelecimento de comunidades (Armanhi et al., 2018).

Os microrganismos que fazem parte do microbioma podem ser classificados de acordo com as seguintes funções: 1) Microrganismos que aliviam o estresse abiótico do hospedeiro; 2) Microrganismos que defendem os hospedeiros do estresse biótico (patógenos e herbívoros); e 3) Microrganismos que sustentam o hospedeiro nutricionalmente através do aumento do nitrogênio, fósforo, ferro, e outros nutrientes (Bacon e White, 2016).

Alguns trabalhos têm mostrado a importância dos microrganismos endofíticos na promoção de crescimento e proteção da planta frente a patógenos (Strobel, 2003; Egamberdieva et al., 2017).

No caso de microrganismos epifíticos, é reconhecido seu papel como colonizadores, os quais aparecem na rizosfera durante o crescimento e desenvolvimento da planta e, posteriormente, podem colonizar todas as superfícies da planta, tanto do rizoplaneo como do filoplaneo, e que influenciam na capacidade de promoção de crescimento vegetal (Gnanamanickam e Immanuel, 2006; Yanni et al., 2011).

O microbioma vegetal pode desempenhar funções consideradas como mecanismos diretos e indiretos. Os mecanismos diretos de promoção de crescimento vegetal, são baseados em traços funcionais como: síntese de fitohormônios como o ácido 3-indolacético (Castro-González et al., 2011), fixação de nitrogênio atmosférico catalisado pela enzima nitrogenase (Santi et al., 2013) e solubilização de nutrientes insolúveis como os fosfatos (Bashan et al., 2013). Já os mecanismos indiretos estão envolvidos no estabelecimento destas relações simbióticas, como a proteção do hospedeiro contra pragas e fitopatógenos (Liotti et al., 2018) e estresses abióticos, como metais pesados e salinidade (Mello et al., 2020; Pietro-Souza et al., 2020).

As interações que ocorrem entre a planta e a microbiota circundante são bidirecionais, pois os microrganismos fornecem benefícios às plantas, e elas fornecem novas capacidades metabólicas a sua microbiota, levando à sua adaptação e que podem ter impacto positivo (mutualístico), neutro (comensal) ou prejudicial (patogênico) à manutenção da planta (Hassani et al., 2018).

As estratégias que adotam a culturômica, isto é, abordagens usando análises multi-ômicas aliadas às técnicas dependentes da cultura, que são baseadas em meios de cultura, são comumente adotadas para acessar toda a coleção de conteúdo genético microbiano do microbioma. Essas estratégias podem ser eficientemente empregadas na descoberta de novos membros de microbiomas vegetais e no entendimento de suas interações com o hospedeiro, ou seja, desvendar mecanismos envolvidos na associação, mecanismos de adaptação, coevolução, explorando novos táxons que promovam condicionamento e aumento no rendimento de produção (Sarhan et al., 2019).

A importância dos microrganismos promotores de crescimento em plantas, conhecidos como PGPM (“Plant Growth- Promoting Microorganisms”), tem sido reconhecida não só na sustentabilidade da agricultura, mas também em outras áreas como a biorremediação, a produção de biomassa e combustíveis. Nesses casos, seu uso pode reduzir substancialmente a poluição por pesticidas, o escoamento de nitrogênio e fósforo, a eutrofização associada das massas de água e as emissões de gases residuais do solo. Quando inoculados, esses microrganismos produzem aumento da biomassa vegetal acima e abaixo do solo, que é vital para a retenção de água, controle de erosão e produção de bioenergia em sistemas convencionais e agroflorestais (Abhilash et al., 2016).

No que se refere à cana-de-açúcar, inúmeros trabalhos realizaram isolamento de bactérias promotoras de crescimento vegetal (Mehnaz, 2011), focando em traços de promoção de crescimento vegetal como, por exemplo, a capacidade de fixação de nitrogênio, entre outros (Gillis et al., 1989; Reis et al., 1994; Pan et al., 2001; Baldani e Baldani, 2005).

Estes trabalhos tem em comum a busca permanente de PGPM na forma de isolados (Fasciglione et al., 2015) e a pouca recuperação do microbioma a partir de técnicas dependentes de cultura, mostrando que, geralmente, 90-99% da população de procariontes presentes em diferentes ambientes não são passíveis de isolamento devido à necessidades nutricionais específicas, e este grupo de não-cultiváveis geralmente apresentam um grande potencial genético e biotecnológico (Schleifer, 2004; Lundberg et al., 2012).

Devido a plasticidade metabólica dos grupos microbianos é impossível fornecer todos os nutrientes e as condições necessárias para seu crescimento num mesmo meio de cultura (Medina et al., 2017). Por isso, é possível afirmar, que todos os meios de cultura têm seletividade por um grupo, e que esse fato é considerado um gargalo na recuperação do microbioma cultivável associado às plantas (Sarhan et al., 2019).

Por outro lado, as metodologias clássicas, para busca bactérias promotoras de crescimento em plantas fazem uso de meios de cultura seletivos para o grupo de interesse para, posteriormente, fazer uma caracterização *in vitro* dos isolados, de traços de promoção de crescimento, como a produção de fitormônios, fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos, entre outros (Ambrosini e Passaglia, 2017). Uma evidência disto são os diversos trabalhos feitos em cana-de-açúcar para o isolamento

de bactérias promotoras de crescimento vegetal de interesse agrícola (Mehnaz, 2011).

Diversas metodologias tem sido desenvolvidas para o reconhecimento e estudo das características do microambiente como: pH, oxigênio, salinidade, disponibilidade de nutrientes, com a finalidade de recuperar ou cultivar microrganismos, especialmente bactérias, que estão presentes em ambientes e somente são reconhecidos por técnicas independentes de cultura como a metagenômica (Kaeberlein, 2002; Pham e Kim, 2012; Bodor et al., 2020).

Recentemente, de Souza et al., 2016, realizaram um inventário da estrutura de comunidades de bactérias e fungos associadas à cana-de-açúcar. Nesse estudo, foram encontradas 10 milhares de Unidades Taxonômicas Operacionais (Operational Taxonomic Units - OTUs) de bactérias (23.811) e fungos (11.727) endofíticos ou epifíticos habitando os compartimentos da planta. Os resultados indicam que a colonização dos compartimentos da planta se dá a partir do solo e para cada órgão pode ser observado um padrão distinto de organização, sendo cada compartimento o principal determinante nessa organização. O trabalho reporta a presença de um microbioma fundamental ("core microbiome"), i.e., compreendendo as OTUs que se mantiveram em alta abundância relativa ao longo do desenvolvimento da planta, e com papel importante em processos biológicos relacionados ao crescimento da planta e em processos fermentativos.

Outros trabalhos do mesmo grupo, foram realizados usando técnicas dependentes de cultura para a recuperação de comunidades associadas a cana (Armanhi et al., 2016, 2018) apontando uma grande potencial para obtenção de comunidades sintéticas com características de PGPM e testadas como inoculantes biológicos em milho, com resultados promissórios para culturas de importância econômica (de Souza et al., 2019).

Partindo de um ambiente de cultivo orgânico poderíamos considerar esse tipo de amostra como uma fonte rica com potencial para a prospecção de bactérias promotoras de crescimento em plantas. Essa consideração está apoiada em trabalhos já efetuados comparando os sistemas de cultivo, observando nesse ambiente maior acúmulo de matéria orgânica, maior diversidade de espécies microbianas, além do fato de não haver uso de insumos químicos sintéticos que poderiam ser inibidores de crescimento.

Além disso, também consideramos que selecioná-las em comunidades poderíamos ter um efeito sinérgico entre bactérias, o qual seria removido caso estivéssemos trabalhando com isolados.

O anterior revela que ainda existe um potencial para a prospecção de comunidades levando em conta a influência do sistema de cultura implementado abordagens integrativas, para a prospecção de comunidades com características de PGPM e observar se o sistema de cultura tem influência na composição e estrutura de comunidades associadas aos diferentes tecidos e ambientes da planta. Também consideramos que selecioná-las em comunidades poderíamos ter um efeito sinérgico entre bactérias, o qual seria removido caso estivéssemos trabalhando com isolados.

Levando em consideração que ainda existe uma falta de conhecimento sobre o microbioma associado à cana-de-açúcar, as interações entre as comunidades presentes em cada tecido, e o uso de metodologias, dependentes e não dependentes de cultura na busca de bactérias promotoras de crescimento vegetal. O presente trabalho teve como objetivo: 1) a prospecção do microbioma cultivável associado à cana-de-açúcar em duas condições de cultivo contrastantes, a partir da recuperação de comunidades de bactérias a partir de solo rizosférico, raiz, colmo e folha, tanto epifíticas como endofíticas. 2) selecionar um grupo de comunidades a partir da prospecção *in planta* usando *Cynodon dactylon*, aumento da biomassa quando inoculadas em *Brachiaria ruziziensis*, e quantificação de traços de promoção de crescimento vegetal e características fisiológicas e 3) identificar a partir de sequenciamento da região V3-V4 do gene 16s rRNA a estrutura e composição das comunidades de bactérias a fim de compreender as relações entre os membros das comunidades, identificar relações de sinergismo a partir de análises de co-ocorrência e potencial metabólico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar: importância

A cana-de-açúcar é uma planta C4 com elevada eficiência fotossintética, ou seja, possui uma alta taxa de conversão fotossintética, proporcionando maior acúmulo de biomassa.

A cultura da cana-de-açúcar é considerada uma das culturas mais importantes para a economia mundial, e é plantada em mais de 100 países, desde o nível do mar até climas mais temperados. Segundo a FAO, no ano 2018, foram produzidas mais de 1,91 bilhões de toneladas no mundo (White et al., 2020), demonstrando a importância econômica desta cultura para a economia mundial, convertendo-a em uma “commodity” de alta importância.

O Brasil é considerado o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo com uma área cultivada de 8 589,2 mil hectares, e a partir das quais foram obtidas aproximadamente 620,41 milhões de toneladas desta cultura na safra 2018/2019 (Camargo et al., 2020).

A cultura da cana-de-açúcar é responsável por fornecer a matéria-prima para a produção de açúcar e etanol (álcool etílico). O açúcar é obtido a partir do caldo concentrado, extraído do colmo (caule), o qual é rico em sacarose. O etanol é produzido a partir de processo fermentativo desse caldo, e pode ser utilizado na produção de bebidas alcoólicas, além de combustível (Meghana e Shastri, 2020). Além disso, a cana-de-açúcar pode ainda servir como fonte de biomassa para a produção de etanol a partir da fermentação dos açúcares obtidos após hidrólise de polímeros de carboidratos complexos, encontrados em resíduos lignocelulósicos (pectinas, celulose, hemicelulose e lignina) presentes nas paredes das células vegetais (bagaço e a palhada). Neste sentido, esta cultura pode ser considerada a principal fonte de biomassa para produção de biocombustíveis devido à alta quantidade e disponibilidade da matéria-prima a um custo reduzido (Cardona et al., 2010).

Os resíduos do processamento da cana-de-açúcar oriundos da indústria sucroalcooleira, tais como a vinhaça (resíduo do processo de destilação fracionada do caldo de cana-de-açúcar fermentado para a produção de etanol) e a torta de filtro (resíduo proveniente da filtração do caldo extraído das moendas), apresentam grande concentração de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio, matéria orgânica, dentre outros, e são utilizados no cultivo para aumentar a produtividade

dos canaviais (MARQUES, 2006; Moran-Salazar et al., 2016). Outro resíduo aproveitado na agricultura é a cinza proveniente da queima do bagaço, que é rica em potássio, na forma de biochar (Borges et al., 2020) e como material componente de concretos (Loganayagan et al., 2020). A aplicação desses resíduos possui benefícios econômicos e ambientais, uma vez que promovem a redução da necessidade do emprego de fertilizantes sintéticos e evitam a contaminação do meio ambiente.

A cana-de-açúcar tem sido alvo de melhoramento genético, apesar dos desafios impostos pela sua estrutura genética, pois é uma planta com alto nível de poliploidia. Uma evidência disso são as diferentes variedades obtidas com diferentes níveis de produtividade (Moore e Botha, 2013). Nota-se até mesmo o desenvolvimento de variedades transgênicas de propósito específico, orientadas à produção de álcool de segunda geração a partir do bagaço, devido à alta produção de fibra como consequência da inserção e expressão do gene *AVP1* que codifica a enzima pirofosfatase (Bhatti et al., 2019), responsável por conferir resistência a condições de estresse salino e seca, melhorando o desempenho da planta (Pasapula et al., 2011).

2.2. Microrganismos associados às plantas

Os microrganismos associados às plantas estabelecem diversos tipos de relações que podem ir desde relações mutualistas até relações de tipo parasítica.

As interações entre as plantas e os microrganismos podem acontecer de diferentes formas: simbiose ou endossimbiose com diferentes graus de proximidade com as raízes e outros tecidos das plantas (Bacon e Hinton, 2006).

Desde o ponto de vista da produtividade agrícola, as relações mutualistas, onde há um benefício mútuo entre a planta e os microrganismos associados, é muito importante, pois, em muitos casos, o sucesso de uma cultura, em termos de rendimento da produção, pode estar vinculado diretamente à estes tipos de relações,

entre outros benefícios (Batista et al., 2018). Esses tipos de relações têm sido amplamente estudadas e constituem o foco deste trabalho.

A camada de solo mais próxima das raízes, denominada rizosfera, é o lugar com maior número de interações entre a planta e os microrganismos, sendo o solo o principal reservatório de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal ("Plant growth-promoting rhizobacteria" - PGPR) (Bhattacharyya e Jha, 2012). A rizosfera compõe um habitat ideal para os microrganismos, já que nesta região encontram-se uma gama de compostos liberados pelas plantas, os exsudatos, que são utilizados no metabolismo e crescimento microbiano, tais como açúcares, lípidos, proteínas, ácidos orgânicos e aminoácidos (Rout, 2014).

A interação dos microrganismos com as plantas na rizosfera pode ocorrer de diferentes formas: microrganismos de vida livre localizados na matriz do solo rizosférico, microrganismos associados à superfície da raiz da planta ou rizoplano, e microrganismos que se encontram dentro dos tecidos da raiz, nos espaços intercelulares ou intracelulares. Este último grupo de microrganismos é conhecido como endofíticos (Andreote et al., 2009; Santoyo et al., 2016).

O aprimoramento na captação de nutrientes essenciais para as plantas através da ação microbiana representa um dos traços de maior interesse na busca de microrganismos promotores de crescimento vegetal ("Plant growth-promoting microbes" PGPM) (Schlaeppli e Bulgarelli, 2015). Grande parte destes microrganismos apresentam genes que conferem capacidade metabólica para realizar reações complexas de forma espontânea, tornando-os uma alternativa ecologicamente sustentável reduzindo o uso dos fertilizantes químicos que visam suprir deficiências nutricionais (Owen et al., 2015).

No trabalho de Berendsen et al. (2012) foram identificadas várias funções e analogias entre o papel do microbioma das plantas e o microbioma do corpo humano em vários aspectos. O microbioma associado ajuda na melhor absorção de nutrientes em ambos casos, pois, nas plantas, as bactérias, fungos e micorrizas ajudam na absorção e mineralização de nutrientes, assim como ocorre com a microbiota presente no intestino humano, podendo prevenir a colonização de patógenos por antagonismo, competindo e produzindo enzimas ou expressando outros mecanismos (da Silveira et al., 2019).

E em relação à densidade e diversidade dos microrganismos associados, o microbioma de cada organismo é caracterizado pelo alto número de células em determinados compartimentos - por exemplo na planta, a rizosfera, rizoplane e raiz, são os lugares com maior contagem de microrganismos - onde acontecem as principais reações de transformação e entrada de nutrientes. Da mesma forma, no corpo humano, o intestino grosso seria o equivalente, pois possui a maior contagem e diversidade de bactérias, fungos e leveduras (Berendsen et al., 2012).

Por último, ressalta-se o papel do microbioma manutenção da saúde e a homeostasia dos solos. O estado de saúde é dado pela presença de grupos específicos de bactérias e fungos, o qual foi testado por Huang et al., (2020) ao inocular *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* e *Paecilomyces lilacinus*, em solos infestados com nematoides obtendo uma resposta de declínio destes e identificando características que podem ser consideradas chaves para solos saudáveis.

Por fim, num trabalho que recolhe dados sobre diferentes estudos do microbioma de diferentes ambientes com a finalidade de encontrar elementos comuns, Banerjee et al., (2018) identificam uma série de táxons associados a diferentes ecossistemas, que incluem ecossistemas aquáticos, solos (florestais e agrícolas) e pastagens. Estes táxons, comuns e predominantes, se constituem como indicadores da estabilidade destes ambientes. No caso de pastagens foram identificados: *Burkholderiales*, *Sphingobacteriales*, *Clostridiales*, *Actinomycetales* e *Acidobacteria*. No caso de solos de floresta: *Actinomycetales*, *Acidobacteria*, *Rhizobiales*, *Burkholderiales*, *Clostridiales*, *Sphingobacteriales*, *Rhodobacteriales* e *Verrucomicrobia*, e no caso de solos agrícolas foram os seguintes: *Gemmatimonas*, *Acidobacteria*, *Xanthomonadales*, *Rhizobiales*, *Burkholderiales*, *Solirubrobacterales* e *Verrucomicrobia*.

2.3. Microrganismos promotores de crescimento em plantas (“plant growth-promoting microorganisms – pgpm”)

Diversos microrganismos associados às plantas podem promover uma série de benefícios, e estes são referidos na literatura como microrganismos promotores de crescimento (PGPM) (Abhilash et al., 2016). Os PGPM são fundamentais para o desenvolvimento vegetal pleno e podem atuar para benefício das plantas de diversas formas, direta ou indiretamente, seja favorecendo a obtenção de nutrientes, sintetizando compostos, atenuando e prevenindo doenças, entre outras (Vejan et al., 2016).

As PGPR (“plant growth-promoting rhizobacteria”) podem ser classificadas em dois tipos, dependendo de sua localização na planta e das células do hospedeiro: um primeiro grupo de PGPR, presentes no ambiente extracelular chamadas de ePGPR (“extracelular plant growth-promoting rhizobacteria”), e um segundo grupo chamado de iPGPR (“intracellular plant growth-promoting rhizobacteria”). As primeiras (ePGPR) são encontradas na rizosfera e rizoplane ou nos espaços intercelulares das células do córtex radicular. Já as iPGPR são encontradas em estruturas especializadas da raiz, como no caso dos nódulos (Martínez-Viveros et al., 2010; Vejan et al., 2016).

As bactérias PGPR apresentam uma série de características ou traços metabólicos que são responsáveis pela modulação e alterações positivas na fisiologia da planta. A fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização de fósforo e potássio, produção de fitohormônios, produção de sideróforos, produção de exopolissacarídeos e rizoremediação, são chamados de mecanismos diretos, enquanto que a tolerância ao estresse abiótico e biótico, resistência a doenças: antibioses, resistência sistêmica induzida (ISR), produção de enzimas protetoras, compostos orgânicos voláteis (VOC's) são chamados de mecanismos indiretos (Bhattacharyya e Jha, 2012; Kumar e Verma, 2018).

A seguir serão apresentados os principais traços de promoção de crescimento vegetal dos mecanismos citados.

Fixação biológica de nitrogênio: O nitrogênio é um nutriente fundamental para todas as formas de vida, necessário para a síntese de biomoléculas, como proteínas e ácidos nucleicos. Embora a forma gasosa (N_2) deste elemento seja abundante na atmosfera, as plantas não são capazes de absorvê-la diretamente. Logo, para impedir a falta deste nutriente e garantir boa produtividade nas

plantações, é comum o uso de fertilizantes químicos contendo este elemento (de Souza et al., 2015). No entanto, PGPM diazotróficos, realizam a fixação biológica de nitrogênio (FBN), processo que converte o N_2 em sua forma amoniacal (NH_3), sendo este biodisponível para a absorção vegetal (Zgadza et al., 2016).

Apesar da grande diversidade de PGPM diazotróficos conhecidos, a base do processo de FBN ocorre pela enzima nitrogenase, composta por proteínas codificadas pelo grupo de “operons” *nif* (Angel et al., 2018). Plantas da família *Fabaceae* possuem relações simbióticas com bactérias diazotróficas presentes no solo, conhecidas como rizóbios (família *Rhizobiaceae*). Os rizóbios se estabelecem em nódulos radiculares, que possuem baixa concentração de oxigênio, condição necessária para o processo de FBN, uma vez que o oxigênio é um conhecido inibidor da nitrogenase (Ahmad et al., 2012; Rosenblueth et al., 2018).

A inoculação de PGPM fixadores de nitrogênio em cultivos, com o propósito de suplementar este nutriente, já é bem estabelecida, com inúmeras linhagens comerciais disponíveis, cuja eficiência em aprimorar o fitness de plantas de interesse agrônomo é comprovada. Dentre estas encontram-se espécies dos gêneros *Azospirillum*, *Rhizobium* e *Azotobacter* (Baldani e Baldani, 2005; Baldani et al., 2014).

Solubilização de fosfatos: O fósforo é nutriente limitante para o desenvolvimento das plantas, fazendo parte da estrutura dos ácidos nucleicos e fosfolipídios, além de ser um elemento chave para diversas reações metabólicas. Embora seja um elemento comum no solo, está predominantemente em formas insolúveis, às quais não são absorvidas pelas plantas, fazendo-se necessário o uso de fertilizantes fosfatados para suprir sua deficiência (Sarabia et al., 2018; Qiao et al., 2019). No entanto, as plantas são capazes de absorver pequenas concentrações destes fertilizantes, com o excedente residual convertendo-se em formas insolúveis e que podem causar impactos ambientais (Backer et al., 2018).

Alguns microrganismos são capazes de transformar o fósforo insolúvel em íons absorvíveis pelas plantas por meio de processos de solubilização e mineralização do fósforo inorgânico (Pi) e orgânico (Po) presente solo, respectivamente. Os PGPM solubilizadores de Pi realizam este processo através da secreção de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, tais como ácidos glicólicos,

cítricos, lácticos, entre outros (Rodríguez e Fraga, 1999). A mineralização de Po, por sua vez, ocorre após a decomposição da matéria orgânica presente no solo, da qual restará uma série de moléculas orgânicas contendo Po, que são então, desfosforiladas por PGPM produtores de fosfatases (Roca et al., 2013; Zhang et al., 2015).

Produção de siderofóros: as PGPM também desempenham um importante papel na disponibilização de ferro no solo, visto que, assim como o fósforo, apenas uma pequena parcela se encontra em seu estado solúvel e a biodisponibilidade é baixa (Al Shaer et al., 2020). Estes PGPM secretam moléculas chamadas de siderofóros, que possuem baixo peso molecular e alta afinidade com íons de ferro. Estas moléculas sequestram íons férricos (Fe^{+3}) presentes no solo e que, após serem transportadas para o interior celular, são reduzidos a íons ferrosos (Fe^{+2}), tornando-se disponíveis para a absorção vegetal (Dimkpa, 2016; Li et al., 2016). Masalha et al., (2000), reportaram a importância destes microrganismos para a obtenção de ferro, após demonstrarem que girassóis (*Helianthus annuus*) cultivados em meios estéreis tiveram crescimento deficiente atribuído à falta de ferro.

Fitormônios: Estima-se que 80% dos microrganismos presentes na rizosfera possam produzir reguladores de crescimento vegetal (Batista et al., 2018) que, apresentam capacidade de regular diversos processos relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, por meio de alterações fisiológicas e morfológicas. Os reguladores de crescimento vegetal são classificados em grupos, sendo os mais comuns: auxinas, giberelinas, citocininas, etileno e ácido abscísico (Baetz e Martinoia, 2014).

As auxinas participam dos processos de tropismo, dominância apical, diferenciação tecidual, formação de raízes, pelos radiculares, dentre outros. O composto mais conhecido desta categoria é o ácido indol-3-acético (AIA), sintetizado naturalmente por plantas e bactérias (Madhaiyan et al., 2004; Tsukanova et al., 2017). A produção de AIA corresponde ao principal mecanismo acerca dos efeitos benéficos dos PGPM (Silveira et al., 2016).

Bactérias rizoféricas, como as dos gêneros *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* e *Erwinia*, figuram como as principais produtoras de AIA, atuando principalmente no aumento de densidade radicular (Taulé et al., 2012; Shen e

Fulthorpe, 2015; Barra et al., 2016). Da Costa et al. (2014) demonstraram que bactérias endofíticas de raiz, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, apresentam traços genéticos que apontam para uma alta produção de AIA. Dobbelaere et al., (1999), ao testarem o papel da produção de AIA pela bactéria *Azospirillum brasilense* na promoção de crescimento, verificaram que plantas inoculadas com cepas selvagens apresentaram aumento considerável na quantidade de pelos radiculares. Em contrapartida, as plantas inoculadas com cepas mutantes de *A. brasilense*, contendo inserções no gene *ipdC* (indol-3-piruvato descarboxilase) que codifica uma enzima chave na produção da AIA, não demonstraram qualquer benefício.

Genes relacionados à produção de giberelinas e citocininas também são encontrados em PGPM; porém, o papel destes compostos sintetizados por microrganismos, bem como os mecanismos por trás de tal produção, ainda não são totalmente compreendidos (Abhilash et al., 2016). No entanto, alguns resultados benéficos podem ser observados após a inoculação destes PGPM. Khan et al. (2014), reportaram aumento significativo no tamanho de brotos, raízes e conteúdo clorofílico de tomateiros inoculados com as bactérias produtoras de giberelina, do gênero *Sphingomonas*. Em estudo posterior, evidenciou-se a capacidade destas bactérias em aumentar a resistência de plantas ao estresse salino (Davis et al., 2018).

Arkhipova et al., (2005), através da inoculação de *Bacillus subtilis* em alface, evidenciaram um aumento de concentração endógena de citocinina, além de um maior tamanho dos brotos e raízes das plantas inoculadas. Liu et al., (2013) relacionaram a produção de citocininas de *B. subtilis* à capacidade de brotos de pinheiros (*Platycladus orientalis*) resistirem ao estresse hídrico em ambientes áridos. Contudo, PGPM aparentam produzir menores concentrações de citocininas quando comparados a fitopatógenos que também produzem estes compostos. Logo, a quantidade produzida desta classe de reguladores pode ser um fator determinante entre o efeito estimulante ou inibidor do crescimento vegetal (Arkhipova et al., 2005).

Indução de resistência sistêmica: Os benefícios das PGPM não se limitam apenas às bactérias. Em um trabalho recente desenvolvido por Sharma e Sharma, (2017), usou-se uma combinação do fungo *Rhizophagus irregularis* e bactérias PGPR *Pseudomonas jessenii* strain R62 e *Pseudomonas synxantha* strain R81 em plantas de tomateiro (*Solanum lycopersicum* cv. PT-3). Avaliando as trocas

bioquímicas e fisiológicas durante a infecção com o nematódeo fitopatogênico *Meloidogyne incognita*, verificou-se em uma melhor tolerância e diminuição dos efeitos da infecção e um aumento na produção de enzimas com papel na defesa da planta: peroxidase, polifeniloxidase e superóxido dismutase.

Mecanismos de indução da resistência sistêmica: As infecções produzidas por bactérias, fungos ou vírus, podem induzir à síntese de um tipo de resposta na maioria das plantas. Inicialmente, essa resposta é um sinal localizado no lugar da infecção que pode se espalhar por toda a planta. Dentro deste sinal, o ácido salicílico se encontra vinculado ao mecanismo chamado SAR (*systemic acquired resistance*). Dentro deste sistema, o ácido salicílico possui um papel muito importante (Shah, 2003; Vlot et al., 2009). O sistema de resistência adquirida (SAR) é ativado após ataque de um patógeno, reconhecimento de lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas, flagelina, glicanos de parede celular e peptídeoglicano. Depois de reconhecer o sinal, a planta expressa diferentes tipos de mecanismos de resposta, que incluem produção de determinadas proteínas, fitoalexinas com capacidade antimicrobiana, endurecimento de parede celular, sinais que podem chegar até partes distantes da planta quando são transportadas pelo floema (Kumar, 2014).

O sistema ISR (*Induced systemic resistance*) pode ser iniciado pela colonização de PGPR ou fungos. Este sistema e o sistema SAR são sistemas diferentes e independentes. O sistema ISR depende do ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) (Kumar, 2014; Burketova et al., 2015) e pode ser definido como o estado em que a planta apresenta um alto nível de resistência aos fitopatógenos pela ativação prévia de rotas de defesa geneticamente programadas. Devido à importância deste sistema e dos microrganismos PGPM para a agricultura moderna, seu estudo tem sido desenvolvido com profundidade e vários trabalhos avaliam o uso e o efeito na indução de resistência sistêmica na planta inoculada (Choudhary et al., 2007).

A ativação do ISR na planta, depende de diferentes tipos de moléculas expressas pelas bactérias PGPR: lipopolissacarídeos de parede celular (Sumayo et al., 2013), produção de siderofóros, ácido salicílico (Choudhary et al., 2007), lipopeptídeos cíclicos (De Vleeschauwer et al., 2008), enzimas líticas para degradação de parede celular tais como: β -1,3-glicanase, chitinase, celulase, e protease (Olanrewaju et al., 2017), e exopolissacarídeos secretados no meio externo

da célula (Haggag e Timmusk, 2008). Vários deles podem ser sintetizados ao mesmo tempo em diferentes locais da planta como a rizosfera e o filopiano.

2.4 Microbioma fundamental associado às plantas e construção de comunidades sintéticas

A presença redundante de funções no microbioma associado a diferentes tecidos da planta tem sido identificada como um aspecto comum, e isto tem levado a identificar que estas funções podem ser desempenhadas por um número reduzido dos membros que constituem essas comunidades e que beneficiam as plantas em diferentes aspectos (Shade e Handelsman, 2012; Bulgarelli et al., 2013; Vandenkoornhuysen et al., 2015; Banerjee et al., 2018). Estas funções podem ser observadas a partir das análises bioinformáticas, onde existem sobreposições de determinadas funções a partir da comparação entre comunidades de diferentes nichos, estabelecendo um *microbiome core*, que é definido como o conjunto de membros compartilhados entre consórcios microbianos de habitats semelhantes, e é representado pelas áreas sobrepostas de círculos em diagramas de Venn (Shade e Handelsman, 2012).

De modo geral, o microbioma associado ao hospedeiro, e presente em praticamente todos os tecidos, fornece uma série de benefícios à saúde e bem-estar geral, conhecidos como *fitness*. Este microbioma pode ser acessado e selecionado a partir da resposta fenotípica do hospedeiro com a finalidade de gerar benefícios específicos. O uso deste tipo de abordagem é conhecido como seleção microbioma mediada pelo hospedeiro (Mueller e Sachs, 2015). O fato de conhecer as diferentes funções dos membros das comunidades associadas aos diferentes tecidos, no caso das plantas, tem levado à aplicação deste tipo de abordagem direcionada a tecidos como raiz (Martínez-Hidalgo et al., 2019) devido à alta diversidade e quantidade de microrganismos, que podem colonizar outros tecidos da planta melhorando o *fitness* da mesma, assim como outros tipos de benefícios (Quiza et al., 2015).

A aplicação dessas abordagens tem levado ao desenvolvimento de comunidades sintéticas (Alnahhas et al., 2020), cuja maioria destes consórcios microbianos construídos como inoculantes de plantas, vieram da metodologia empírica de combinar microrganismos benéficos com múltiplas funções baseada na seleção de fenótipos ideais (Qin et al., 2016).

Atualmente, estes tipos de abordagem têm se beneficiado das técnicas de sequenciamento de alto rendimento e análises bioinformáticas na busca dos melhores candidatos, os quais são posteriormente testados e avaliados como possíveis colonizadores dos diferentes tecidos da planta (de Souza et al., 2019), e desenvolvidos como inoculantes comerciais disponíveis no mercado (Mhlongo et al., 2018)

2.5 Culturômica como ferramenta para o acesso e prospecção do microbioma cultivável associado às plantas

As ferramenta dependentes de cultura, usadas para acessar o microbioma das plantas, são baseadas principalmente em culturômica, ou seja, no uso de meios de cultura com a finalidade de recuperar uma fração do microbioma cultivável para obter bactérias, arqueias, fungos e leveduras, na forma de culturas puras que possam ser identificadas, sequenciadas, e seus genomas montados e anotados. Isso proverá informações sobre sua classificação, genética e fisiologia, sendo considerados como dados de maior qualidade frente a dados metagenômicos (Sarhan et al., 2019).

A culturômica integra uma série de técnicas dependentes e não dependentes de cultivo, entre as quais estão o uso de meios de cultura adequados para a recuperação de microrganismos presentes em certos ecossistemas, emulando as condições nutricionais e ambientais para o desenvolvimento dos microrganismos com a finalidade de superar o problema da pouca culturabilidade de muitas espécies de bactérias (Epstein, 2013).

Os meios de cultura geralmente são seletivos, pois não suportam o crescimento de todos os grupos de microrganismos, sendo possível encontrar meios

de cultura que conseguem, até certo ponto, reproduzir as condições nutricionais de um nicho. Isso pode ser observado em formulações que têm, entre seus componentes, extratos vegetais como, por exemplo, o meio batata dextrose para crescimento de fungos filamentosos e leveduras em geral (Hermann Desire et al., 2014). Um outro exemplo são os meios que contêm extrato de solo para o cultivo de bactérias de solo, como é o caso dos meios usados para isolar, identificar e manter bactérias fixadoras de nitrogênio (Baldani et al., 2014).

É possível aplicar o mesmo princípio no desenvolvimento de meios que possam recuperar um número maior de microrganismos de determinado ambiente, através do reconhecimento das condições nutricionais do meio em que se encontram esses microrganismos, fisiologia de grupos microbianos de interesse e busca de traços funcionais ou atividade metabólica específica com a finalidade de selecionar grupos de interesse.

Ferramentas para o estudo do microbioma associado às plantas incluem isolamento, caracterização e inoculação em plantas modelo para testes *in planta* ou inoculadas diretamente em culturas relacionadas. Um exemplo é o trabalho desenvolvido por Verma et al., (2018), onde exploram o potencial de bactérias PGPR isoladas de sementes de *Leersia oryzoides* L., relacionada ao arroz (*Oryza sativa*). Isolaram bactérias dos gêneros: *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Paenibacillus* e *Chryseobacterium*. Os isolados foram testados em sementes de arroz e grama Bermuda (*Cynodon dactylum*) encontrando efeitos da inoculação no crescimento de plantas de arroz, colonização de tecidos e outros traços de promoção de crescimento, demonstrando a compatibilidade do microbioma cultivável entre plantas relacionadas. Um trabalho semelhante foi desenvolvido por Shehata et al., (2017), onde foi testado um grupo de isolados de milho ancestral e comercial (*Zea mays ssp. mays*, *Zea mays ssp. mexicana* e *Zea nicaraguensis*) do centro e norte americanos para avaliar promoção de crescimento vegetal. Avaliou-se parâmetros de aumento do peso fresco da raiz e parte aérea como resultado da inoculação de azevem anual (*Lolium multiflorum*), e por ser uma gramínea, os autores demonstraram a compatibilidade de microrganismos PGPR entre plantas da família Poaceae.

Por outro lado, existem abordagens dentro da culturômica em que a recuperação de microrganismos está voltada para uma característica específica, por exemplo, o metabolismo do ácido 1-carboxílico-1-aminociclo-propano (ACC) pela

enzima acc-desaminase (Glick, 2005). Neste caso, o meio de cultura deverá ser quimicamente definido e contar com o substrato ACC, como no caso do meio Dworkin and Foster (1958) o qual foi usado por Penrose e Glick, (2003) e suplementado com ACC 3 mM com única fonte de carbono, para induzir o crescimento de bactérias que potenciais metabolizadores desta molécula.

2.6 Metagenômica e metataxonômica: ferramentas independentes de cultura para o acesso ao microbioma

O estabelecimento de novas abordagens no estudo de diversidade genômica e função gênica de microrganismos ditos “não cultiváveis”, decorre da dificuldade em cultivar grande parte da microbiota presente na natureza, estima-se que apenas algo entre 0,1 e 1,0% sejam cultiváveis por meio de métodos tradicionais de cultivo (Torsvik et al., 2002; Streit e Schmitz, 2004).

Basicamente, a metagenômica está dividida em duas abordagens principais - estrutural e funcional - que visam investigar aspectos diferentes relacionados à comunidade microbiana e ao ambiente. A abordagem de metagenômica estrutural consiste em estudar a organização da comunidade a partir da identificação dos microrganismos presentes em amostras ambientais, ou ainda, na reconstrução das complexas redes metabólicas para compreender as funções estabelecidas entre os membros da comunidade. Já a metagenômica funcional visa identificar genes que codificam funções de interesse, com propósito de realizar triagens baseadas em atividades específicas (Alves et al., 2018).

Estudos baseados na diversidade taxonômica, que consistem em avaliar quais são os microrganismos presentes em uma determinada amostra ambiental, são denominados de metataxonômica (Marchesi e Ravel, 2015), ou “metabarcoding” (Dormontt et al., 2018; Lamb et al., 2019). Este tipo de abordagem, utilizando genes marcadores, tais como o gene da subunidade ribossomal menor 16S (gene 16S rRNA) para bactérias e arqueas (Janda e Abbott, 2007) e o espaçador interno transcrito (ITS, do inglês “Internal transcribed spacer”) para fungos (Schoch et al., 2012), são frequentemente referidos como estudos metagenômicos devido à origem

da amostra, neste caso, a amostra é considerada como uma amostra metagenômica, mas não a abordagem em si, pois neste tipo de análise o estudo está focado em um único gene, e não no conteúdo gênico total da amostra (Quince et al., 2017).

Um outro aspecto relevante quanto ao procedimento experimental é no caso em que a microbiota alvo encontra-se associada a um hospedeiro, onde processos adicionais de purificação podem ser demandados, uma vez que o material genético do hospedeiro pode afetar significativamente a composição final de DNA que será sequenciado, em detrimento da porção microbiana (Thomas et al., 2012). Técnicas como fracionamento físico, lise seletiva de DNA do hospedeiro, dentre outras formas de enriquecimento do material alvo, podem ser implementadas a fim de minimizar contaminação por DNA não desejado (Burke et al., 2009; Thomas et al., 2012).

Dentre os marcadores mais utilizados incluem-se: o gene 16S rRNA e ITS, que possuem tais características (Janda e Abbott, 2007). Além do gene marcador, a escolha da região específica a ser amplificada, e posteriormente sequenciada, deve ser feita de acordo com o objetivo almejado, sendo que a resolução destas para designar táxons, mesmo dentro de grupos taxonômicos específicos, pode variar (Bukin et al., 2019). Chakravorty et al. (2007) demonstram, por exemplo, que as regiões hipervariáveis V2 e V3 do gene 16S rRNA são as mais adequadas para distinção de gêneros patogênicos de enterobactérias. No entanto, a região hipervariável V4 desse mesmo gene tem sido adotada como padrão no estudo de comunidades bacterianas nos mais diversos tipos de amostras, possuindo amplo suporte na literatura e protocolos dedicados, além de ser recomendada por consórcios internacionais, como o “Earth Microbiome Project” - EMP (Bikel et al., 2015).

A análise de dados de amplicons pode variar consideravelmente no modo e ordem em que os processos podem ser realizados. De forma geral, o fluxo de trabalho pode ser resumido pelas seguintes etapas: controle de qualidade, agrupamento e contagem de sequências, designação (ou atribuição) taxonômica e análises posteriores, tais como as de avaliação de diversidade e de associações com os parâmetros ambientais (Plummer e Twin, 2015).

No trabalho de investigação profunda de microrganismos associados à cana-de-açúcar realizado por Yeoh et al. (2017), reportou-se o microbioma essencial de raiz de cana-de-açúcar, considerando a influência de fertilizantes nitrogenados, a qual foi baixa para determinar a abundância de organismos diazotróficos. Nesse trabalho

foram obtidos dados de sequenciamento de amplicons 16S para 432 amostras, sendo 216 associadas a raízes (rizosfera, rizoplane e endofíticas de raiz) de 3 cultivares, além de 216 de solos virgens, considerando 2 tipos de solo e 2 localizações geográficas em 2 estações. Foram identificadas 12.199 OTUs a partir de 1,2 milhão de leituras de amplicons obtidas com 454 FLX Titanium. O Sequenciamento Completo de Metagenomas (“Whole Metagenome Sequencing” - WMS) a partir de um subconjunto das mesmas amostras foi realizado no Illumina HiSeq2500 gerando em torno de 1 bilhão de leituras (2×150 pb), a partir das quais foram identificados genes relacionados ao metabolismo do nitrogênio (i.e., aos processos de fixação de nitrogênio, hidrólise de ureia, nitrificação, desnitrificação e redução assimilatória/dissimilatória do nitrato). A abundância relativa desses genes assim como a de organismos diazotróficos não sofreu grande influência de acordo com a fertilização. Com isso, os autores concluíram a baixa influência da fertilização no microbioma.

Em trabalho anterior, PISA et al. (Pisa et al., 2011), com proposta semelhante, chegaram à mesma conclusão sobre a influência da fertilização nitrogenada. Foram encontradas apenas 200 OTUs. Já NAVARRETE et al. (Navarrete et al., 2015) encontraram alterações significativas de acordo com os tratamentos considerados em seu estudo de avaliação do efeito da adição de fertilizantes orgânicos e inorgânicos, e retenção de palhada na comunidade microbiana do solo com cultivo de cana-de-açúcar em experimento controlado em cada de vegetação. Neste último caso, os dados foram de WMS de amostras de solo sob diferentes tratamentos. Esses trabalhos recém-publicados (Navarrete et al., 2015; de Souza et al., 2016; Yeoh et al., 2017), assim como outros, que consideraram microrganismos no solo ou em associação com as plantas, demonstraram que a utilização das tecnologias NGS permitiu descobertas antes limitadas pela baixa capacidade de amostragem para avaliar riqueza e diversidade.

Por fim, podemos afirmar que as análises de dados de sequenciamento (“Targeted Amplicon Sequencing” – TAS ou “Whole-metagenome Sequencing” – WMS) são essenciais para determinar de forma mais abrangente a diversidade e estrutura das comunidades microbianas associadas à cana-de-açúcar. Porém, são complementares aos estudos que vêm sendo realizados para a caracterização bioquímica de isolados (Pisa et al., 2011; Silveira et al., 2016) e avaliação efetiva dos benefícios às plantas (MARCOS et al., 2016).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta de Material vegetal

Plantas de cana-de-açúcar do cultivar CTC9001 (Centro de Tecnologia Canavieira, Piracicaba, SP, Brasil) foram coletadas a partir de dois talhões com idade de 11-12 meses, em fazendas com diferentes tipos de manejo agrônomo, na região do município de Jaboticabal, SP, Brasil. Fazenda São José (Coordenadas 21°11'41.90"S, 48°14'35.62"W), e Fazenda São Sebastião (Coordenadas 21°11'55.56"S, 48°14'46.17"W). As duas fazendas se distinguem pelo método de manejo da cultura de cana-de-açúcar.

Na Fazenda São José é utilizado o sistema de manejo orgânico (produção orgânica certificada a partir do ano 2.006), e na Fazenda São Sebastião, o sistema de manejo convencional. Amostras compostas de solo foram coletadas para avaliação das propriedades químicas dos solos (Tabela 1).

As coletas foram realizadas em dois talhões separados por uma distância de aproximadamente 100 metros a partir de 8 pontos, com 4 a 5 dias de diferença para cada ponto de coleta, no período entre fevereiro e março de 2018 (Figura 1). Na coleta foram considerados, no mínimo, 2 indivíduos no entorno, devidamente organizados por tecido. Dessa forma, folhas, colmos e raízes foram armazenados em sacos estéreis e transportadas em caixa térmica com gelo até o laboratório onde foram processados imediatamente.

3.2. Processamento do material vegetal para obtenção de comunidades endofíticas e epifíticas

Para acessar as comunidades epifíticas referentes aos tecidos das folhas, colmos e raízes da cana-de-açúcar, foi realizada lavagem dos tecidos utilizando 1 L de solução Tampão Fosfato-Salino ("Phosphate Buffered Saline" - PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) e Tween 20 (0,05% vol/vol), em uma bandeja estéril para cada amostra, condicionadas a uma temperatura média de 4-8°C. A solução resultante da lavagem foi filtrada usando várias camadas de gaze estéril e centrifugada a 6.000 × *g* por 40 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o "pellet" referente às amostras enriquecidas das comunidades microbianas epifíticas (colmos e folhas) foram aliquotadas em tubos. As comunidades endofíticas foram obtidas a partir do material vegetal lavado previamente com PBS + Tween 20 durante etapa de extração das comunidades epifíticas. Em seguida, esse material foi lavado com água ultrapura estéril (três vezes) e picado.

Para as folhas e raízes, foi utilizada uma porção de 100 g de amostra picada, enquanto que para o colmo foi utilizada uma porção de 300 g adicionados a uma solução gelada de PBS; estas foram individualmente processadas em liquidificador previamente esterilizado com solução de hipoclorito de sódio comercial 2-2,5%. O homogeneizado resultante de cada amostra foi filtrado em camadas de gaze estéril e foi centrifugado a 6.000 × *g* por 40 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o "pellets" referente às amostras enriquecidas das comunidades microbianas endofíticas de colmos, folhas e raízes foram aliquotadas para o plaqueamento.

Para a identificação das amostras e sua origem foi criada uma nomenclatura baseada na amostra ou tecido da planta e o tipo de manejo, o qual é apresentado na Tabela 2.

Tabela 1. Resultados de análises químicas realizadas nas amostras compostas de solo tomadas dos talhões de cana-de-açúcar convencional (SRLC) e orgânico (SRLO). As amostras foram colocadas em recipientes adequados e enviados a laboratório local

AMOSTRAS	pH	M.O.	P	S	Ca	Mg	Na	K	Al	H+Al	Soma Bases	CTC	Sat.	Sat.
										SMP	S.B.			Bases
	CaCl ₂	g dm ⁻³	---mg dm ⁻³ ---	-----mmol _c dm ⁻³ -----									V%	m%
SLRC-R1	5,6	13	16	8	35	8	NS	1,3	0	17	44,3	61,3	72	0
SRLC-R2	5,4	20	12	8	24	10	NS	0,9	1	27	35,2	62,1	57	2
SRLC-R3	5,4	16	16	19	32	7	NS	1,4	0	25	40,7	65,5	62	0
SRLC-R4	5,5	20	14	6	28	9	NS	1	0	21	38,6	59,9	64	0
Média	5,46	17,45	14,27	10,2	29,93	8,64	NS	1,15	0,25	22,5	39,71	62,2	63,91	0,66
Desvio padrão	0,08	3,44	2,1	6,06	4,78	1,3	NS	0,24	0,24	4,33	3,82	2,36	6,48	0,69
SLRO-R1	5,5	20	16	8	37	11	NS	3,3	0	19	50,5	69,3	73	0
SRLO-R2	6	18	5	6	33	11	NS	1,5	0	18	46,3	64,5	72	0
SRLO-R3	5,5	19	20	6	32	11	NS	2,2	0	25	45,2	69,9	65	0
SRLO-R4	5,6	21	14	5	31	10	NS	1,5	0	22	42,4	64,2	66	0
Média	5,66	19,57	13,57	6,1	33,28	10,67	NS	2,12	0,05	20,9	46,08	66,98	68,81	0,11
Desvio padrão	0,22	0,98	6,37	1,32	2,49	0,48	NS	0,86	0,06	2,99	3,36	3,06	4,07	0,13

pH - em CaCl₂ por potenciometria - H+Al - em Tampão SMP por potenciometria - M.O - por Espectrofotometria - P - em resina por Espectrofotometria - S - por Turbidimetria

Ca - por Espectrometria de Absorção Atômica - Mg - por Espectrometria de Absorção Atômica - Na - por Espectrometria de Absorção Atômica

K - por Espectrometria de Absorção Atômica - Al - em KCl por titulometria - S.B. = Ca+Mg+Na+K - CTC = S.B+H+Al - V% = (SB/CTC)* 100 -

m% = (Al/(SB+Al))*100

Ref. IAC 2001

Observações: NS = Não Solicitado LQ = Limite de Quantificação

Limites de Quantificação: pH - 3,5 a 8,0 | H+Al - 5 a 588 mmol_c/dm³ | MO - 2 g/dm³ | S - 1 mg/dm³ | Ca - 1 mmol_c/dm³ | Mg - 0,2 mmol_c/dm³

K - 0,1 mmol_c/dm³ | Na - 0,1 mmol_c/dm³ | P - 1 mg dm³ | Al - 0,6 mmol_c/dm³

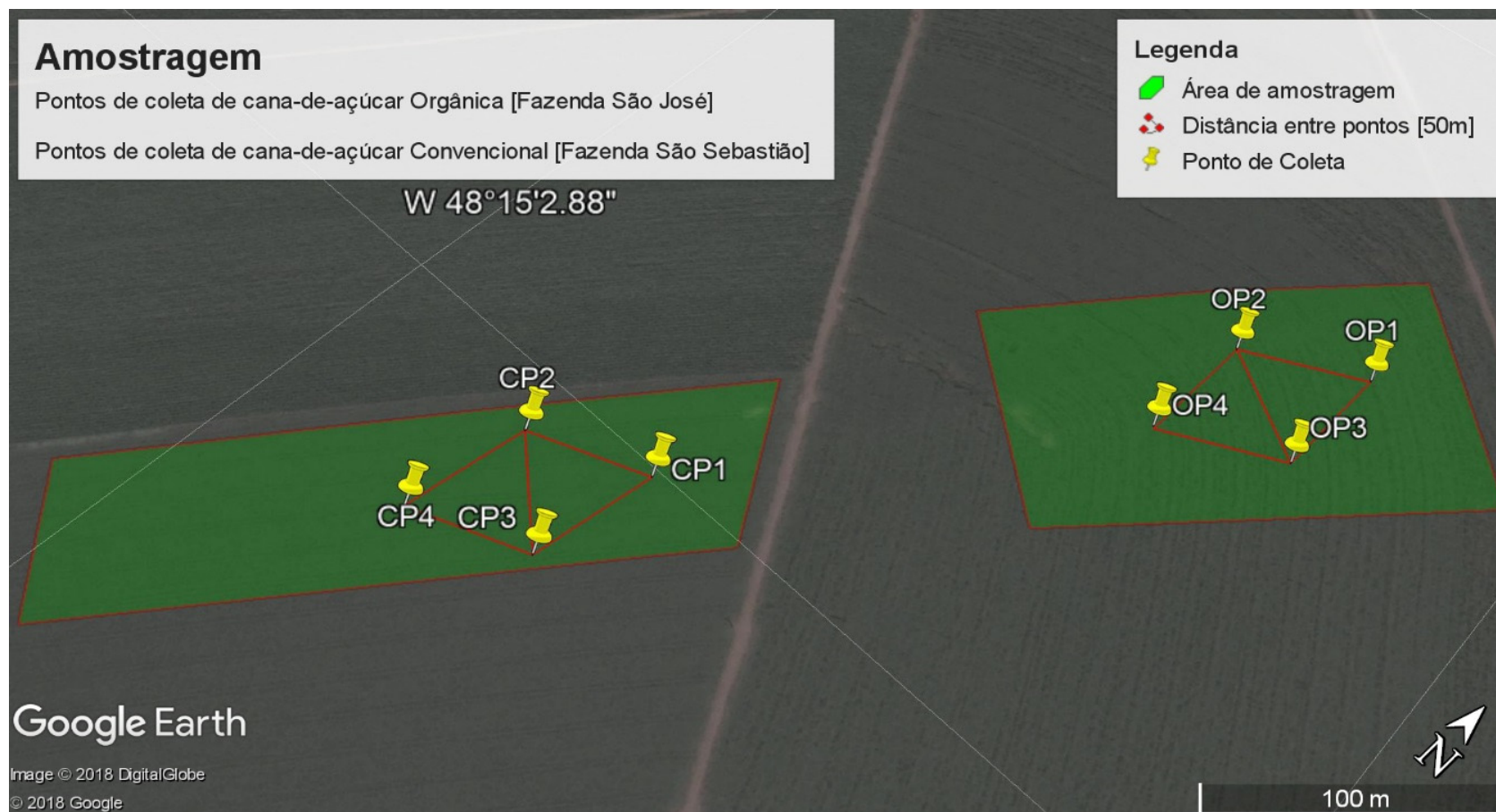


Figura 1. Imagem de satélite dos talhões de cana-de-açúcar CTC9001. Plantio convencional da Fazenda São Sebastião (esquerda) e plantio orgânico da Fazenda São José (direita). Os pontos de amostragem entre os talhões foram escolhidos com distância aproximada de 50 metros entre os pontos das coletas, as quais foram realizadas nos meses de fevereiro e março de 2018.

Tabela 2. Nomenclatura aplicada às amostras obtidas a partir dos diferentes tecidos da cana-de-açúcar e sua descrição.

Ambiente	Abreviatura	Material	Descrição
Cultivo Orgânico	OLN	Folhas (“ <i>Leaves</i> ”)	Endofíticos (“ <i>Endophytic</i> ”) de Folhas
	OLP		Epifíticos (“ <i>Epiphytic</i> ”) de Folhas
	OSN	Colmos (“ <i>Stalks</i> ”)	Endofíticos (“ <i>Endophytic</i> ”) de Colmos
	OSP		Epifíticos (“ <i>Epiphytic</i> ”) de Colmos
	ORN	Raízes (“ <i>Roots</i> ”)	Endofíticos (“ <i>Endophytic</i> ”) de Raízes
	ORP		Epifíticos (“ <i>Epiphytic</i> ”) de Raízes
	ORZ	Solo (“ <i>Soil</i> ”)	Solo rizosférico (“ <i>Rizosphere</i> ”)
Cultivo Convencional	CLN	Folhas (“ <i>Leaves</i> ”)	Endofíticos (“ <i>Endophytic</i> ”) de Folhas
	CLP		Epifíticos (“ <i>Epiphytic</i> ”) de Folhas
	CSN	Colmos (“ <i>Stalks</i> ”)	Endofíticos (“ <i>Endophytic</i> ”) de Colmos
	CSP		Epifíticos (“ <i>Epiphytic</i> ”) de Colmos
	CRN	Raízes (“ <i>Roots</i> ”)	Endofíticos (“ <i>Endophytic</i> ”) de Raízes
	CRP		Epifíticos (“ <i>Epiphytic</i> ”) de Raízes
	CRZ	Solo (“ <i>Soil</i> ”)	Solo rizosférico (“ <i>Rizosphere</i> ”)

3.3. Cultura de comunidades microbianas

As amostras provenientes do processamento do material vegetal (Tabela 2) foram submetidos ao procedimento de recuperação de comunidades endofíticas e epifíticas provenientes dos tecidos da cana-de-açúcar, de acordo com a metodologia descrita por Armanhi et al. (2018). Inicialmente, foi realizada uma diluição dos extratos previamente preparados, em uma proporção de 1:10 (v/v) em uma solução de NaCl 0,85% (m/v) estéril, enquanto que para a amostra de solo rizosférico foi realizada uma diluição de 1:10 (m/v) a partir de 10 g do pool de solo rizosférico para um frasco contendo 90 mL de NaCl 0,85% agitado vigorosamente.

Após a diluição seriada, o material foi plaqueado em diferentes meios de cultura desenhados para este estudo, segundo o tipo de amostra, ambiente e nicho (Tabela 3). Os meios de cultura inoculados com as comunidades foram

incubados a uma temperatura de 30 °C por um período de 48 até 72 horas em condição aeróbica.

Tabela 3. Meios de cultura usados para cada tipo de tecido ou amostra processada a partir de cana-de-açúcar e condições de cultivo.

Amostra	Meio de cultura	Tipo de Comunidade e nicho	Número de placas por amostra	Condições de crescimento
Solo rizosférico	BRX-Raiz	Microrganismos rizosféricos	5	30 °C / aerobiose / 48-72 h
“Pellet” raiz liquidificada	BRX-Raiz	Endofíticos de raiz	5	
“Pellet” de lavagem de colmo	BRX-Colmo	Epifíticos de colmo	5	
“Pellet” de colmo liquidificado	BRX-Colmo	Endofíticos de colmo	5	
“Pellet” de lavagem de folha	BRX-Folha	Epifíticos de folha	5	
“Pellet” de folha liquidificada	BRX-Folha	Endofíticos de folha	5	

Para uma melhor recuperação de comunidades a partir das amostras plaqueadas, foi desenhado um meio de cultura tomando como base a fórmula dos meios R2A e “Bushnell Hass Broth” (Atlas, 2010) complementando com partes de plantas, tais como raiz, colmo e folhas, secos e triturados segundo as amostras provenientes dos tecidos da cana-de-açúcar (Medina et al., 2017; Sarhan et al., 2019). O meio, chamado de BRX, tem a seguinte composição-base por litro: 0,5 g de peptona, 0,5 g de extrato de levedura, 1,0 g de NH_4NO_3 , 1,0 g de KH_2PO_4 , 1,0 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,05 g de FeCl_3 , 0,02 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mL de extrato de solo (500 g de solo de cultura de cana-de-açúcar orgânica, 500 mL de água deionizada, 2,5 g de CaCO_3 , esterilizado em autoclave a 121 °C por 60 minutos, resfriado, decantado e filtrado) e xarope de cana-de-açúcar (Brix 60,56%, Pol 50,76% e Pureza 83,82%) como fonte de carbono, cedido pela usina Bonfim (Grupo Raízen, Guariba, Brasil). Para inibir os fungos filamentosos provenientes das amostras, as placas foram tratadas com 100 µL de cicloheximida 100 mM na superfície do ágar antes de plaquear. Diferentes versões do meio foram feitas segundo o tipo de amostra e etapa de uso no presente estudo, e apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Meios de cultura usados na prospecção de comunidades de bactérias associadas à cana-de-açúcar.

Componentes (g/L)	BRX-Raiz	BRX-Colmo	BRX-Folha	BRX- Caldo	BRX-Estoque	Concentração mM
Peptona	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
Extrato de levedura	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	-
KH ₂ PO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	7,35
K ₂ HPO ₄	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	5,74
NH ₄ NO ₃	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	12,49
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	1,66
FeCl ₃	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,3
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,18
Agar	15,0	15,0	15,0	-	-	-
Raiz de cana-de-açúcar *	10,0	-	-	-	-	-
Colmo de cana-de-açúcar *	-	10,0	-	-	-	-
Folha de cana-de-açúcar *	-	-	10,0	-	-	-
Extrato de solo	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	-
Xarope de cana-de-açúcar-de-açúcar	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	-
Glicerol	-	-	-	-	200 mL	-
Cicloheximida 100 mM**	100 µL		100 µL	-	-	-

pH final do meio: 7-7,2 *Material desidratado e moído com tamanho de partícula < 1 mm. **Aplicada na superfície da placa antes de inocular.

3.4. Isolamento de comunidades e condições de cultivo

O isolamento das comunidades se procedeu por meio da seleção de regiões de crescimento microbiano heterogêneo na superfície do ágar. Com o intuito de coletar colônias de diferentes morfotipos, a coleta das comunidades no meio de cultura foi realizada com auxílio de palito estéril, traçando riscos de aproximadamente 1 cm. Cada risco representa uma comunidade isolada, independentemente do número e morfologia das colônias dentro do risco e a

possível redundância de um mesmo morfotipo. Em seguida, foram inoculados em poços de placas “deepwell” (DW) contendo 1,1 mL de meio BRX-caldo desenhado para este trabalho.

As placas foram seladas e incubadas em um agitador orbital com incubadora (shaker) a 250 rpm com temperatura de 30 °C durante 48 horas. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas a $3.000 \times g$ por 15 min a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os “pellets” foram resuspendidos em 300 µL de meio de cultura BRX estéril suplementado com glicerol em uma concentração final de 20% (v/v) (BRX-Estoque) e alíquotas de 150 µL foram transferidas para placas de 96 poços de polipropileno estéreis (em duplicata) e armazenadas em ultracongelador à -80 °C.

3.5. Avaliação do potencial de gramas para prospecção em larga escala de comunidades e isolados bacterianos

Com a finalidade de constituir uma metodologia que permita a avaliação *in vitro* e *in planta*, foi desenhado um teste baseado nos resultados de Shehata et al. (2018), onde foi demonstrada a capacidade de promoção de crescimento em plantas modelo da família *Poaceae*, por parte de isolados provenientes de plantas da mesma família.

Baseado no anterior, neste trabalho foram selecionadas as gramíneas azevém anual (*Lolium multiflorum* cv. BRS Ponteio) e a grama bermuda (*Cynodon dactylon* cv. Tierra Verde) (BRSeeds, Araçatuba, Brasil), plantas que possuem metabolismo fotossintético tipo C3 e C4, respectivamente (Barbehenn et al., 2004). As duas espécies apresentam crescimento rápido, facilidade de manejo no laboratório e compatibilidade para testes de inoculação e avaliação de respostas fisiológicas de promoção de crescimento vegetal usando microrganismos isolados de cereais e outras gramíneas (Shehata et al., 2017).

Para definir o melhor protocolo de desinfecção, as sementes, foram submetidas a dois tratamentos, 1 e 2.

No tratamento 1, as sementes foram lavadas com água de torneira e detergente neutro para retirar restos de terra e outros detritos, colocadas em tubos Falcon estéreis e desinfetadas com hipoclorito de sódio comercial 2,0-2,5% adicionado de Tween 20 em uma concentração de 0,2%, durante dois tempos, 5 e 20 minutos com agitação constante. Posteriormente, foram enxaguadas pelo menos seis vezes com água Milli-Q estéril, e colocadas com espátula estéril na superfície de placas de Petri (90 × 10 mm) contendo agarose 0,7%, meio MS modificado (meio modificado de sais basais sem nitrogênio de Murashige and Skoog) (Murashige e Skoog, 1962) sem fonte de nitrogênio, vitaminas, glicina e fitohormônios, e, adicionado 1% de sacarose) e meio MS modificado, numa concentração de 0,5X adicionado de 0,5% de sacarose.

Adicionalmente, foram feitas placas controle de sementes sem tratamento desinfecção em cada um dos meios de cultura.

No tratamento 2, após lavar as sementes com água de torneira e detergente neutro, foram suspendidas em água Milli-Q estéril e colocadas em banho maria com temperatura de 50 °C durante 5 minutos, e desinfetadas com hipoclorito de sódio comercial 2-2,5% adicionado de Tween 20 0,2%, durante dois tempos, 5 e 20 minutos com agitação constante. Posteriormente foram enxaguadas, pelo menos, seis vezes com água Milli-Q estéril.

As sementes desinfetadas foram colocadas com espátula estéril na superfície de placas de Petri (90×10 mm) contendo três meios diferentes: a) agarose 0,7% b) meio MS modificado 1X adicionado de 1% de sacarose e c) meio MS modificado 0,5X adicionado de 0,5% de sacarose.

Adicionalmente, foram feitas placas controle de sementes sem desinfecção em cada um dos meios de cultura.

Nos dois tratamentos citados anteriormente, as placas contendo as sementes foram vedadas e colocadas em câmara de germinação em obscuridade a 25 °C durante um tempo de 7 dias, durante os quais foram feitas verificações periódicas e registro da contaminação e germinação das sementes.

Neste período, as placas foram trocadas de lugar dentro da câmara pelo menos uma vez por dia. Ao final dos 7 dias, foram contabilizadas as plântulas desenvolvidas (com folhas primárias - eófilos) em cada uma das placas para a avaliação do desenvolvimento pós-germinação. No final, foi feita uma avaliação de parâmetros de contaminação, germinação e desenvolvimento pós-

germinação das sementes, para o qual as amostras foram agrupadas de acordo com tratamento e foram comparadas entre si com o método de Kruskal-Wallis, e comparadas de forma pareada, utilizando um teste baseado em reamostragem, com 1000 repetições.

A análise estatística foi conduzida em R (R Development Core Team, 2018) considerando a taxa de germinação e a taxa de contaminação para os diferentes tratamentos. As amostras foram agrupadas de acordo com tratamento e foram comparadas entre si com o método de Kruskal-Wallis usando a função *kruskal.test* do pacote *stats* em R (R Development Core Team, 2018), e comparadas de forma pareada, utilizando um teste baseado em reamostragem, com 1000 repetições. Com isso, o tratamento capaz de promover alta taxa de germinação e baixa taxa de contaminação com a finalidade de selecionar a planta para testes posteriores, o melhor tratamento de desinfecção e o meio de cultura mais adequado para os testes posteriores.

3.6. Seleção de comunidade com perfil para promoção de crescimento em plantas

Neste ensaio foram usadas sementes de *C. dactylon* cv. Tierra Verde (BRSeeds, Araçatuba, SP, Brasil), que foram primeiro colocadas em tubo Falcon de 50 mL e lavadas com água de torneira e detergente neutro, agitadas vigorosamente para retirar restos de terra. Posteriormente, foram desinfetadas por 20 minutos com hipoclorito de sódio comercial 2-2,5% adicionado de Tween 20 0,2% e enxaguadas com água deionizada estéril.

Para crescimento dos inóculos, as comunidades foram inoculadas em placa DW contendo 1,1 mL de BRX-caldo. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas com agitação de 250 rpm em shaker. Após o período de incubação as placas foram centrifugadas a $4.000 \times g$ por 15 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e os “pellets” foram resuspendidos com solução de NaCl 0,85% (m/v).

Foram usadas placas de Petri (50 × 10 mm) contendo meio modificado de sais basais sem nitrogênio de Murashige e Skoog (MS) 1X (Murashige e Skoog, 1962), com adição de 0,5% de sacarose e 0,7% de agarose como agente gelificante (Moore e Botha, 2013). Uma pequena quantidade de sementes desinfectadas foi colocada na superfície de meio sendo adicionados 100 µL de inóculo, as quais foram cuidadosamente espalhadas na superfície do meio de cultura. As placas foram vedadas e incubadas em câmara de germinação com fotoperíodo de 12 horas com temperatura de 27 °C e umidade relativa de 50%. Cada placa com sementes inoculadas representa uma comunidade avaliada.

Como controle negativo, foram usadas placas contendo sementes desinfectadas adicionando um volume de 100 µL de solução de NaCl 0,85% (m/v) e como controle positivo foi utilizado a bactéria *Azospirillum brasilense* BR11001.

A avaliação da promoção de crescimento foi feita a partir dos 8 dias de crescimento, comparando no controle negativo a cor das folhas e a presença de raízes. Foram avaliados: presença, comprimento, número de radículas e pelos radiculares. Para facilitar a seleção das comunidades, foi dado um valor a cada parâmetro (presença=1 ou ausência=0).

Para o parâmetro de porcentagem de germinação foram contadas as sementes de *C. dactylon* colocadas em cada placa e o número de plantas germinadas. Sendo cada placa dividida em quadrantes para facilitar a contagem. As comunidades avaliadas com os maiores valores de cada parâmetro foram agrupadas e analisadas estatisticamente. Foram descartadas as placas com plantas que possuíam folhas pálidas, amareladas ou albinas, pouca ou nenhuma germinação, contaminação com fungos filamentosos, assim como ausência de raízes.

Com o objetivo de reduzir o escopo, foram selecionadas para as fases seguintes as comunidades putativamente benéficas. Dessa forma, foram elegidas as que apresentaram melhores médias nominais de germinação, estabelecido pela seleção daquelas situadas no quartil superior do conjunto. Foram obtidos parâmetros estatísticos descritivos, análise de variância (ANOVA)(R Development Core Team, 2018) e comparação de médias por teste de Dunnett (Konietschke et al., 2015) das sementes que receberam o inóculo em

contraste ao controle negativo (sementes de *C. dactylon* não inoculadas). Este grupo de comunidades microbianas foi utilizado em testes posteriores.

3.7. Avaliação do potencial de produção de ácido 3-indol acético (AIA) e solubilização de fosfatos

A partir do processo da avaliação da promoção de crescimento usando *C. dactylon*, 38 comunidades bacterianas selecionadas passaram por uma etapa de avaliação de produção de ácido 3-indol acético (AIA)(Bulgarelli et al., 2013) e solubilização de fosfato com a finalidade de obter um grupo baseado nos maiores valores de produção de AIA e índice de solubilização de fosfato (Kumar Meena et al., 2015).

Para o teste de produção de AIA, foi inoculado um volume de 10 µL dos estoques das comunidades em 1,1 mL de meio LB suplementado com 1 mg/mL de L-Triptofano (Ambrosini e Passaglia, 2017) e colocado em agitador a 250 rpm, 30 °C, durante 48 horas. Posteriormente, foram centrifugados a 4.000 × g/15 min e uma alíquota de 500 µL do sobrenadante foi separada e misturado com 1 mL de reagente de Salkowski (10 mL de FeCl₃ 0,5 M, 500 mL de ácido perclórico 70%, completar até 1 L com água destilada). As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por um período de 30 minutos e, posteriormente, a concentração de AIA foi determinada a 530 nm em espectrofotômetro Multiskan™ GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, United States) e, comparadas com uma curva padrão de AIA (10 - 100 µg/ml).

A capacidade de solubilizar fosfatos foi testada inoculando as comunidades com replicador em uma placa de Petri contendo meio para solubilização de fosfatos (10 g de glicose, 0,05 g de extrato de levedura, 15 g de ágar, foram esterilizados separadamente 50 mL de CaCl₂ 10%, e 25 mL de K₂HPO₄ 10%, resfriados até 50 °C e misturados na hora de verter em placas de Petri de 150 x 15 mm). As placas inoculadas foram incubadas por um período total de 72 horas a uma temperatura de 30 °C. A cada 24 horas foi fotografada, selecionando o tempo de 48 horas para obter medidas de área de halos e

colônias (Kumar Meena et al., 2015). As imagens foram analisadas com o software Fiji (Schindelin et al., 2012) e o índice de solubilização de fosfato (SI) (Pande et al., 2017), calculado usando a equação 1:

$$SI = \frac{\text{Área da Colonia} + \text{Área do Halo}}{\text{Área da Colonia}} \quad (1)$$

A partir destes resultados foi selecionado um grupo de comunidades com as maiores atividades de produção de AIA e solubilização de fosfato, e também aquelas que apresentassem as duas atividades.

3.8. Avaliação da promoção de crescimento em casa de vegetação

As comunidades bacterianas selecionadas com base nos testes de produção de AIA e solubilização de fosfato foram submetidas a uma avaliação do perfil funcional para promoção de crescimento *in planta* em casa de vegetação.

Foram usadas sementes escarificadas de *Brachiaria ruziziensis* cv. Ruzizienses (Matsuda Seeds, Álvares Machado, SP, Brasil) que foram lavadas com água de torneira e detergente neutro, e desinfetadas por 20 minutos com hipoclorito de sódio comercial 2-2,5% seguido de lavagens com água estéril. Foram utilizados vasos de 0,415 L (Nutriplan N11) preenchidos com uma mistura 1:1 de vermiculita e areia lavada que foi adubada inicialmente com 100 ml de solução nutritiva de Hoagland 0,5X sem nitrogênio, contendo por litro de solução: 1,25 mM K₂SO₄, 1 mM MgSO₄, 0,25 mM Ca(H₂PO₄)₂, 1 mM CaSO₄, 23,13 mM H₃BO₃, 4,57 mM MnCl₂ 4H₂O, 0,38 mM ZnSO₄ 7H₂O, 0,16 mM CuSO₄ 5H₂O, 0,25 mM NaMoO₄ 2H₂O, e 0,3 mL de Fe-EDDHA 15% (Hoagland e Arnon, 1950).

Para cada vaso, foram adicionadas 10 sementes previamente esterilizadas, que foram inoculadas com 5 mL de suspensão padronizada das comunidades bacterianas com uma D.O.₆₀₀ de 0,5. Para cada comunidade foram usadas 6 réplicas. O controle consistiu em sementes tratadas com água destilada estéril. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação sob condições ambientais

(entre os meses de outubro e novembro de 2019) e, após 5 dias foi realizada uma reinoculação. As plantas foram aguadas duas vezes por semana, e a cada 7 dias foi adicionado 50 mL solução nutritiva de Hoagland 0,5X sem nitrogênio em cada vaso.

Após o período de 30 dias, as plantas foram retiradas dos vasos e avaliadas quanto a massa fresca e massa seca das raízes e da parte aérea (Singh e Jha, 2016; Sarkar et al., 2018).

A avaliação estatística dos caracteres agrônômicos de massa fresca e seca das raízes e partes aéreas de *B. ruziziensis* inoculadas com as comunidades, revelou distribuição não-normal e não-homocedástica dos dados (indica que a distribuição das observações possuíram variações diferentes). Portanto, se fez adequado a utilização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para análise de variância. As médias das plantas tratadas foram comparadas com as plantas do grupo controle, segundo o teste “post-hoc” de Dunnett adaptado para conjuntos que seguem tal distribuição (Konietschke et al., 2015). Todos os procedimentos estatísticos foram realizados no software R (R Development Core Team, 2018).

3.9. Caracterização de traços funcionais de promoção de crescimento vegetal

As características bioquímicas e fisiológicas do grupo de comunidades avaliadas em casa de vegetação foram feitas usando diversos testes com a finalidade de obter um perfil de traços de promoção de crescimento vegetal presentes nas comunidades avaliadas previamente em *B. ruziziensis*.

3.9.1. Produção de sideróforos

A produção de sideróforos nas comunidades foi quantificada pela técnica de “CAS-Shuttle Assay”, de acordo com a metodologia descrita por Payne (1994). Estoques das comunidades selecionadas foram ativados por 12 horas em 5 mL de caldo MM9 (“M9 Medium Broth”, AMRESCO; Solon, OH, USA), que foram posteriormente peletados e lavados com meio estéril e resuspendidos no mesmo meio para preparar inóculos com D.O.₆₀₀ 1,0. Uma alíquota de 10 µL foi inoculada em um volume final de 1 mL em placa DW que foi colocada em agitação a 250 rpm a 30 °C por 24 horas. Posteriormente, os inóculos foram peletados e o sobrenadante usado para quantificação de sideróforos em espectrofotômetro a 630 nm.

Alternativamente, foi preparada uma versão modificada do meio BRX sem ferro, contendo as mesmas concentrações de peptona, extrato de levedura e xarope de cana-de-açúcar, que foram tratados previamente com solução de 8-hydroxiquinolina 3% em clorofórmio para retirar traços de Fe, e a quantificação dos sideróforos prosseguiu da mesma forma.

3.9.2. Quantificação da atividade de ACC desaminase

A capacidade de metabolizar o ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano (ACC) mediante a enzima ACC-desaminase, com a correspondente liberação de ácido alfa-cetobutírico, foi testada nas comunidades segundo a metodologia descrita por Penrose e Glick (2003).

Estoques das comunidades foram previamente ativados em 20 mL de meio BRX e colocados no shaker a 120 rpm, 30 °C por um período de tempo de 24 horas. Após este tempo, as células foram centrifugadas a $4.000 \times g$ por 30 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, as células foram lavadas com meio estéril de sais DF, segundo a fórmula de Dworkin e Foster (1958) (contendo todos os componentes, exceto ácido gluconico), e resuspendidas em 7,5 mL de meio DF contendo ACC 3 mM com a finalidade de

induzir a produção da enzima. Os inóculos foram colocados em agitação a 120 rpm, 30 °C por 24 horas e depois, centrifugados e lavados duas vezes com tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,6 e resuspendidas em 600 µL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 8,5.

Para a obtenção de extratos celulares, 30 µL de tolueno foi misturado com a suspensão celular e agitado em vórtex a máxima velocidade por 30 segundos. Um volume de 100 µL foi separado para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976) e comparado com uma curva padrão de albumina sérica bovina. A quantificação da enzima foi realizada em duplicata. 20 µL de uma solução de ACC 0,5 M foi adicionado a um volume de 200 µL das células tratadas com tolueno, misturado com a ajuda de vórtex e incubado em banho-maria a 30 °C por 15 minutos. Após, 1 mL de HCl 0,56 M foi adicionado e misturado com ajuda de vórtex. A suspensão foi centrifugada a $16.000 \times g$ por 5 minutos, e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um tubo de vidro e misturado com 800 µL de HCl 0,56 M, agitado em vórtex e, finalmente, foram adicionados 200 µL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (2,4-dinitrofenil-hidrazina 0,2% em HCl 2 M).

A mistura de reação foi incubada em banho maria a 30 °C por 30 minutos e a reação foi finalizada com a adição de 2 mL de NaOH 2 N. A absorbância das amostras foi medida em espectrofotômetro a 540 nm (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, USA) e comparadas com uma curva padrão de ácido alfa-cetobutírico (0,05-1 µmol).

3.9.3. Produção de biofilme

A capacidade de produção de biofilme foi avaliada nas comunidades selecionadas seguindo a metodologia descrita por O'Toole (2011), usando dois meios de cultura: TSB (Difco) suplementado com 1% de glicose, e caldo BRX-base, que possui 1% de xarope de cana-de-açúcar.

Inóculos das comunidades foram ativadas por um período de 24 horas e agitados em 120 rpm a 30 °C em meio BRX até atingir uma D.O.₆₀₀ maior do que 1,0. Após, os inóculos das comunidades foram centrifugados e lavados com

tampão PBS 1X com a finalidade de retirar restos do meio e resuspendidos no mesmo tampão até obter uma D.O.₆₀₀ de 1,0. Os meios de cultura foram inoculados à razão de 1:100 (inóculo:meio) e alíquotas de 100 µL de cada meio foram colocadas em poços de placa de 96 poços de fundo chato (Corning, USA), fazendo oito réplicas de cada tratamento para cada comunidade testada, assim como um controle negativo de meio sem inocular. As placas contendo as comunidades foram incubadas em condições estáticas a 30 °C por um período de 48 horas.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com água destilada, e em cada poço foi depositado um volume de 125 µL de solução de cristal violeta 0,1%, incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Após, foram lavadas quatro vezes com água destilada e secas “overnight” em temperatura ambiente. Depois da secagem foram colocados, em cada poço, 125 µL de ácido acético 30% e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. O mesmo volume foi transferido para uma placa nova e a absorbância de cada tratamento, controle negativo e branco de ácido acético 30%, foram quantificados a 550 nm em espectrofotômetro (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, USA).

Os resultados obtidos para cada tratamento, em ambos os meios de cultura, tiveram suas médias comparadas com a média do respectivo tratamento controle. Para a comparação da distribuição dos diferentes tratamentos, utilizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, no qual verificou-se a rejeição da hipótese de igualdade das distribuições dos tratamentos (p-valor < 0,05). Para identificar quais tratamentos diferiram do grupo controle, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Ambos os testes foram implementados através da função “stat_compare_means” do pacote “ggpubr” (Kassambara, 2020), presente no software estatístico R (R Development Core Team, 2018).

3.9.4. Solubilização de Zinco

A capacidade de solubilização de Zinco foi testada no meio mínimo de sais e Tris (Mumtaz et al., 2017), contendo 0,1% de óxido de zinco (ZnO) como fonte insolúvel. As placas contendo o meio foram inoculadas em três lugares da superfície do ágar com alíquotas de 5 µL de inóculo com D.O.₆₀₀ 1,0 para cada uma das 17 comunidades, e incubadas a 30 °C por sete dias. A medição de colônias e halos de solubilização foi realizada usando o software Fiji (Schindelin et al., 2012) e calculado da mesma forma que os testes de solubilização de fosfato.

3.9.5. Produção de HCN e quitinase

A produção de cianeto de hidrogênio (HCN) foi testada inoculando as comunidades no meio TSA suplementado com Glicina 4,4 g/L (El-Sayed et al., 2014) e colocando-se na tampa da placa de Petri papel filtro Whatman No 1 impregnado com solução indicadora de ácido pícrico (0,5% ácido pícrico em Na₂CO₃ 2%). As placas foram vedadas e incubadas a 30 °C por 10 dias e revisadas a cada 24 horas.

Testes qualitativos de quitinase foram feitos em ágar com quitina coloidal (Atlas, 2010), contendo 10 g/L de quitina coloidal preparada segundo a metodologia descrita por Ramirez (Gómez Ramírez et al., 2004) com a única modificação na etapa de filtragem, a qual foi substituída por centrifugação de todo o volume de quitina dissolvida em HCl e água. As placas foram inoculadas em três lugares da superfície do ágar com 5 µL de inóculo padronizado à D.O.₆₀₀ 1,0 incubadas a 30 °C por 7 dias, fotografadas e as imagens foram processadas da mesma forma que os testes de fosfato e zinco para obter um índice de degradação de quitina.

3.9.6. Tolerância á NaCl e glicerol.

Testes de tolerância a diferentes concentrações de NaCl (m/v) e em glicerol foram feitos inoculando-se as comunidades em placas DW contendo 1,1 mL de meio LB com as diferentes concentrações de NaCl (0,5, 2,5, 5,5, 7,5 e 10,5%), e para glicerol 25% (m/v) foi usado o meio BRX trocando o xarope por glicerol. Posteriormente, as placas foram colocadas em agitador a 250 rpm a 30 °C e o crescimento foi medido pela absorbância a 595 nm.

Após 48 horas de crescimento, as placas de cada tratamento foram quantificadas usando um leitor de placas (iMark™ Microplate Absorbance Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). Foram incluídos controles negativos de cada meio sem inocular para calcular a absorbância final em cada tratamento.

3.9.7. Proteases, lipases e esterases

Para o teste de proteólise foi usado ágar com leite desnatado (Szilagyi-Zecchin et al., 2014). Os testes foram considerados positivos quando os inóculos apresentaram halos claros ao redor das colônias.

Testes de esterase e lipase foram feitos em meios contendo 1% de Tween 20 e Tween 80 como substratos destas enzimas, respectivamente. As placas foram inoculadas e incubadas a 30 °C por um período de 3 dias para teste de proteases e 10 dias para os testes de lipases e esterases. A formação de um precipitado de cor branca embaixo das colônias foi considerado positivo (Ramnath et al., 2017).

3.9.8. Atividade celulase e amilase

Foram feitos testes de metabolismo de polissacarídeos: avicel (celulose microcristalina), celulose (carboximetilcelulose sódica) e amido em ágar contendo os substratos (Liang et al., 2014; Szilagyi-Zecchin et al., 2014). Para

evidenciar atividade de celulasas, as placas foram tratadas com 10 mL de solução de vermelho congo 1 mg/mL por um tempo de 15 minutos e, posteriormente, lavadas com solução de NaCl 1M por 15 minutos. A presença de halo ao redor das colônias foi considerada positivo.

Para o teste de amido, as placas foram tratadas com vapor de iodo em capela por um tempo de 10 minutos, onde a presença de um halo claro ao redor da colônia foi considerada como atividade de amilase positiva.

3.10. Amplificação do gene da dinitrogenase redutase *nifH*

Para as comunidades selecionadas foi realizada uma triagem para a potencial capacidade de fixação de nitrogênio pela presença de genes relacionados a esta função usando o gene marcador *nifH*, que tem sido usado em diversos trabalhos para identificação da capacidade diazotrófica de bactérias associadas a plantas (Castro-González et al., 2011; Knief et al., 2012; Angel et al., 2018).

O DNA genômico de 17 comunidades selecionadas foi extraído usando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, USA). Para isso, os inóculos foram previamente crescidos em BRX-caldo durante 48 horas em agitação constante e, após o período de crescimento, foram centrifugados, lavados, resuspendidos em solução de EDTA 50 mM, e posteriormente processados segundo as instruções do fabricante com mínimas modificações. Parâmetros de concentração e qualidade do DNA extraído foram medidos por espectrofotometria (NanoDrop spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). Os primers usados foram o IGK3 e DVV descritos por GABY e BUCKLEY (2012), os quais tem o melhor desempenho na amplificação do gene *nifH* entre outros primers usados (Angel et al., 2018).

A mistura de reação da PCR consistiu em 4 µL de Firepol Master Mix 5x (Solis BioDyne, Tartu, Estônia), 0,5 µL do primer DVV (10 µM), 0,5 µL do primer IGK3 (10 µM), 2 µL de DNA diluído (50 ng/µL) e 13 µL de H₂O ultrapura para PCR. Para a amplificação dos fragmentos foi usado o mesmo programa de PCR

e a visualização das bandas dos fragmentos amplificados foi realizada em géis de agarose 1,5%.

3.11. Classificação (“Ranking”) das comunidades

As comunidades foram classificadas de acordo com o desempenho nos experimentos de inoculação com *B. ruzizensis* (massa fresca e seca) e nos testes de traços funcionais de promoção de crescimento vegetal e fisiológicos, com a finalidade de obter um índice total. Os resultados dos valores individuais dos testes *in planta* foram ordenados, atribuindo-se valores de 10 (maior desempenho) à -6 (menor desempenho) para as 17 comunidades avaliadas.

Com a finalidade de obter um único valor a partir dos testes bioquímicos No caso dos traços funcionais de promoção de crescimento vegetal e alguns testes fisiológicos, foi obtido um único valor para cada comunidade e somado ao índice total. Para o anterior foram considerados os seguintes: , produção de AIA, índice de solubilização de fosfato e zinco, produção de sideróforos em MM9, atividade de Acc-desaminase, índice de quitinase e produção de biofilme em meio TSB. Os valores obtidos da quantificação desses traços funcionais foram normalizados usando o “standard score” (Z-Score) para cada resultado.

No caso dos testes fisiológicos, foram considerados os resultados de tolerância à NaCl e os resultados do teste de amplificação do gene *nifH*, os quais tiveram valores atribuídos conforme descrito na Tabela 5.

Tabela 5. Valores dados ao teste de tolerância ao NaCl e amplificação do gene *nifH*.

Crescimento ou presença /ausência*	Valores atribuídos a cada resultado					<i>nifH</i>
	NaCl 0,5%	NaCl 2,5%	NaCl 5,5%	NaCl 7,5%	NaCl 10,5%	
++	0,2	0,4	0,6	0,8	1	NA
+	0,1	0,3	0,5	0,7	0,9	1
-	0	0	0	0	0	0

*D.O. 595 nm $\geq 1,0$ = ++; 0,1 - 1,0 = +; $\leq 0,1$ = -.

Por fim, os valores obtidos em cada teste foram somados a fim de obter a pontuação final para, a partir do índice criado, estabelecer uma classificação das comunidades mais promissoras para a promoção de crescimento e utilização em estudos posteriores.

3.12. Perfil de metabolismo de fontes de carbono para comunidades

A partir dos resultados de avaliação conjunta do ponto anterior, foram selecionadas as 5 comunidades com o melhor desempenho, ou seja, com a maior pontuação no ranking, para avaliar o perfil de metabolismo de carboidratos com o sistema de microtestes API 50 CH (bioMérieux, France). O teste contém 50 substratos diferentes do tipo monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, divididos em cinco galerias e bandas contendo 10 tubos ou poços, os quais são inoculados com uma suspensão bacteriana padronizada (Boyd et al., 2005).

Os inóculos das comunidades foram ativados em BRX-caldo por 24 horas. Após este período, foram centrifugados a $4.000 \times g$ por 10 minutos e lavados com tampão PBS 1X estéril. Os inóculos foram posteriormente resuspendidos no meio API 50 CHB estéril, de acordo com as instruções do fabricante. As galerias foram inoculadas e colocadas em incubadora a 30 °C, e as leituras de cambio de cor do indicador de pH (resultado positivo), foram realizadas em

tempos de 24 e 48 horas após a inoculação para descartar falsos positivos e falsos negativos.

3.13. Sequenciamento de comunidades em plataforma Illumina e análises bioinformáticas

O DNA das 17 comunidades foi extraído usando Wizard genomic DNA purification kit (Promega, USA), segundo as indicações do fabricante. O DNA obtido das comunidades foi resuspenso em água ultrapura estéril e enviado ao Laboratório Multiusuário para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica - LMSeq, da UNESP/FCAV, para sequenciamento na plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, USA).

Para a construção das bibliotecas, as regiões hipervariáveis V3–V4 do gene 16S rRNA foram amplificadas usando os primers 319F e 806R, os quais geram fragmentos de aproximadamente 469 pb (Fadrosh et al., 2014). Os fragmentos foram purificados usando AMPure XP beads (Beckman Coulter, Brea, USA) e sequenciados usando o kit MiSeq Reagent Kit v.2 (500 cycles).

Os conjuntos de dados foram avaliados quanto à qualidade utilizando FastQC (Andrews, 2010) e *fastx_info* do conjunto de ferramentas do pacote USEARCH (v11.0.667) (Edgar, 2013). Os primers foram removidos das sequências utilizando a ferramenta *search_pcr2* do USEARCH (v11.0.667) (Edgar, 2013). As sequências de leituras “forward” e reverse foram fundidas em uma única sequência contínua utilizando a ferramenta PEAR (Zhang et al., 2014). Já os parâmetros de distribuição do tamanho das sequências e o erro esperado das leituras por biblioteca foram obtidos por meio da ferramenta *fastq_eestats2*, pertencente ao pacote de ferramentas do USEARCH (Edgar, 2013).

Para análise do microbioma das comunidades, foi utilizado o pipeline “Devisive Amplicon Denoising Algorithm” - DADA2 v1.14.1 (Callahan et al., 2016) (disponível em <https://github.com/benjjneb/dada2>) a fim de inferir e quantificar

ASVs (“Amplicon Sequence Variants”) no R (v3.6.3) (R Development Core Team, 2018).

O conjunto de leituras fundidas foi truncado na posição 400 pb usando a função *filterAndTrim* com parâmetros padrão ($\text{maxN} = 0$, $\text{truncQ} = 2$ e $\text{maxEE} = 3$); leituras inferiores à do parâmetro de truncagem foram descartadas. A taxa de erro por amostra foi estimada baseada no modelo de erro realizado pela função *learnErrors*. Em seguida, as leituras foram dereplicadas e sequências quiméricas foram removidas.

A atribuição taxonômica dos ASVs foi realizada pelo classificador Naive Bayesian (Wang et al., 2007) (implementado no DADA2) e usado o conjunto de treinamento 16 do banco de dados RDP aplicando $\text{minboot} = 80$. Os valores de abundância foram normalizados usando o pacote DESeq2 (v1.26.0) (Love et al., 2014). Para manipulação geral dos dados e análises estatísticas, foram utilizados os pacotes Phyloseq (v1.30.0) (McMurdie e Holmes, 2013) e Vegan (v2.5.6) (Oksanen et al., 2019) no R.

As estatísticas para os índices de alfa-diversidade foram realizadas utilizando o pacote ggpubr (v0.2.5) através da função *stats_compare_means* aplicando teste de Kruskal-Wallis. Já para o índice de beta-diversidade, as estatísticas foram realizadas utilizando o método PCoA de distância de Bray-Curtis, que permite a análise de permutação multivariada (PERMANOVA) através da função *adonis*, implementado no pacote de análises do Vegan (v2.5.6) (Oksanen et al., 2019).

A análise de redes foi obtida a partir da função *plot_net* do pacote Phyloseq (McMurdie e Holmes, 2013), configurando distância máxima de 0.8 e aplicando o método de distância de jaccard para gênero.

A predição de vias metabólicas foi feita com o PICRUSt (Langille et al., 2013) e a avaliação de enriquecimento destas vias foram realizadas com LEfSe (Segata et al., 2011) usando o banco de dados de vias metabólicas METACYC (Caspi et al., 2014). A análise de prevalência de gêneros foi realizada através da função *core_microbiome* do pacote Microbiome (Leo e Shetty, 2017).

O teste exato de Fisher (Calhoun, 2015), foi utilizado a fim de avaliar se há um enriquecimento de algum descritor das comunidades, entre aquelas que foram selecionadas, com o método de prospecção em relação ao total de comunidades investigadas. Os descritores a seguir foram considerados de modo

isolado ou em conjunto: Ambiente (solo, raiz, colmo ou folha), Nicho (endofítico, epifítico ou rizosférico) e Manejo (orgânico ou convencional).

Por fim, os ASVs com atribuição taxonômica até o nível de espécie que foram identificadas em cada uma das comunidades, foram comparadas com o microbioma fundamental ou “core microbiome” da cana-de-açúcar, previamente reportado por de Souza et al. (2016) e com o conjunto de espécies associadas às plantas descrito no estudo de Levy (2018).

4. RESULTADOS

4.1. Prospecção de comunidades bacterianas a partir de rizosfera e tecidos da cana-de-açúcar

A partir do crescimento das diluições do lavado superficial e tecidos homogeneizados da planta nas diferentes versões do meio BRX, foi possível recuperar 944 comunidades de bactérias, constituindo um banco de comunidades bacterianas associadas à cana-de-açúcar. Esses resultados mostram a capacidade do meio BRX no crescimento tanto de bactérias epifíticas como de endofíticas, que compõem o microbioma cultivável da cana-de-açúcar. Possivelmente, as poucas quantidades e variadas fontes de nitrogênio, xarope de cana-de-açúcar (como fonte de carbono) e extrato de solo (como fonte de micronutrientes e outras substâncias orgânicas) (Ghani et al., 2003), conseguem suportar o desenvolvimento de diferentes morfotipos de bactérias, concordando com os resultados de Medina (2017). O tratamento das placas de Petri com 100 µL de cicloheximida 100 mM antes da inoculação resultou na inibição de quase a totalidade dos fungos.

A distribuição de comunidades obtidas a partir dos diferentes tecidos estão dispostos na Tabela 6. As amostras indicam um maior número de comunidades

recuperadas: epifíticos de folha em cultivo orgânico (OLP) e endofíticos de raiz em cultivo convencional (CRN) com 94 e 92 comunidades, respectivamente. Esses nichos apresentaram uma maior diversidade de morfotipos e um crescimento heterogêneo na placa. Por outro lado, as amostras de epifíticos de colmo em cultivo orgânico (OSP) e epifíticos de folha em cultivo convencional (CLP) geraram o menor número de comunidades, 62 e 64, respectivamente.

As plantas processadas, procedentes de manejos agrícolas diferentes, geraram um número relativamente parecido de comunidades: 476 a partir de tecidos de cana-de-açúcar orgânica e 468 a partir de cana-de-açúcar sob manejo convencional.

Tabela 6. Comparativa do número de comunidades obtidas a partir de diferentes tecidos da cana-de-açúcar sob manejo orgânico e convencional. Cada ambiente apresenta dois nichos: epifítico e endofítico.

Ambiente	Nicho	Manejo	
		Orgânico	Convencional
Folha	Epifíticos	94	64
	Endofítico	84	80
Colmo	Epifítico	62	68
	Endofítico	68	88
Raiz	Endofíticos	84	92
Solo	Rizosférico	84	76
		476	468
		Total: 944	

4.2. Seleção de gramínea como modelo para prospecção da promoção de crescimento in planta

A partir das análises estatísticas feitas (Figura 2) foi possível identificar que a espécie *L. multiflorum* apresentou uma taxa de germinação maior (p -valor < 0,05) entre todas as condições testadas em comparação com *C. dactylon*. No entanto, *C. dactylon* expressou uma taxa de germinação superior a *L. multiflorum*.

na condição de choque térmico com 5 minutos de desinfecção em meio agarose-água.

Em relação à contaminação, *C. dactylon* apresentou a menor taxa no experimento com choque térmico em todas as condições de tempos de desinfecção e meios de cultura, quando comparada com *L. multiflorum*, sendo a mais eficiente na condição de 20 minutos de desinfecção em meio MS com 1% de sacarose.

Os autores SHEHATA et al. (2018) testaram várias espécies de pastos, entre elas *L. multiflorum* e *C. dactylon* e em diferentes condições, a saber: meio de cultura, tempo de desinfecção e germinação. Os resultados do estudo apresentaram que, entre as espécies testadas, a *L. multiflorum* obteve o melhor resultado em relação às condições propostas, enquanto que a *C. dactylon* apresentou pouca eficiência nos testes de germinação em todas as condições. Porém, os testes realizados neste presente estudo indicaram uma relação inversa à observada por esses autores, apresentando também uma taxa muito inferior de contaminantes endofíticos, mostrando que esta espécie é ideal para testar as comunidades microbianas isoladas dos tecidos de cana-de-açúcar e solo rizosférico. O tempo de desinfecção de 20 minutos em hipoclorito de sódio 2-2,5% foi suficiente para promover um declínio na contaminação considerando *C. dactylon*. O choque térmico prévio por 5 minutos a 50 °C para *C. dactylon* não foi utilizado, evitando assim, uma etapa adicional no processo. Tanto o meio agarose-água, quanto o meio MS com 0,5% de sacarose tiveram baixíssima taxa de contaminação. Por isso, optou-se por utilizar o meio MS 1X com 0,5% de sacarose para tornar o ambiente menos estressante para as comunidades microbianas. Além disso, o protocolo de desinfecção não afetou negativamente o desenvolvimento pós-germinação, e se mostrou eficiente em evitar a contaminação.

4.3. Comunidades endofíticas e epifíticas de cana-de-açúcar promovem o crescimento em *Cynodon dactylon*

O protocolo desenvolvido para prospecção da promoção de crescimento *in planta* usando a *C. dactylon* permitiu a avaliação de 944 comunidades de bactérias endofíticas e epifíticas dos diferentes tecidos da cana-de-açúcar em condições orgânica e convencional. Este processo apresentou como resultado um primeiro grupo com 148 comunidades. Estas comunidades apresentaram traços de promoção de crescimento a partir da observação de cor, desenvolvimento foliar e radicular (Figura 3). A partir das análises estatísticas e seleção das melhores comunidades usando o parâmetro de germinação, que se encontram localizadas no quartil superior do grupo, foram selecionadas 38 comunidades (Figura 4), as quais apresentaram porcentagem de germinação 21,83% que foi acima do controle 49,79%, com uma média de 60,66% (Material Suplementar).

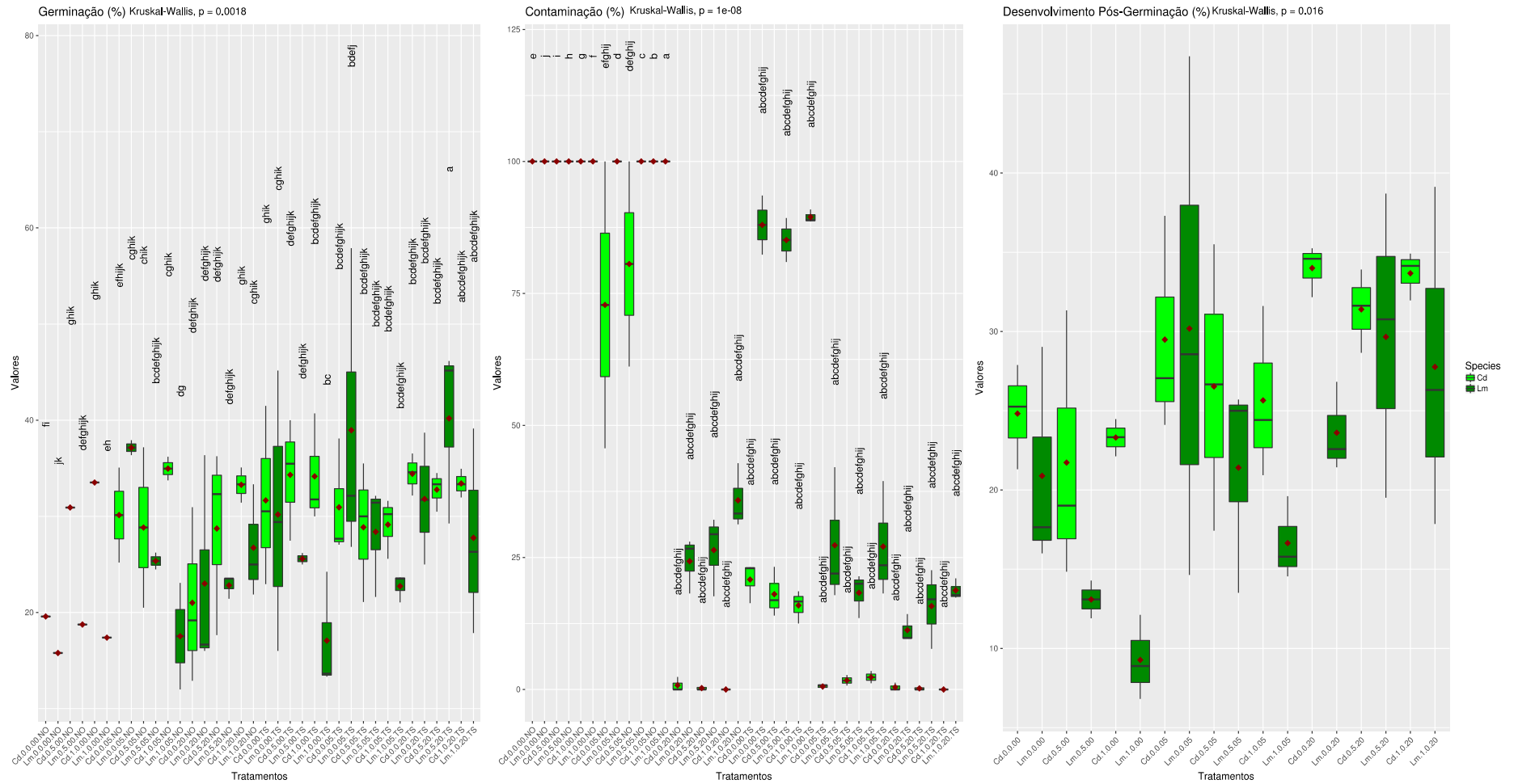


Figura 2. Comparações estatísticas dos parâmetros de germinação (porcentagem), contaminação (porcentagem) e desenvolvimento (porcentagem), entre *Cynodon dactylon* (Cd) e *Lolium multiflorum* (Lm). Foi utilizando o teste de Kruskal-Wallis e comparações pareadas entre os grupos utilizando teste baseado em reamostragem (1.000 réplicas). Nível descritivo de significância (p -valor $\leq 0,05$). Letras semelhantes representam que não há significância na comparação.

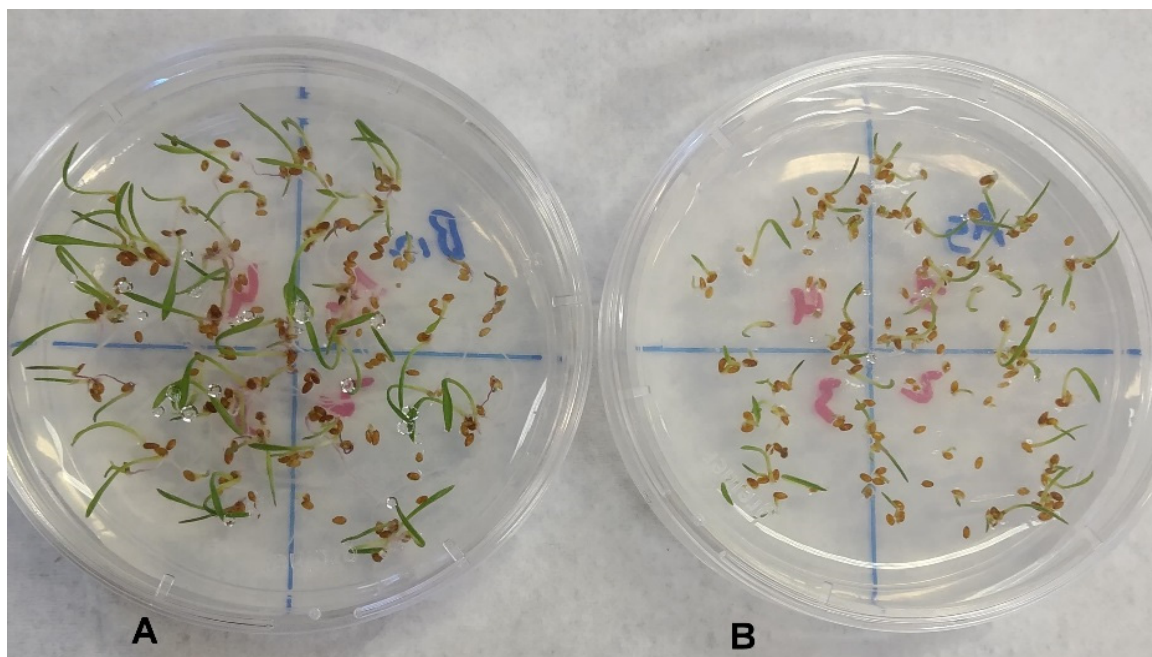


Figura 3. Placas de Petri contendo sementes inoculadas de *C. dactylon* em meio basal de sais MS 1X, após 10 dias de crescimento, mostrando diferentes respostas: **A** - Resposta positiva com aumento da germinação de sementes e plantas com início de desenvolvimento, **B** - Resposta à inoculação com baixa germinação e desenvolvimento.

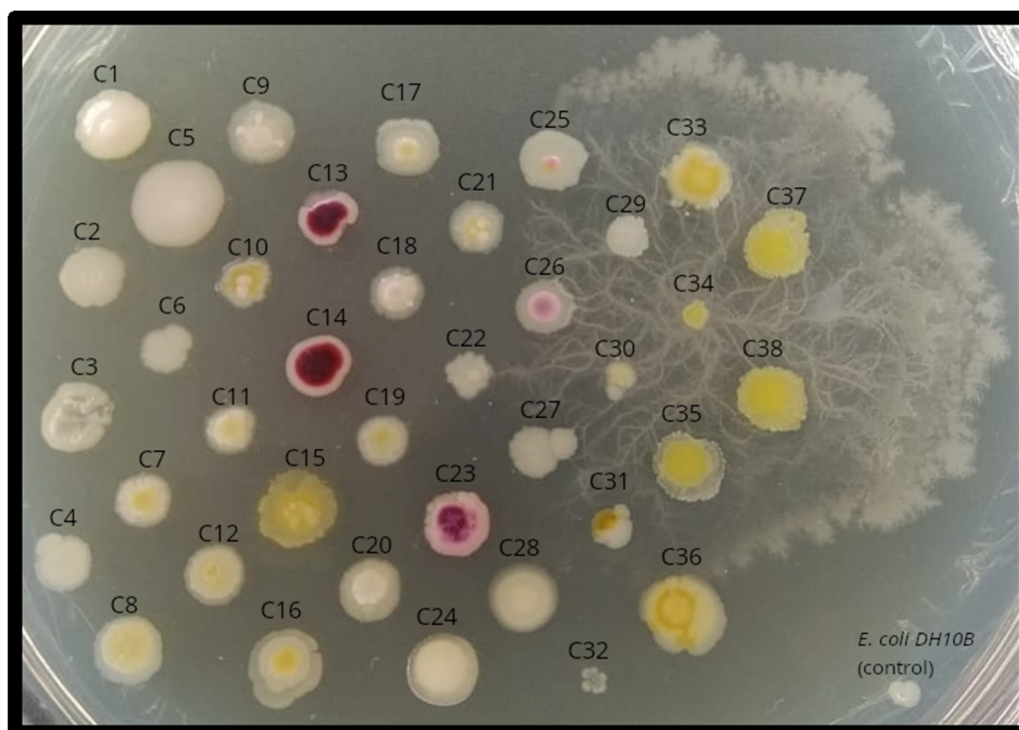


Figura 4. Imagem com as 38 comunidades selecionadas, crescendo em ágar nutriente e incubadas a 30 °C por um período de 72 horas. *E. coli* DH10B foi usada como controle de crescimento

A quantificação da produção de ácido 3-indolacético e o índice de solubilização de fosfato nessas 38 comunidades, permitiram selecionar 17 comunidades baseando-se nos valores descritos na Tabela 7, obtendo valores máximos de produção de AIA de 84,20 µg/mL para a comunidade C6 e índice de solubilização de fósforo máximo de 12,95 para a comunidade C29, sendo esta última quem apresentou a melhor relação entre os três parâmetros.

Tabela 7. Quantificação da produção de AIA em meio LB suplementado com 1 mg/mL de triptofano e atividade de solubilização de fosfato em meio específico solubilizadores de fosfatos contendo fonte de fosfatos insolúvel.

ID	Origem	% de germinação em <i>C. dactylon</i> **	AIA (µg/mL)	Índice solubilização de fosfato
C2	ORN	57,14	63,08	*
C4	ORN	58,05	82,76	*
C6	ORZ	58,97	84,20	*
C7	CSP	63,19	37,70	10,67
C8	CSN	59,54	77,23	6,08
C9	CSP	57,23	32,48	8,53
C12	CSP	63,24	67,12	5,24
C16	CSN	63,54	71,84	4,03
C19	CSP	60,59	67,16	4,67
C25	OLP	60,41	66,66	3,96
C26	OLP	62,84	51,96	5,82
C27	OLN	58,12	71,91	5,71
C28	CSN	62,81	64,77	5,84
C29	CSN	59,26	78,69	12,95
C32	CSP	60,91	6,40	12,24
C32	CSP	65,45	5,41	11,06
C34	OSP	57,33	5,96	*

*Atividade não detectada em 48 horas de crescimento. **Porcentagem de germinação média do controle 49,79%.

4.4. Prospecção de promoção de crescimento em *B. ruziziensis*

Foram observadas diferenças significativas ($p\text{-valor} \leq 0,1$) entre a inoculação de sementes de *B. ruziziensis* frente ao controle, a partir das análises de peso fresco e peso seco tanto da parte aérea como da raiz. As Figuras 5 e 6 representam os resultados do experimento e exibem a heterogeneidade para cada um dos parâmetros analisados, porém exprimem a mesma tendência.

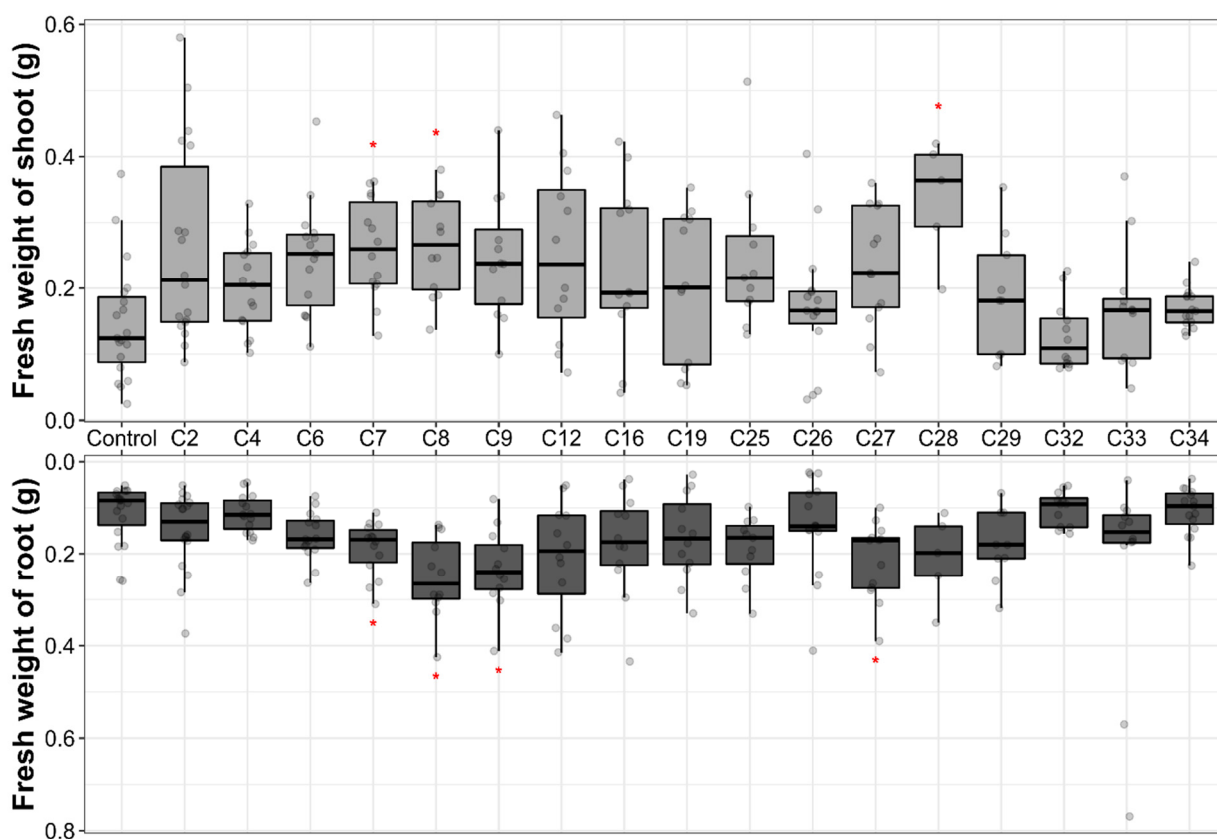


Figura 5. Boxplots demonstrando a distribuição do peso fresco da parte aérea (a) e raiz (b), em gramas, das plantas ao fim do período de crescimento pós-inoculação com as comunidades microbianas selecionadas. Pontos vermelhos indicam diferenças significativas entre as comunidades, segundo teste de comparação de médias Mann–Whitney U ($p\text{-valor} \leq 0,1$).

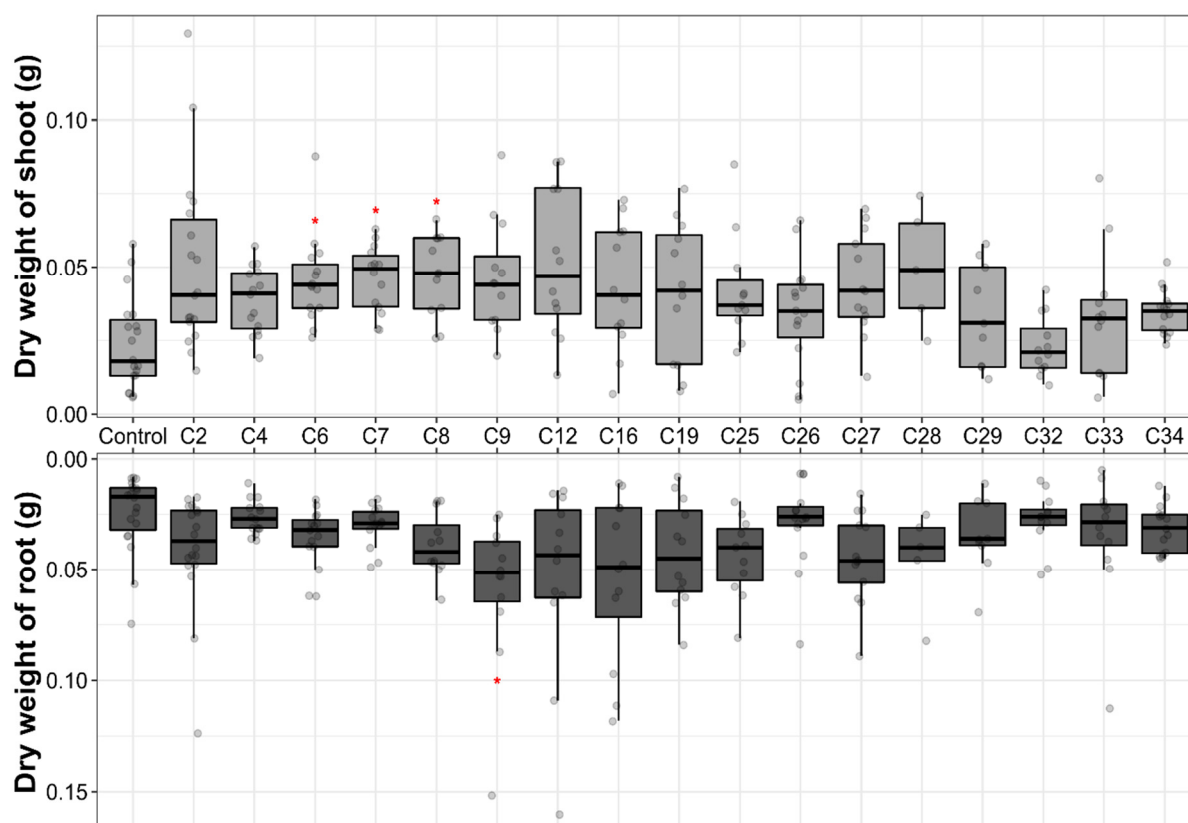


Figura 6. Boxplots demonstrando a distribuição do peso seco da parte aérea (a) e raiz (b), em gramas, das plantas ao fim do período de crescimento pós-inoculação com as comunidades microbianas selecionadas. Pontos vermelhos indicam diferenças significativas entre as comunidades, segundo teste de comparação de médias Mann–Whitney U (p -valor $\leq 0,1$).

4.5. Perfil de traços de promoção de crescimento vegetal

A quantificação de traços de promoção de crescimento em plantas, usando testes bioquímicos nas 17 comunidades selecionadas, são apresentados na Tabela 8. A atividade da enzima ACC-desaminase foi detectada em todas as comunidades, exceto nas comunidades C32 e C33, com valores desde 21,03 até 116 nmol de alfa-cetobutirato $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ a partir da indução com ACC 3 mM usando o meio de Dworkin e Foster.

No caso da produção de sideróforos, o uso do meio M9 teve uma maior indução na do sideróforos do tipo hidroxamatos se comparado com o meio BRX, mesmo depletando o ferro presente no xarope de cana-de-açúcar e no extrato de levedura e peptona. Isto provavelmente foi ocasionado devido à presença de pequenas quantidades de fosfatos que fazem parte da composição do meio (Schwyn e Neilands, 1987; Payne, 1994). As comunidades C2 e C4 apresentaram valores de 88%, e nas comunidades C28 e C29 observou-se a ausência da síntese destes compostos.

A atividade de solubilização de zinco usando óxido de zinco como fonte insolúvel, teve os valores mais altos para o caso de C2 com um index de solubilização de 6,02, contrário à sua atividade de solubilização de fósforo, a qual não foi detectada em 48 horas de crescimento em meio com fosfatos.

A máxima produção de biofilme foi induzida pelo meio BRX-caldo nas comunidades C8, C9, C32 e C34. Mientras que na condição testada com o meio TSB adicionado de glicose 1%, as comunidades C34 e C32 tiveram os maiores valores de produção. Em geral, os valores máximos de absorbância foram observados na comunidade C9 em BRX-caldo, enquanto C2 e C4 apresentaram uma produção de biofilme muito baixa nas duas condições testadas.

A atividade de quitinase foi detectada em 12 das 17 comunidades testadas, sendo C6 a que apresentou o maior índice de degradação de quitina com valores de 3,04, ressaltando um potencial participação destas comunidades no controle biológico pelo papel da enzima em processos de antagonismo contra fitopatógenos.

Nos testes de proteases (Tabela 9), foram encontradas cinco comunidades com capacidade proteolítica em meio com leite desnatado: C7, C8, C9, C32 e C33.

Nos meios de cultura usados nos testes de precipitação com tween 80 e 20, foi possível detectar a produção de lipases e esterases em cinco comunidades: C6 e C7 para lipases, e C27, C29 e C34 para esterases.

Nas condições testadas não foi possível detectar a capacidade de produção de HCN em 48 horas, pelo qual a observação foi estendida até os 10 dias de incubação sem mudanças observadas no indicador de ácido pícrico.

A detecção de enzimas líticas apresentou diversas respostas (Tabela 9). A triagem de celulases em meio contendo carboximetilcelulose mostrou a capacidade de metabolizar este polissacarídeo somente em duas das comunidades: C6 e C26. No caso de avicel, nenhuma das comunidades testadas apresentou atividade na presença deste substrato.

Para o caso do teste de atividade de amilase, 8 comunidades resultaram positivas: C2, C6, C7, C9, C27, C29, C32, e C33 (Tabela 9).

A triagem para detecção do gene *nifH* usando primers específicos para o gene da enzima nitrogenase demonstrou a presença de bandas de amplificação de fragmentos de DNA nas comunidades C2 e C34, apenas (Figura 7).

O crescimento de comunidades em meio LB suplementado com NaCl apresentou como resultado um declínio na D.O. na medida do aumento gradual das concentrações testadas, conseguindo o maior crescimento em meio LB padrão com 0,5% de NaCl (Tabela 9) e sendo tolerado até a concentração de 7,5% (1,28 M NaCl) por 13 das 17 comunidades testadas. Destas, as comunidades C26, C28 e C29 foram as únicas a tolerar uma concentração de 10,5% (aproximadamente 1,8 M de NaCl) e crescer em uma concentração de glicerol de 25%, mostrando uma grande capacidade de tolerância e crescimento em elevada pressão osmótica.

Tabela 8. Resultados da quantificação de diferentes traços de promoção de crescimento nas 17 comunidades selecionadas. Valores entre parênteses mostram o desvio padrão.

Comunidade	ACC-des. (nmol alfa- cetobutirato mg ⁻¹ h ⁻¹)	Siderofóros % (MM9)	Siderofóros % (BRX)	Índice de Sol. Zn	Biofilme Abs 550nm (TSB + Glu 1%)**	Biofilme Abs 550nm (BRX)	Índice Quitina
C2	48,15	88,81 ± 1,66	70,29 ± 1,65	6,01 ± 0,24	0,05 ± 0,004 *	0,05 ± 0,002 *	2,21 ± 0,03
C4	73,41	88,65 ± 1,24	54,46 ± 27,91	4,79 ± 0,31	0,07 ± 0,006	0,10 ± 0,01	2,0 †
C6	43,66	77,6 ± 17,67	64,34 ± 2,87	4,55 ± 0,33	0,10 ± 0,02	0,29 ± 0,02 *	3,037 ± 0,14
C7	49,16	27,55 ± 4,07	14,84 ± 24,25	3,39 ± 0,15	0,14 ± 0,02 *	0,17 ± 0,02 *	2,0 †
C8	67,18	84,11 ± 0,33	73,469 ± 2,27	5,22 ± 0,42	0,16 ± 0,01 *	0,14 ± 0,009 *	2,33 ± 0,02
C9	56,93	91,69 ± 11,70	73,907 ± 1,13	3,98 ± 0,06	0,17 ± 0,006 *	0,18 ± 0,02 *	2,237 ± 0,03
C12	44,61	84,88 ± 0,19	74,373 ± 1,07	5,18 ± 0,17	0,17 ± 0,01 *	0,17 ± 0,01 *	2,393 ± 0,21
C16	27,08	84,97 ± 0,80	74,169 ± 1,41	4,63 ± 0,09	0,13 ± 0,03	0,15 ± 0,006 *	2,183 ± 0,02
C19	87,39	82,95 ± 1,04	73,761 ± 1,15	5,44 ± 0,03	0,22 ± 0,02 *	0,20 ± 0,01 *	2,253 ± 0,07
C25	115,7	85,70 ± 0,83	65,335 ± 1,31	4,57 ± 0,25	0,17 ± 0,009 *	0,20 ± 0,01 *	2 0 †
C26	106,90	87,58 ± 0,77	65,131 ± 2,07	3,77 ± 0,17	0,17 ± 0,004 *	0,19 ± 0,03 *	2,42 ± 0,18
C27	69,47	88,72 ± 0,79	65,86 ± 0,80	3,32 ± 0,10	0,16 ± 0,01 *	0,19 ± 0,009 *	2,527 ± 0,03
C28	29,81	2,14 ± 3,93	21,778 ± 11,44	4,74 ± 0,09	0,18 ± 0,008 *	0,63 ± 0,03 *	2,39 ± 0,07
C29	50,69	-	39,475 ± 23,90	5,91 ± 0,23	0,21 ± 0,04 *	1,57 ± 0,53 *	2,37 ± 0,09
C32	-	40,89 ± 4,78	21,691 ± 6,34	2 0 †	0,41 ± 0,01 *	0,49 ± 0,01 *	-
C33	-	30,40 ± 4,90	19,563 ± 34,95	2 0 †	0,19 ± 0,007 *	0,34 ± 0,018 *	2 0 †
C34	20,62	38,33 ± 13,53	36,463 ± 2,87	3,663 ± 0,15	0,68 ± 0,03 *	0,47 ± 0,02 *	2,393 ± 0,06

* apresentou diferença estatística do grupo controle; - sem crescimento, † sem atividade.

** Meio de cultura TSB ("Trypticase Soy Broth") suplementado com 1% de glicose.

Tabela 9. Resultados de testes bioquímicos realizados nas 17 comunidades selecionadas. Para o caso do teste de tolerância a NaCl foi usada uma escala baseada no aumento da turbidez.

Comunidade	Protease	Amilase	Celulases (CMC)	Celulases (Avicel)	HCN	Esterases	Lipases	NaCl 0,5%	NaCl 2,5%	NaCl 5,5%	NaCl 7,5%	NaCl 10,5%	Glicerol 25%
C2	-	+	-	-	-	-	-	++	++	+	+	-	-
C4	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-
C6	-	+	+	-	-	-	+	++	++	++	+	-	-
C7	+	+	-	-	-	-	+	++	+	+	-	-	-
C8	+	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-
C9	+	+	-	-	-	-	-	++	++	++	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-
C16	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-
C19	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-
C25	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	-	-
C26	-	-	+	-	-	-	-	++	++	+	+	+	+
C27	-	+	-	-	-	+	-	++	++	+	+	-	-
C28	-	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	+	+
C29	-	+	-	-	-	+	-	++	++	+	+	+	+
C32	+	+	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-
C33	+	+	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-
C34	-	-	-	-	-	+	-	++	+	+	+	-	-

NaCl D.O. 595 nm $\geq 1,0$ = ++; $0,1 - 1,0$ = +; $\leq 0,1$ = -.

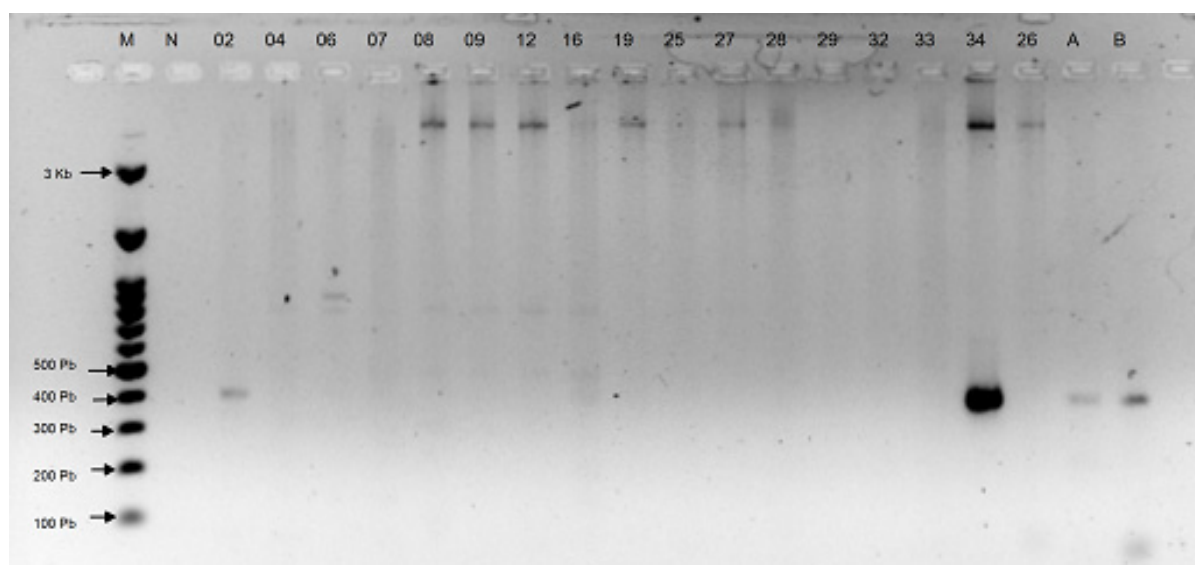


Figura 7. Fotografia do gel de agarose 1,5% mostrando bandas de amplificação para as C2 e C34. Foram usados controles negativos (N) e controles positivos de *Bradyrhizobium* sp. (A) e *Azospirillum brasiliense* BR11001 (B).

4.6. Avaliação do perfil de promoção de crescimento

A partir do índice numérico criado, as comunidades foram classificadas em uma escala (“ranking”) de acordo com os traços funcionais obtidos nos testes bioquímicos e fisiológicos, em conjunto com os resultados da inoculação *in planta*. O resultado da soma dos valores foram desde 49,98 para a maior pontuação, até -41. Desta forma, a comunidade C9 ocupou a primeira posição e, portanto, obteve o maior potencial metabólico e de promoção de crescimento vegetal tanto em *C. dactylon* como em *B. ruziziensis*.

Dentro do grupo avaliado destacam-se as cinco primeiras (Tabela 10) pelo alto potencial metabólico e de promoção de crescimento vegetal. Quatro delas provêm de colmo de cana-de-açúcar convencional (CS); destes, dois são epifíticos - posição 1 e 4 - e dois endofíticos - posição 2 e 3 do “ranking” - e só uma provém de cana-de-açúcar orgânica sendo endofítico de folha (OLN) na posição número 5 da lista. Assim,

o “ranking” permitiu o agrupamento das comunidades em três grupos: as cinco primeiras consideradas “Top ranked”, as cinco últimas “Bottom ranked”, e as sete comunidades situadas entre o primeiro e o último grupo e chamadas de “Intermediate Ranked”.

O anterior demonstra o potencial de comunidades epifíticas provenientes do cauliplano (superfície do caule) e endosfera da folha, o qual está complementado com testes de perfil de metabolismo de carboidratos, cujos resultados, apresentados na Tabela 11, demonstram a capacidade de metabolizar uma grande parte dos carboidratos do sistema API 50 CH.

Tabela 10. Resultado da avaliação integral de resultados conjuntos de testes de inoculação em plantas e quantificação de traços de promoção de crescimento vegetal na forma de ranking.

Ranking	comunidade	Origem	FR	SR	FA	SA	ST	FT	BNa	Total
1	C9	CSP	9	10	6	6	10	8	0,98	49,98
2	C8	CSN	10	5	9	8	4	9	3,38	48,38
3	C28	CSN	8	4	10	9	7	10	-0,67	47,33
4	C12	CSP	7	6	5	7	8	7	2,27	42,27
5	C27	OLN	4	8	4	4	6	3	1,96	30,96
6	C16	CSN	5	9	-1	0	9	5	0,56	27,56
7	C7	CSP	3	-2	8	10	1	6	-1,60	24,4
8	C19	CSP	1	7	0	3	5	2	3,62	21,62
9	C6	ORZ	2	0	7	5	0	4	1,86	19,86
10	C25	OLP	0	3	3	-1	2	1	2,82	10,82
11	C2	ORN	-3	2	2	1	3	-1	2,07	6,07
12	C29	CSN	6	1	-2	-5	-3	0	3,48	0,48
13	C4	ORN	-4	-4	1	2	-1	-2	1,28	-6,72
14	C34	OSP	-5	-1	-5	-2	-2	-5	0,36	-19,64
15	C26	OLP	-2	-6	-4	-3	-5	-3	2,80	-20,2
16	C33	CSP	-1	-3	-3	-4	-4	-4	-5,13	-24,13
17	C32	OSP	-6	-5	-6	-6	-6	-6	-6,20	-41,2

FR – Massa fresca raiz, SR – Massa seca raiz, FA – Massa fresca parte aérea, SA – Massa seca parte aérea, ST – Massa seca total, FT – Massa fresca total, BNa – Resultado da soma de testes bioquímicos e resultados de testes de tolerância à NaCl.

Tabela 11. Resultados do teste de metabolismo de carboidratos com o sistema API 50 CH das cinco comunidades com o melhor desempenho em planta e melhor perfil bioquímico e fisiológico. Para as inoculações foi usado o meio API 50 CHB/E. As galerias foram inoculadas segundo as indicações do fabricante e incubadas a 30°C, fazendo leituras as 24 e 48 horas.

Galeria	Tubo	Carboidrato	Comunidades				
			C8	C9	C12	C27	C28
1	1	Controle Negativo	-	-	-	-	-
	2	Glycérol (GLY)	+	+	+	+	+
	3	Erythritol (ERY)	-	-	+	-	-
	4	D-Arabinose (DARA)	+	+	+	+	-
	5	L-Arabinose (LARA)	+	+	+	+	+
	6	D-Ribose (RIB)	+	+	+	+	+
	7	D-Xylose (DXYL)	+	+	+	+	+
	8	L-Xylose (LXYL)	-	-	-	-	-
	9	D-Adonitol (ADO)	+	+	+	+	-
	10	Methyl-BD-Xylopyranoside (MDX)	+	+	+	+	-
2	11	D-Galactose (GAL)	+	+	+	+	+
	12	D-Glucose (GLU)	+	+	+	+	+
	13	D-Fructose (FRU)	+	+	+	+	+
	14	D-Mannose (MNE)	+	+	+	+	+
	15	L-Sorbose (SBE)	+	+	+	-	-
	16	L-RHAMnose (RHA)	+	+	+	+	+
	17	Dulcitol (DUL)	+	+	+	-	-
	18	Inositol (INO)	+	+	+	+	+
	19	D-Mannitol (MAN)	+	+	+	+	+
	20	D-Sorbitol (SOR)	+	+	+	+	+
3	21	Mannopryanoside (MDM)	+	-	+	-	-
	22	Glucopryanoside (MDG)	+	+	+	+	+
	23	AcetylGlucosamine (NAG)	+	+	+	-	+
	24	Amygdaline (AMY)	+	+	+	+	-
	25	Arbutine (ARB)	+	+	+	+	+
	26	Esculine (ESC)	+	+	+	+	+
	27	Salicine (SAL)	+	+	+	+	+
	28	D-Celiobiose (CEL)	+	+	+	+	+
	29	D-Maltose (MAL)	+	+	+	+	+
	30	D-Lactose (LAC)	+	+	+	+	+
4	31	D-Melibiose (MEL)	+	+	+	+	+
	32	D-Sacharose (SAC)	+	+	+	+	+
	33	D-Trehalose (TRE)	+	+	+	+	+
	34	Inuline (INU)	+	+	+	-	-
	35	D-Melezitose (MLZ)	+	+	+	+	+
	36	D-Rafinose (RAF)	+	+	+	+	+

	37	Amido (AMD)	+	+	+	+	-
	38	Glycogene (GLYG)	+	+	+	+	-
	39	Xylitol (XLT)	-	-	-	+	+
	40	Gentiobiose (GEN)	+	+	+	+	+
5	41	D-Turanose (TUR)	+	+	+	+	-
	42	D-Lyxose (LYX)	+	+	+	+	-
	43	D-Tagatose (TAG)	+	+	+	-	-
	44	D-Fucose (DFUC)	+	+	+	+	-
	45	L-Fucose (LFUC)	+	+	+	+	-
	46	D-Arabitol (DARL)	+	+	+	+	-
	47	L-Arabitol (LARL)	+	+	-	+	-
	48	Potassium Gluconate (GNT)	-	-	-	-	-
	49	Potassium2 - Cetogluconate (2KG)	-	-	-	-	-
	50	Potassium5- Cetogluconate (5KG)	+	+	+	-	+

4.7. Composição taxonômica das comunidades de bactérias endofíticas e epifíticas de cana-de-açúcar

O sequenciamento das dezessete comunidades gerou um total de 606.319 leituras, que foram fundidas aos pares R1 e R2, resultando em um montante de 600.678 sequências com sobreposição de no mínimo 15 pb. Essas sequências possuem tamanho médio de 478 pb que foram submetidas ao processo de remoção de primers resultando em 573.909 sequências.

Após a etapa de processamento com o DADA2, para remoção de sequências de baixa qualidade (filtradas), a correção de erros do sequenciamento (“denoised”) e a remoção de quimeras (não-quiméricas) restaram 471.096 sequências, correspondendo a aproximadamente 78% do total dos dados. A distribuição das sequências de cada etapa do processamento com o DADA2 por amostra, estão descritas na Tabela 12.

Tabela 12. Relatório de filtragem de sequências por amostras obtidas do processamento com DADA2.

Amostra	Entrada	Filtrado	Remoção de ruído	Remoção de quimeras
C2	7.170	6.997	6.789	4.851
C4	28.494	27.663	27.512	24.362
C6	70.373	67.383	66.954	54.896
C7	35.224	34.369	34.254	31.369
C8	71.344	70.176	69.338	56.811
C9	216.128	211.407	210.096	178.031
C12	37.202	36.388	35.857	31.558
C16	34.652	32.786	32.361	27.727
C19	42.374	41.614	41.093	34.231
C25	6.122	5.978	5.957	5.601
C26	3.914	3.823	3.535	3.243
C27	1.090	1.052	1.028	984
C28	10.778	10.481	10.365	9.332
C29	943	909	909	909
C32	2.817	2.654	2.627	2.608
C33	1.212	1.183	1.175	1.175
C34	4.072	4.005	3.925	3.408
Total	573.909	558.868	553.775	471.096

As sequências resultantes do processamento foram classificadas em 174 “amplicon sequence variance” (ASVs). Para avaliar a riqueza, uniformidade e abundância de espécies em cada uma das amostras, foram utilizados os índices de diversidade alfa, espécies observadas, Chao-1, Shannon e Simpson (Figura 8.A).

Considerando o estimador de riqueza Chao-1, as comunidades apresentaram uma variação no número de ASVs. No entanto, a maior riqueza está mais associada às amostras das comunidades C28, C16, C12, C9 que são epifíticos de colmo convencional, enquanto que C19, C8 são endofíticos de colmo convencional (Figura 8.A).

Para os índices de Shannon (maior peso riqueza de espécie) e o de Simpson (considera a uniformidade mais do que a riqueza de espécies) as comunidades C29, C32 e C33, apresentaram menor riqueza e uniformidade.

O teste estatístico de Kruskal-Wallis para comparação, considerando os 3 fatores - ambiente, nicho e manejo - e por comunidade, não foram significativos apresentando p-valor igual a 0,9131081, 0,9820452 e 0,9794189, para as métricas de Chao1,

Shannon e Simpson, respectivamente, enquanto para as comunidades os valores de p-valor foram 0,4529608, 0,4529608 e 0,4529608, respectivamente. Diante destas análises não foi possível considerar que os fatores ambiente, nicho e manejo influenciam a diversidade de ASVs, assim como o agrupamento das comunidades em "Top ranked", "Intermediate Ranked" e "Bottom ranked" também não exibiram diferença.

A diversidade beta para as ASVs foi estimada a partir da medida de distância de Bray-Curtis. A ordenação do PCoA representa a dissimilaridade da composição das comunidades entre os manejos e foi, significativamente, diferente (PERMANOVA $R^2 = 0,11119$ $P = 0,031$) (Figura 8.B).

As análises de dados de sequenciamento mostram a presença de 54 taxas identificadas nas comunidades, e apresentados na Tabela 13. Destes, 34 possuem atribuições no nível de gêneros e 24 de espécie (Tabela 14), as quais estão distribuídas nas comunidades analisadas e apresentadas no gráfico de barras (Figura 9), com exceção da C27, C32 e C33, que apresentaram unicamente atribuição taxonômica até o nível de gênero.

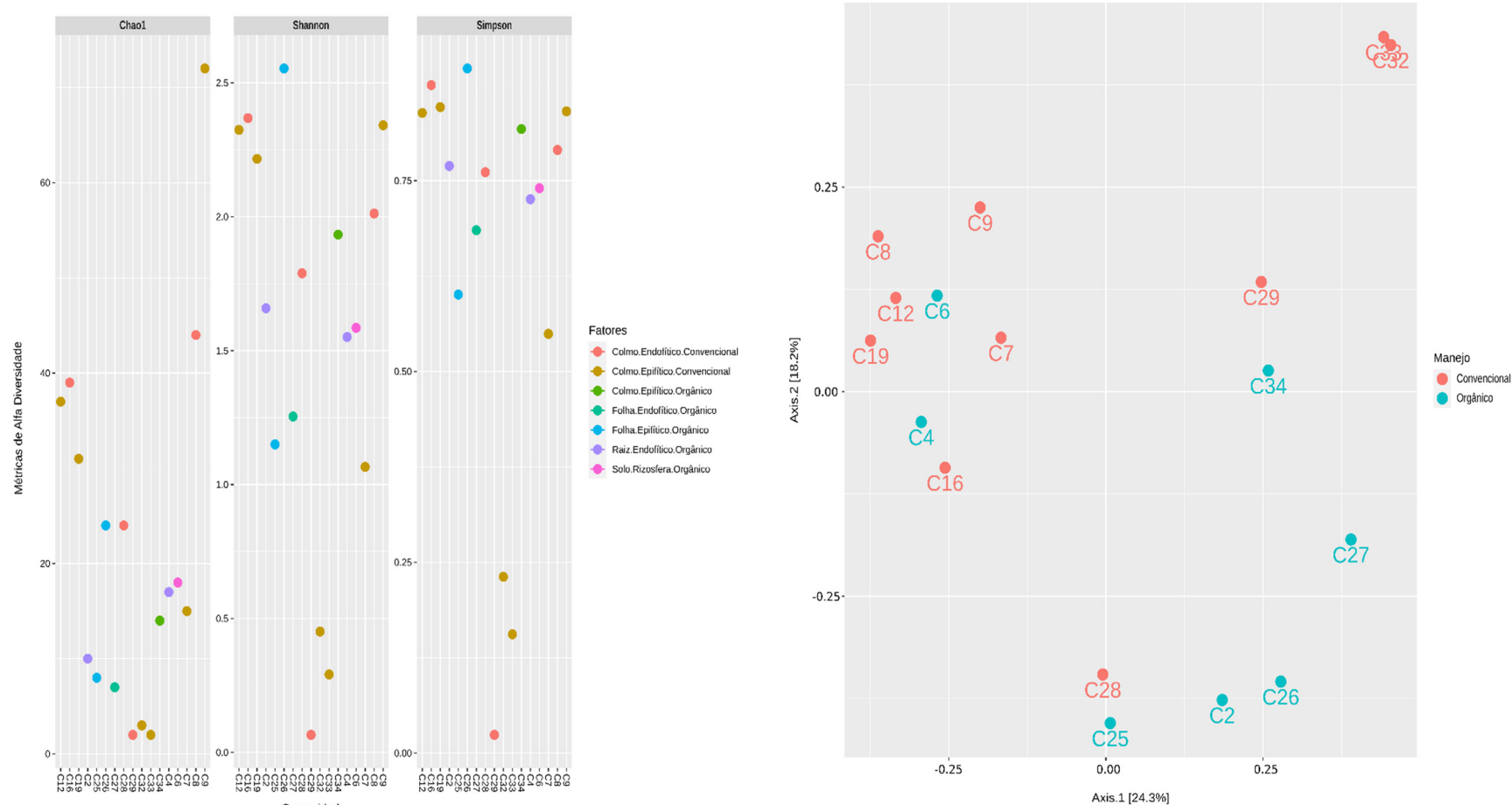


Figura 8. A. Métricas de alfa-diversidade a partir das ASVs por comunidade. A diversidade alfa foi avaliada para as medidas de diversidade Chao 1, Shannon e Simpson. As cores dos pontos indicam o ambiente correspondente à comunidade. **B.** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) com base na distância de Bray-Curtis que considera as diferenças das comunidades microbianas entre os manejos.

Tabela 13. Tabela com os ASVs obtidos a partir das análises de sequenciamento da região V3–V4 do gene 16S rRNA

ID	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
ASV1	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Enterobacter	NA
ASV2	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	maltophilia
ASV3	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV4	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus	NA
ASV5	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV6	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	baylyi
ASV7	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV8	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	NA
ASV9	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Achromobacter	NA
ASV10	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Leucobacter	iarius
ASV11	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	hunanensis
ASV12	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	taiwanense
ASV13	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV14	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	gleum
ASV15	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia	Sphingobacteriales	Sphingobacteriaceae	Sphingobacterium	multivorum
ASV16	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV17	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	NA
ASV18	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV19	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Achromobacter	NA
ASV20	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	NA
ASV21	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	NA
ASV22	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	NA
ASV23	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	maltophilia
ASV24	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	maltophilia
ASV25	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus	NA
ASV26	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	NA
ASV27	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	NA
ASV28	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	NA
ASV29	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	NA
ASV30	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV31	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Flavobacterium	NA
ASV32	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Achromobacter	NA
ASV33	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	maltophilia
ASV34	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV35	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Citrobacter	murlinae

Tabela 13. Continuação.

ID	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
ASV36	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	xylanilyticus
ASV37	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Kosakonia	NA
ASV38	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Kosakonia	NA
ASV39	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus	NA
ASV40	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pantoea	NA
ASV41	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus	NA
ASV42	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	illinoisensis
ASV43	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV44	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV45	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV46	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	illinoisensis
ASV47	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	NA
ASV48	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	NA	NA
ASV49	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV50	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	rhizophila
ASV51	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	NA	NA
ASV52	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Lysinibacillus	NA
ASV53	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Pantoea	NA
ASV54	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia	NA
ASV55	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum	huttiense
ASV56	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV57	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	sulfureus
ASV58	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	rhizophila
ASV59	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum	NA
ASV60	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	daejeonense
ASV61	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	Sphingobium	yanoikuyae
ASV62	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV63	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia	NA
ASV64	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	NA	NA
ASV65	Bacteria	Proteobacteria	NA	NA	NA	NA	NA
ASV66	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Microbacterium	binotii
ASV67	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV68	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	Chryseobacterium	NA
ASV69	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV70	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Acidovorax	NA

Tabela 13. Continuação.

ID	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
ASV71	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Cellulomonadaceae	Cellulomonas	NA
ASV72	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV73	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV74	Bacteria	Proteobacteria	NA	NA	NA	NA	NA
ASV75	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Xanthomonas	NA
ASV76	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	NA	NA
ASV77	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Microbacterium	NA
ASV78	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Serratia	NA
ASV79	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	maltophilia
ASV80	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum	frisingense
ASV81	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Leucobacter	NA
ASV82	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV83	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV84	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	NA
ASV85	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	maltophilia
ASV86	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Enterococcaceae	Enterococcus	NA
ASV87	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV88	Bacteria	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ASV89	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV90	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	NA
ASV91	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Pseudoxanthomonas	spadix
ASV92	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Planococcaceae	Lysinibacillus	NA
ASV93	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	NA	NA
ASV94	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV95	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV96	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	NA
ASV97	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV98	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV99	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	NA
ASV100	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum	NA
ASV101	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	NA
ASV102	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV103	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	Bordetella	NA
ASV104	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	NA	NA
ASV105	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	NA

Tabela 13. Continuação.

ID	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
ASV106	Bacteria	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ASV107	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV108	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	NA	NA
ASV109	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	NA
ASV110	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	Klebsiella	NA
ASV111	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV112	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	NA	NA
ASV113	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	NA
ASV114	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV115	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	NA	NA	NA
ASV116	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	maltophilia
ASV117	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	NA	NA	NA
ASV118	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Alcaligenaceae	NA	NA
ASV119	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	NA	NA	NA
ASV120	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	NA	NA
ASV121	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Cupriavidus	NA
ASV122	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Microbacterium	NA
ASV123	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Herbaspirillum	NA
ASV124	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	NA	NA
ASV125	Bacteria	Proteobacteria	NA	NA	NA	NA	NA
ASV126	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV127	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	NA
ASV128	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	NA	NA
ASV129	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	NA	NA
ASV130	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	NA	NA
ASV131	Bacteria	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ASV132	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	NA	NA
ASV133	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV134	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	NA
ASV135	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	NA	NA	NA
ASV136	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV137	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Fontibacillus	NA
ASV138	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Shinella	zoogloeoides
ASV139	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	NA	NA
ASV140	Bacteria	Proteobacteria	NA	NA	NA	NA	NA

Tabela 13. Continuação.

ID	Domínio	Filo	Classe	Ordem	Família	Gênero	Espécie
ASV141	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Microbacterium	NA
ASV142	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	Microbacterium	laevaniformans
ASV143	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	NA	NA
ASV144	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	caledonica
ASV145	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV146	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV147	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	NA	NA
ASV148	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	NA	NA
ASV149	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	NA	NA	NA
ASV150	Bacteria	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ASV151	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	NA	NA	NA
ASV152	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	glycanilyticus
ASV153	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus	NA
ASV154	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	NA	NA
ASV155	Bacteria	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae	NA	NA
ASV156	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	NA	NA	NA
ASV157	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	NA
ASV158	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae_1	Bacillus	NA
ASV159	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	NA
ASV160	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadaceae	Pseudomonas	NA
ASV161	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	NA	NA	NA
ASV162	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	NA	NA
ASV163	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	NA
ASV164	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Rhizobium	NA
ASV165	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	NA	NA
ASV166	Bacteria	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ASV167	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Neorhizobium	NA
ASV168	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae_1	Paenibacillus	timonensis
ASV169	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiales_incertae_sedis	NA	NA
ASV170	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiaceae	Neorhizobium	NA
ASV171	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Pseudoxanthomonas	NA
ASV172	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Lactobacillales	Streptococcaceae	Lactococcus	NA
ASV173	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	NA	NA	NA
ASV174	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Variovorax	guangxiensis

Tabela 14. Lista de ASVs com atribuição taxonômica até o nível de espécie identificadas a partir do sequenciamento das 17 comunidades selecionadas, as quais encontra-se distribuídas em quatro filos.

Filo	Espécies
Actinobacteria	<i>Leucobacter iarius</i>
	<i>Microbacterium binotii</i>
	<i>Microbacterium laevaniformans</i>
Bacteroidetes	<i>Chryseobacterium daejeonense</i>
	<i>Chryseobacterium gleum</i>
	<i>Taiwanese Chryseobacterium</i>
	<i>Sphingobacterium multivorum</i>
	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>
Firmicutes	<i>Enterococcus sulfureus</i>
	<i>Paenibacillus glycanilyticus</i>
	<i>Paenibacillus hunanensis</i>
	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>
	<i>Paenibacillus timonensis</i>
	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>
Proteobacteria	<i>Acinetobacter baylyi</i>
	<i>Burkholderia caledonica</i>
	<i>Citrobacter murlinae</i>
	<i>Herbaspirillum frisingense</i>
	<i>Herbaspirillum huttiense</i>
	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>
	<i>Shinella zoogloeoides</i>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
	<i>Variovorax Guangxiensis</i>

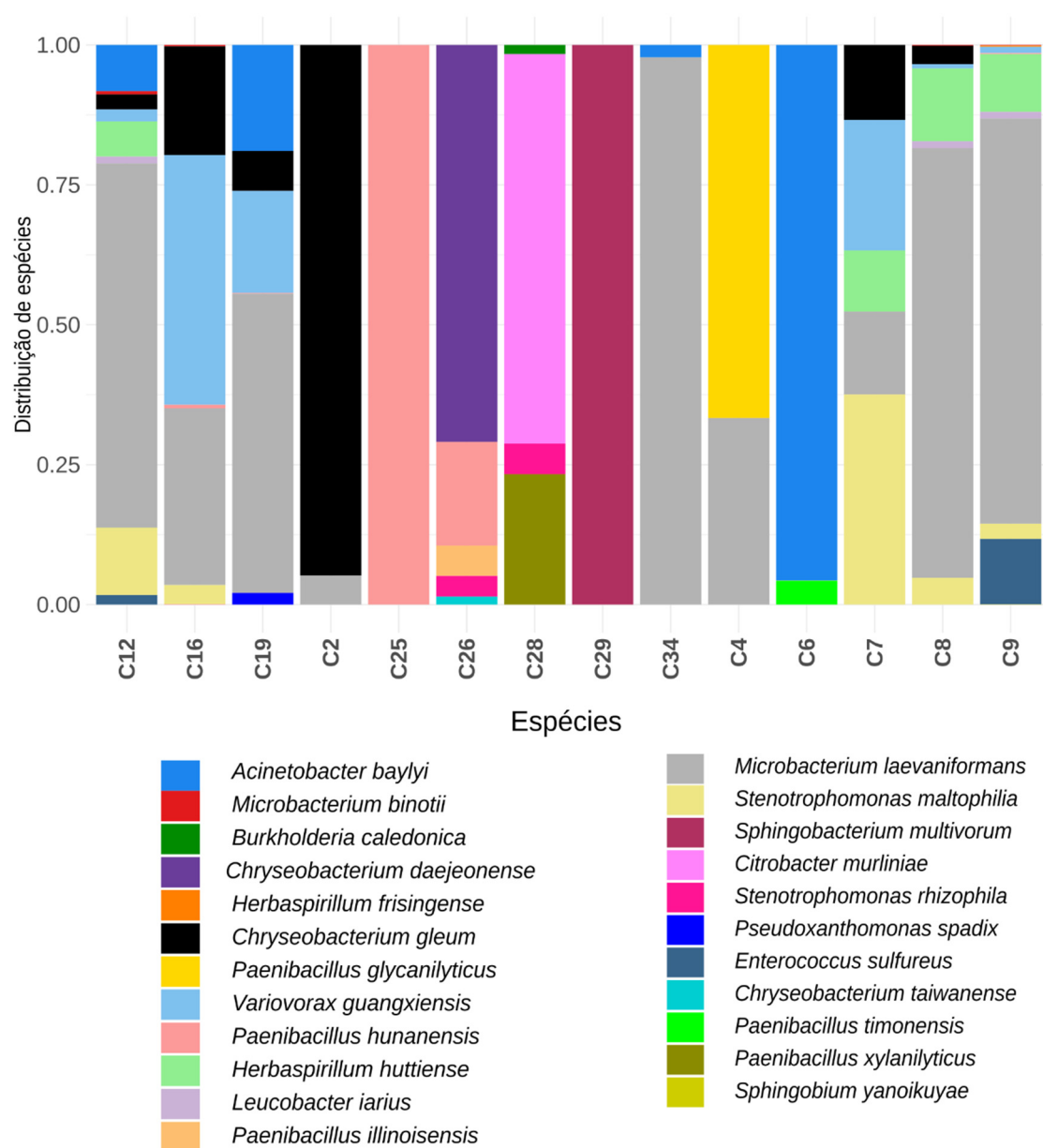


Figura 9. Distribuição de espécies em 14 das 17 comunidades estudadas, mostrando os diferentes níveis de abundância dentro de cada comunidade analisada.

Foi observado que as quatro primeiras comunidades do ranking (Tabela 10), possuíam um total de 16 ASVs, com atribuição de espécies (**Error! Reference source not found.** e Figura 10) em C28, que apresentou quatro espécies exclusivas as quais não estavam presentes nas outras três comunidades (*Stenotrophomonas rhizophila*, *Sphingobium yanoikuyae*, *Burkholderia caledonica*, *Pseudoxanthomonas spadix*), assim como em três das cinco espécies que conformam a comunidade C9 (*Herbaspirillum huttiense*, *Shinella zoogloeoides*, *Herbaspirillum frisingense*). Já para as comunidades C8, C9 e C12, estas compartilharam um total de 9 das espécies identificadas no grupo; destas, seis são comuns entre C8, C9 e C12 (*Sphingobacterium multivorum*, *Paenibacillus hunanensis*, *Leucobacter iarius*, *Microbacterium binotii*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Paenibacillus illinoisensis*), duas espécies para C9 e C12 (*Chryseobacterium taiwanense* e *Acinetobacter baylyi*) e uma comum para C12 e C8 (*Chryseobacterium gleum*).

A partir dos dados de sequenciamento das comunidades, foi identificada também a distribuição e prevalência de gêneros distribuídos dentro do grupo, com limiar de detecção maior que 0,1% e limiar de prevalência maior que 10%. Este fato foi apresentado na forma de mapa de calor (Figura 11), onde é possível observar que ainda persistem um número considerável de ASVs sem atribuição taxonômica seguido dos gêneros com maior prevalência e abundância: *Enterobacter*, *Paenibacillus*, *Stenotrophomonas* e *Pseudomonas*.

Tabela 15. Distribuição de espécies das primeiras quatro comunidades do grupo "Top ranked" considerando duas categorias: comuns, para as espécies que foram identificadas em várias comunidades e espécies que foram identificadas em uma única comunidade.

Categoria	Espécies	Comunidade
Comuns	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	C12, C8 e C9
	<i>Paenibacillus hunanensis</i>	
	<i>Leucobacter iarius</i>	
	<i>Microbacterium binotii</i>	
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	
	<i>Chryseobacterium taiwanense</i>	C12 e C9
	<i>Acinetobacter baylyi</i>	
	<i>Chryseobacterium gleum</i>	C12 e C8
Únicas	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	C9
	<i>Shinella zoogloeoides</i>	
	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	
	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	C28
	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	
	<i>Burkholderia caledonica</i>	
	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>	

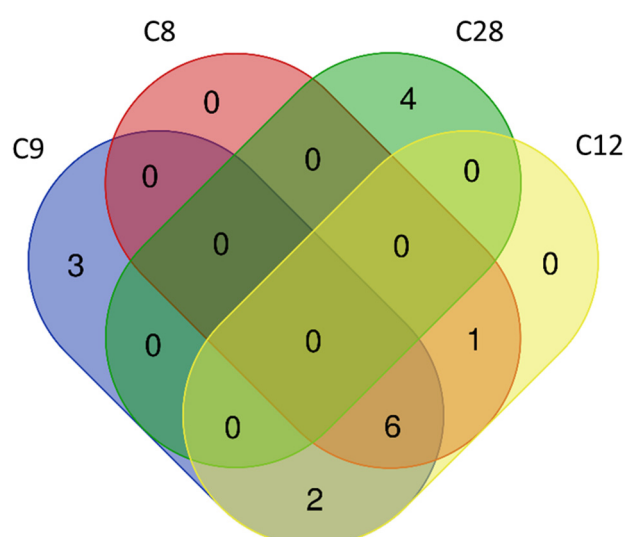


Figura 10. Diagrama de Venn mostrando o número de espécies dentro das categorias comuns ou únicas entre as quatro primeiras comunidades do "ranking".

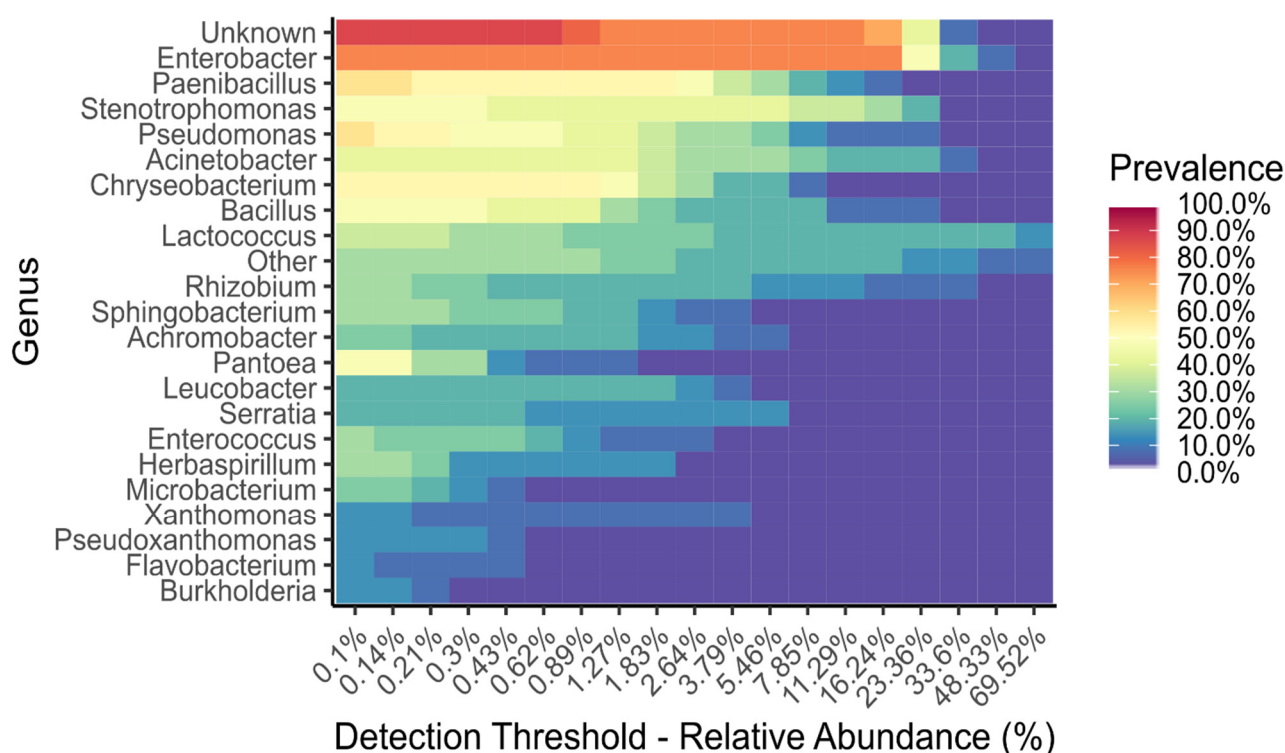


Figura 11. Mapa de calor do microbioma fundamental ou "core microbiome" exibindo a prevalência e a abundância relativa dos gêneros identificados, dentre as 17 comunidades selecionadas, no processo de prospecção de comunidades promotoras de crescimento em plantas.

De acordo com a análise de enriquecimento de descritores das 17 comunidades selecionadas, a partir das 944 iniciais, há destaque para o ambiente colmo da cana-de-açúcar com manejo convencional (p -valor = 0.0001183), além do nicho epifítico neste mesmo ambiente (p -valor = 0.001067), e por fim, do ambiente colmo da cana-de-açúcar sob qualquer manejo (p -valor = 0.005637). Ainda vale ressaltar que o ambiente raiz de cana-de-açúcar convencional também obteve destaque, porém com um nível descritivo de significância menor (p -valor = 0.05497).

A partir dos 54 taxa identificados nas comunidades, 24 possuíam atribuições no nível de espécie. Além disso, encontramos 10 correspondências nos dados de Levy et al. (Levy et al., 2018), que utilizaram uma lista de 4.921 registros de taxa no JGI (<https://genome.jgi.doe.gov/portal/>) que, quando relacionados com o banco de dados NCBI Taxonomy (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>), representam 4.726 taxa distintos. Desses 10 taxa, 5 possuíam alguma estirpe associada à planta ou solo

(“rhizosphere”, “endophyte”, “phylosphere”) e 5 não possuíam estirpes na lista dos considerados associados às plantas (“plant-associated”) (Tabela 16).

Tabela 16. Descrição de espécies identificadas neste trabalho coincidentes com as espécies analisadas no trabalho de Levy et. al. (2017) indicando seu status e o ambiente a partir do qual foi descrito.

Estatus	Tax_id	Espécie	Ambiente relacionado
Associada a planta ou solo	134536	<i>Paraburkholderia caledonica</i>	“Rhizosphere”
	216778	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	“Rhizosphere”
	40324	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	“Rhizosphere/endophyte/soil/animal/other”, “Endophyte: Root; animal: human, giardia, oyster; other: rock surface”
	415229	<i>Pseudoxanthomonas spadix</i>	“Phylosphere”
	92645	<i>Herbaspirillum frisingense</i>	“Endophyte” “Endophyte: leaf”
Não associado a planta	202950	<i>Acinetobacter baylyi</i>	“Other: activated sludge”
	36807	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	“Subsurface sediment”
	363331	<i>Chryseobacterium taiwanense</i>	“Freshwater”
	250	<i>Chryseobacterium gleum</i>	“Animal: human”
	863372	<i>Herbaspirillum huttiense</i>	“Other: freshwater”

Da mesma forma, todos os taxa com atribuição até o nível de gênero do presente trabalho foram comparados com o microbioma fundamental (“core microbiome”) da cana-de-açúcar reportado por de Souza et al. (de Souza et al., 2016), e adicionalmente os gêneros *Burkholderia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Stenotrophomonas* e *Microbacterium*, relacionados a este trabalho, fazem parte de um grupo de 26 gêneros testados em experimentos de inoculação com milho e posteriormente sequenciados em um trabalho posterior (Armanhi et al., 2018; de Souza et al., 2019), onde em alguns deles foi identificada a capacidade de colonizar as plantas de forma robusta, resultando na identificação dos gêneros *Burkholderia*, *Pantoea*, *Enterobacter* e *Stenotrophomonas* como colonizadores robustos.

A análise de co-ocorrência (Figura 12) revela a existência de quatro sub-redes. Duas dessas sub-redes apresentaram padrão semelhante, em que há apenas um par de gêneros em cada, sendo estes: *Enterobacter-Stenotrophomonas* e *Shingobium-Pseudoxanthomonas*. Além disso, essas sub-redes apresentaram as menores

proximidades (“closeness”) entre seus elementos (Tabela 17), com um valor de $1,74 \times 10^{-3}$. Por sua vez, *Serratia*, *Acidovorax*, *Lysinibacillus* e *Xanthomonas* compõem outra sub-rede que, embora possua maior número de elementos, a medida de proximidade entre estes se assemelha a encontrada nas sub-redes anteriores ($1,89 \times 10^{-3}$). A maior e mais complexa sub-rede conta com 17 gêneros apresentando, em média, proximidade de 4×10^{-3} ($\pm 0,17 \times 10^{-3}$). Nesta sub-rede é notada a existência de duas subdivisões. A de menor interligação, próxima ao topo do gráfico, é definida pela falta de elementos acentuados de centralidade, aqui definido pelo valor de centralidade de autovetor (“eigenvector centrality”). Na região oposta do gráfico, a segunda subdivisão, exibe a maior complexidade presente na análise como um todo, onde nota-se um maior grau de ligação dos gêneros presentes. O gênero *Chryseobacterium* é considerado um elemento central (“eigen centrality”: 1), conectado com todos os outros gêneros presentes em sua subdivisão, à exceção de *Acinetobacter*. Ademais, gêneros como *Pseudomonas*, *Enterococcus* e *Leucobacter*, apresentaram alta conectividade com os elementos vizinhos e valores de centralidade acima de 0,85. Ainda em relação a esta sub-rede, vale destacar os gêneros *Pantoea* e *Sphingobacterium*, que são os elementos de ligação entre as subdivisões, correspondendo aos maiores valores de medida de intermediação (“betweenness”), sendo estes 69 e 64, respectivamente.

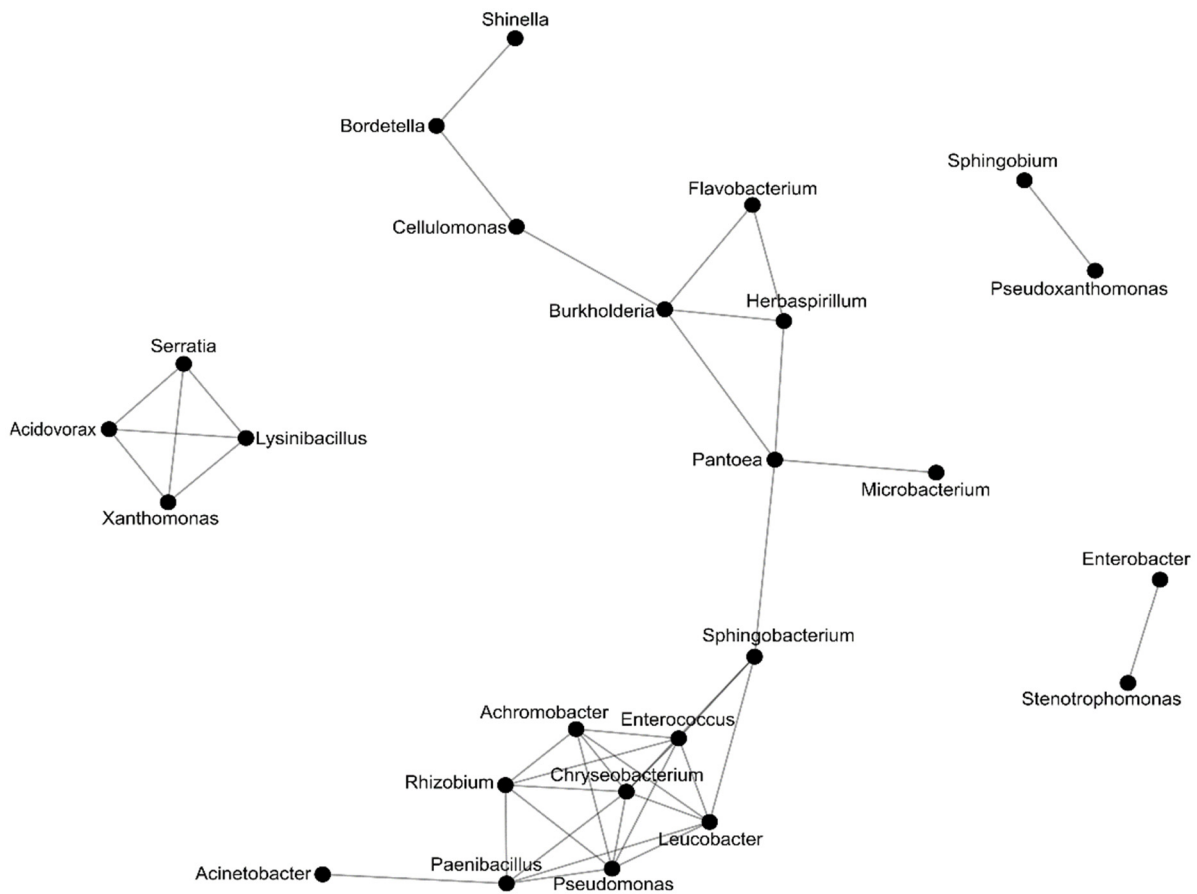


Figura 12. Rede de co-ocorrência dos gêneros baseada nos valores de índice de Jaccard, obtidos nas análises de beta-diversidade. São exibidos apenas ligações com distância máxima de 0,8.

Tabela 17. Valores de centralidade calculados para os gêneros presentes nas 17 comunidades.

Genus	Degree	Closeness	Betweenness	Eigen Centrality
<i>Chryseobacterium</i>	7	0,0042	20,7000	1,0000
<i>Pseudomonas</i>	6	0,0040	1,2000	0,9191
<i>Leucobacter</i>	6	0,0042	16,0000	0,8793
<i>Enterococcus</i>	6	0,0041	10,7000	0,8961
<i>Rhizobium</i>	5	0,0040	1,0000	0,7837
<i>Achromobacter</i>	5	0,0040	0,2000	0,8153
<i>Paenibacillus</i>	5	0,0040	15,2000	0,6745
<i>Sphingobacterium</i>	4	0,0042	64,0000	0,5251
<i>Pantoea</i>	4	0,0042	69,0000	0,1091
<i>Burkholderia</i>	4	0,0041	44,5000	0,0274
<i>Lysinibacillus</i>	3	0,0019	0,0000	0,0003
<i>Serratia</i>	3	0,0019	0,0000	0,0067
<i>Herbaspirillum</i>	3	0,0041	5,5000	0,0266
<i>Acidovorax</i>	3	0,0019	0,0000	0,0072
<i>Xanthomonas</i>	3	0,0019	0,0000	0,0116
<i>Flavobacterium</i>	2	0,0039	0,0000	0,0098
<i>Cellulomonas</i>	2	0,0039	28,0000	0,0052
<i>Bordetella</i>	2	0,0037	15,0000	0,0010
<i>Enterobacter</i>	1	0,0017	0,0000	0,0071
<i>Stenotrophomonas</i>	1	0,0017	0,0000	0,0053
<i>Acinetobacter</i>	1	0,0038	0,0000	0,1228
<i>Sphingobium</i>	1	0,0017	0,0000	0,0047
<i>Microbacterium</i>	1	0,0040	0,0000	0,0199
<i>Pseudoxanthomonas</i>	1	0,0017	0,0000	0,0039
<i>Shinella</i>	1	0,0035	0,0000	0,0002

As análises com PICRUST (Langille et al., 2013) e LEFSe (Segata et al., 2011), usando o banco de dados METACYC (Caspi et al., 2014), retornou 358 vias metabólicas (Figura 13) e a partir dessas foi realizada uma análise comparando três grupos definidos a partir do “ranking”. O primeiro grupo, formado pelas cinco primeiras da lista, foi nomeado como “Top ranked”, o segundo grupo, formado pelas cinco últimas da lista, recebeu o nome de “Bottom ranked”, e o terceiro grupo, formado por aquelas comunidades que ficaram no meio da lista, foi denominado como “Intermediate ranked”, como demonstra a Figura 14.

O gráfico representa o resultado da análise indicando doze vias metabólicas com valores de “Score Linear discriminant analysis (LDA)” acima de 2. Destas, o grupo “Top ranked” apresentou cinco rotas com um “LDA Score” acima de 2.5:

“superpathway of demethylmenaquinol-8 biosynthesis I”, “2-aminophenol degradation”, “UDP-2,3-diacetamido-2,3-dideoxy- α -D-mannuronate biosynthesis”, “mycothiol biosynthesis” e “meta cleavage pathway of aromatic compounds”. Já para o grupo de “Intermediate ranked”, foram encontradas quatro rotas com um “LDA Score” de 3.5: “D-galacturonate degradation I”, “superpathway of sulfate assimilation and cysteine biosynthesis”, “superpathway of L-arginine, putrescine, and 4-aminobutanoate degradation” e “superpathway of L-arginine and L-ornithine degradation”. E finalmente, o grupo “Bottom ranked” apresentou uma única rota metabólica com um LDA Score acima de 2: “acetyl-CoA fermentation to butanoate II”.

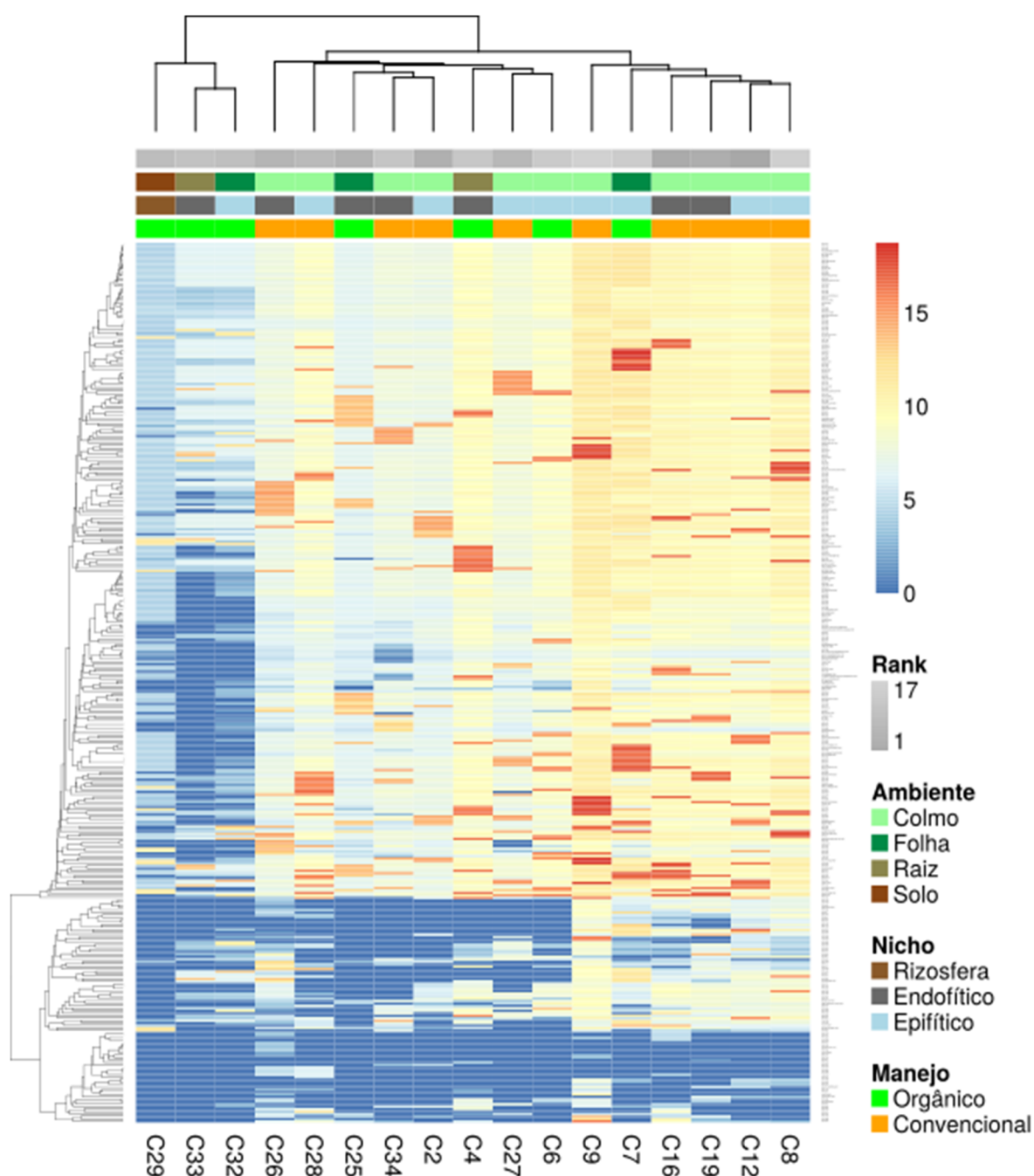


Figura 13. Mapa de calor (“heatmap”) e dendrogramas obtidos a partir dos agrupamentos hierárquicos dos perfis de abundância de vias metabólicas do banco de dados METACYC após análise de predição com PICRUSt. Os agrupamentos hierárquicos tanto dos perfis das comunidades (colunas), como das vias metabólicas (linhas) foram gerados com método de distância Euclidiana e método de ligação pela média.

LEfSe Analysis

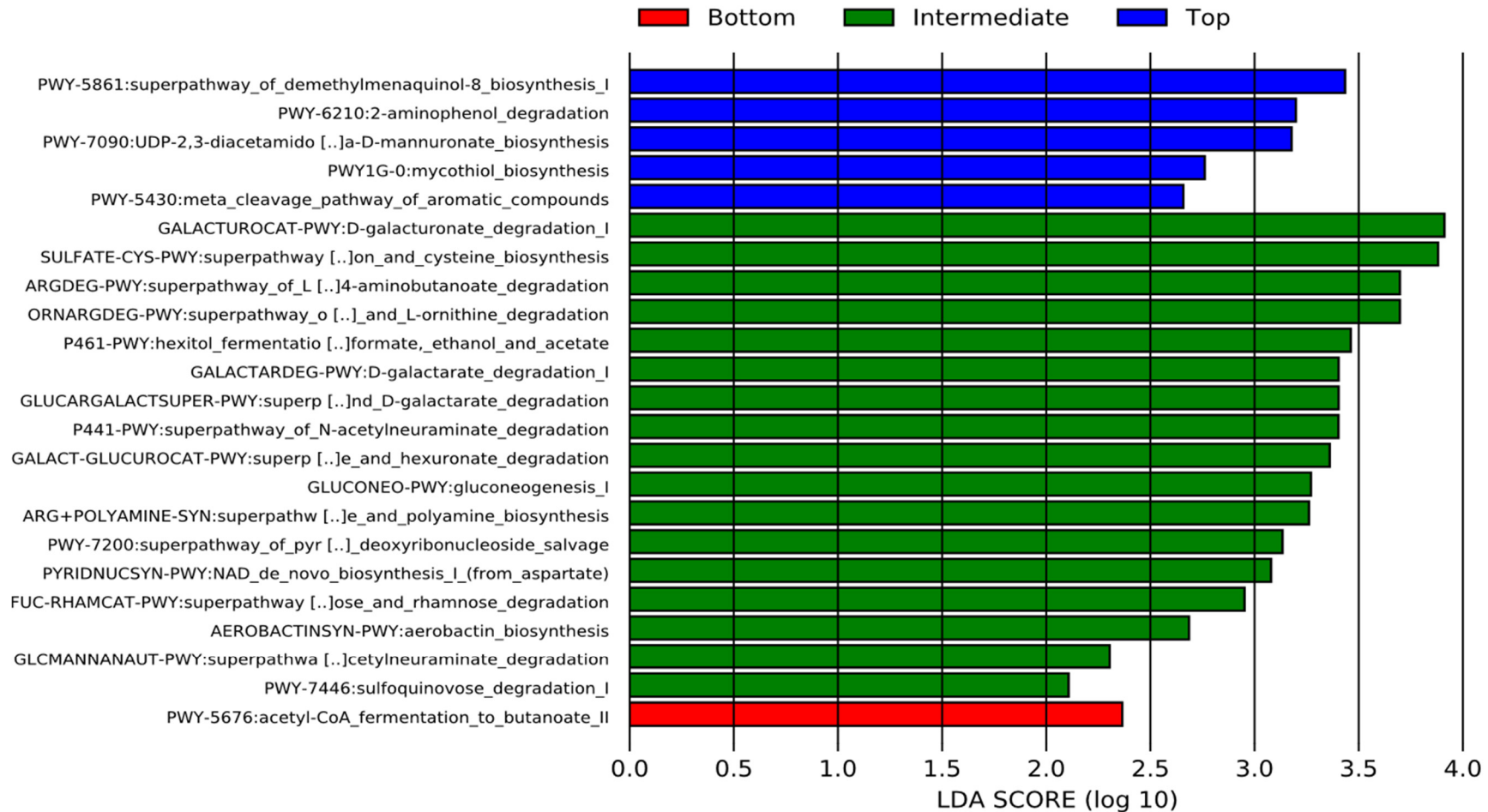


Figura 14. Gráfico de barras que mostra as vias metabólicas mais representativas obtidas a partir das análises com LEfSe entre os três grupos das 17 comunidades selecionadas: “Top Ranked”, “Intermediate” e “Bottom Ranked”.

5. DISCUSSÃO

A metodologia proposta neste trabalho permitiu a recuperação de 944 comunidades de bactérias associadas à cana-de-açúcar, das quais, após um processo de seleção, 17 apresentaram capacidade de promoção de crescimento vegetal em *C. dactylon* e *B. ruziziensis*, além do potencial metabólico variado.

O modelo de prospecção desenvolvido não tem foco num único traço de promoção de crescimento vegetal, e tenta obter o melhor sucesso na recuperação do microbioma cultivável da planta. Porém, é possível aplicá-lo a fim de encontrar um traço específico, fazendo uso de meios seletivos para obter isolados ou comunidades que possuam um potencial fisiológico como, por exemplo, a busca de enzimas ou metabólitos, como tem sido demonstrado em diferentes trabalhos (Alves et al., 2014; Brader et al., 2014; Hermann Desire et al., 2014; Hennessy et al., 2018), considerando primeiro os efeitos da inoculação em plantas assim como o uso de outras plantas modelo.

Apesar da existência de uma alta variedade de meios de cultura usados para isolar microrganismos endofíticos e epifíticos (Johnston-Monje e Raizada, 2011; Baldani et al., 2014; Johnston-Monje et al., 2014; Bertani et al., 2016), nesta metodologia foi proposto o uso de um novo meio de cultura (BRX) que permitiu o crescimento de diversos morfotipos de bactérias heterotróficas em um período de 48 até 72 horas a partir de solo rizosférico ou diferentes tecidos da planta.

As baixas e variadas concentrações de fontes de nitrogênio, como nitrato de amônio, peptona e extrato de levedura, assim como os outros componentes em cada versão do meio BRX, a saber: raiz, colmo e folha triturados, além do xarope como fonte primária de carbono e o extrato de solo como fonte secundária e de minerais e outros cofatores, possibilitaram o crescimento e a recuperação de diversas bactérias de 4 filos (Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes), que foram identificadas nas comunidades selecionadas, além da diversidade de morfotipos encontrados nas demais comunidades que não foram sequenciadas.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que o uso do meio de cultura BRX, tanto na forma sólida (ágar) como na forma líquida (caldo), permitiu a recuperação de

um número importante de comunidades de bactérias a partir da cana-de-açúcar e solo rizosférico.

Já o uso de diversas e variadas fontes de nitrogênio e carbono, em pequenas quantidades em partes de plantas, e o perfil de minerais usado favoreceram o crescimento de bactérias associadas à cana-de-açúcar, o que concorda com o resultados de Medina et al. (Medina et al., 2017), que concluiu que o uso de meios de cultura com baixas concentrações de nutrientes facilitaram o crescimento de taxa bacterianos mais diversos e cresceram comunidades distintas em relação à meios com maiores concentrações de nutrientes.

Além dos componentes de origem vegetal, o meio BRX foi suplementado com extrato de solo, que aportou uma série de substâncias orgânicas incluindo carboidratos, ácidos orgânicos e outros compostos e minerais que melhoraram a recuperação de microrganismos pouco ou dificilmente cultiváveis (Liebeke et al., 2009; Nguyen et al., 2018; Sarhan et al., 2019). O meio de cultura proposto neste trabalho tem o potencial de ser usado na prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas de outras plantas, tanto gramíneas como outros tipos de culturas, plantas medicinais e de ambientes silvestres.

O uso de *C. dactylon* como planta modelo, permitiu observar diferentes tipos de respostas à inoculação, tanto positivas como negativas, considerando que o microbioma de um planta doadora pode ter diferentes efeitos na planta receptora (Rubin et al., 2020). Neste caso, as respostas observadas, permitiram filtrar um número considerável de comunidades, selecionando só aquelas com traços positivos de promoção de crescimento vegetal, e permitindo que este grupo benéfico putativo fosse caracterizado bioquímica e fisiologicamente. O anterior, permitiu reduzir o número total de testes e recursos do laboratório, além de serem testados posteriormente, em outra planta modelo. Recentemente, outros modelos ou protocolos para prospecção de bactérias endofíticas e epifíticas, através de isolamento e teste em plantas, têm sido propostos, mas estes não têm foco em comunidades mas sim, em isolados (Balsanelli et al., 2019).

A grama bermuda (*C. dactylon*) já tinha sido usada em estudos anteriores, moleculares (Wang et al., 2009, 2013), de fertilização (Zanardo et al., 2018), estudos de inoculação (Verma et al., 2018a; White et al., 2018), assim como estudos cujo objetivo era caracterizar a microbiota associada à esta grama (Elliott e Des Jardin, 1999). Até o momento, não tem sido identificado estudo algum onde essa planta tenha

sido usada para triagem em larga escala de comunidades de bactérias em busca de traços de promoção de crescimento vegetal.

A partir dos resultados obtidos de prospecção da promoção de crescimento em *B. ruzizensis*, da quantificação de traços de promoção de crescimento e testes fisiológicos, foi estabelecido um “ranking”, que permitiu classificar as comunidades com alto potencial. De acordo com esse “ranking”, concluiu-se que tecidos como colmo e folha, possuem um potencial de abrigar comunidades epifíticas e endofíticas associadas a estes tecidos com características de promoção de crescimento vegetal. Estes resultados podem ser explorado em outros estudos, já que, tradicionalmente, os estudos de prospecção de microrganismos com traços funcionais, tais como fixação de nitrogênio, solubilização de fosfatos, síntese de fitormônios entre outros, têm se orientado principalmente à prospecção a partir de tecidos como raízes, tanto endofíticos como rizosféricos (Baldani et al., 2014; Szilagyi-Zecchin et al., 2014; Kumar Meena et al., 2015; Joe et al., 2016). No entanto, no presente estudo, apesar de incluir a rizosfera e a endosfera de raiz na prospecção de comunidades de bactérias com capacidade para promover o crescimento de plantas, apenas três comunidades, das 17 selecionadas nas etapas finais, provêm da raiz ou da rizosfera, ambos casos de cana-de-açúcar orgânica.

A expectativa inicial deste trabalho estava orientada, de modo geral, a encontrar um maior número de comunidades promotoras de crescimento vegetal, como endofíticos de raiz e no ambiente rizosférico da cana-de-açúcar pelo fato destes ambientes terem um maior número e diversidade de microrganismos associados (Lei et al., 2019). Além disso, também havia uma expectativa de que poderia haver uma possível influência do manejo agrônômico, como no caso do manejo orgânico, no qual, de modo geral, os solos apresentam maior conteúdo de matéria orgânica e menor perda de nutrientes (Tuomisto et al., 2012; Schipanski et al., 2017).

No decorrer deste trabalho, também foram obtidos resultados inesperados, pois, das 17 comunidades selecionadas, 11 foram prospectadas a partir de colmo, e das 5 cinco que formaram o grupo "Top ranked", 4 delas provieram de colmo convencional e apenas uma proveio de folha orgânica, quando considerada a análise de enriquecimento, que demonstrou que as comunidades selecionadas vieram principalmente de colmo, ainda mais epifítico e de cana-de-açúcar convencional.

A caracterização bioquímica e funcional das comunidades feita neste trabalho permitiu a observação de perfis metabólicos que podem ter diferentes papéis na planta dependendo das condições da cultura e do ambiente, como no caso da capacidade de tolerar altas concentrações de NaCl, expressar a enzima ACC-desaminase, produzir sideróforos, solubilizar P e Zn ou metabolizar um número diverso de carboidratos. Outras características permitiriam, de forma hipotética, ajudar a planta no crescimento e desenvolvimento, absorção de nutrientes e tolerância em condições de estresse abiótico (Bacon e White, 2016) como no caso da habilidade de colonizar raízes e superfícies pela produção de biofilme (Edwards et al., 2015), ou a produção de quitinase, associada aos métodos indiretos de controle biológico de fungos e insetos (Liotti et al., 2018).

As análises de predição metabólica revelam também um alto potencial e, no caso das análises nos diferentes grupos com LEfSe (Segata et al., 2011), destacou-se o grupo "Top ranked" que demonstrou cinco rotas, das quais três são biosintéticas para menaquinona, micothiol e carboidratos ligados à UDP, moléculas ligadas a cadeia respiratória, síntese de antioxidantes e compostos de parede celular (Bueno et al., 2012; Müller et al., 2016) e as outras duas são rotas de degradação de compostos aromáticos como benzeno e 2-aminofenol, que são poluentes e podem ser encontrados em produtos de uso na agricultura. Estas rotas têm sido reportadas em bactérias associadas às plantas e solo (Sala-trepat e Evans, 1971; Hughes e Bayly, 1983; Takenaka et al., 1997; Xu et al., 2003).

Um outro fato inesperado, foi o gene *nifH* ser encontrado somente em duas das 17 comunidades nas condições testadas. No entanto, a capacidade de fixação de nitrogênio seria melhor evidenciada a partir de crescimento em meios livres de nitrogênio (Baldani et al., 2014) e o teste de redução de acetileno (Szilagyi-Zecchin et al., 2014), pois segundo Islam et al. (2007), a incapacidade de detectar a presença de genes *nif* e *nod* em bactérias com atividade de fixação de N₂, pode ser explicada pela presença de genes distantes aos *nif* e possíveis mecanismos não detectados (Islam et al., 2007).

A capacidade de metabolizar quase todos os carboidratos do API 50 CH pode ser considerado um bom indicador, pois no caso de inocular estas comunidades na rizosfera de culturas, além de promover o crescimento da planta pela presença de traços de promoção de crescimento vegetal, poderiam potencialmente aproveitar os exsudados da raiz como substratos e competir nutricionalmente, pois no caso de

algumas plantas como milho, os exsudados das raízes são principalmente solúveis em água, e destes, 64% correspondem a carboidratos (Hütsch et al., 2002).

As análises de abundância e prevalência de gêneros permitiram identificar a predominância dos que poderiam atuar de um modo direto ou indireto na promoção de crescimento, uma vez que essa prevalência aparece em comunidades que já passaram pelo processo de triagem. Além dos mecanismos diretos, no caso de uma ação indireta, considerou-se a possibilidade de estarem interagindo em prol de benefícios mútuos e com o hospedeiro.

As possíveis interações foram investigadas por meio de uma rede de co-ocorrência construída a partir dos dados referentes às 17 comunidades. Nessa rede de co-ocorrência e em suas métricas de centralidade foi possível observar que o gênero com maior grau de centralidade foi o *Chryseobacterium* (“eigen centrality” = 1), que foi considerado um elemento central da rede e pelas evidências, pode ser considerado um elemento agregador devido à sua capacidade de promoção de crescimento já identificada (Chen et al., 2006). Esse gênero foi identificado como parte das comunidades associadas a milho (Niu et al., 2017), abacate e capacidade de controle biológico (Tzec-Interián et al., 2020). Também foi reportado com a capacidade de interagir com outras bactérias em casos de co-inoculação como tem sido demonstrado em alguns trabalhos (Estévez et al., 2009).

Outros dois gêneros com alto grau de centralidade e que fizeram parte das subredes identificadas foram *Pseudomonas* e *Leucobacter* que foram previamente reportados como promotores de crescimento vegetal em alface (Cipriano et al., 2016) e batata (Behrendt et al., 2008), com atividade de indução de resistência sistêmica contra fitopatógenos em arroz no caso de *Pseudomonas* (De Vleeschauwer et al., 2008) e promoção de crescimento vegetal em cana-de-açúcar em ambos gêneros (Solanki et al., 2017).

Dos ASVs com atribuição de gênero, alguns deles estão associados a processos de promoção de crescimento em plantas como no caso dos gêneros *Bacillus* e *Rhizobium* (Patel et al., 2019).

Outros gêneros identificados possuem traços específicos como fixação de nitrogênio em *Paenibacillus* (Liu et al., 2019), tolerância a salinidade em culturas por *Sphingobacterium* (Vaishnav et al., 2020), produção de bioestimulantes, como peptídeos de baixo peso molecular (Yakhin et al., 2017), fitormônios e compostos voláteis e com atividade antimicrobiana (Cordovez et al., 2018).

Adicionalmente os gêneros *Pseudoxanthomonas*, *Pantoea*, *Leucobacter*, *Lysinibacillus*, *Kosakonia*, *Lactococcus*, e *Microbacterium*, possuem capacidade de controle biológico (Naureen et al., 2017; Jiang et al., 2018; Singh e Dubey, 2018; Cherif-Silini et al., 2019), ou incremento da biomassa no caso de *Neorhizobium* (Wang et al., 2016).

Por outro lado, a rizosfera e diversos tecidos da planta têm sido identificados como reservatório de espécies com capacidade de promoção de crescimento e antagonismo contra fitopatógenos, mas também como responsáveis por infecções oportunistas em humanos, apresentando um comportamento bivalente, no qual um mesmo microrganismo pode ter ambos, plantas e humanos, como hospedeiros (Berg et al., 2005; Berg e Martinez, 2015).

Dentre estes gêneros, *Serratia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* e *Burkholderia* (Mitter et al., 2013; da Silva et al., 2015; Barra et al., 2016; Caneschi et al., 2018) foram identificados como parte deste estudo, e no caso do gênero *Stenotrophomonas*, foram identificadas duas espécies: *S. rhizophila* e *S. maltophilia*. A primeira tem sido reportada como endofítico promotor de crescimento e produtor de biofilme que carece de fatores de virulência (Ren et al., 2014), e no caso de *S. maltophilia* é considerada uma espécie patogênica causadora de infecções em humanos (Alavi et al., 2014).

Finalmente, este trabalho destaca uma metodologia de prospecção de bactérias na forma de comunidades a fim de aproveitar as relações mutualísticas que podem existir entre os microrganismos e o hospedeiro, fazendo uma triagem em plantas em larga escala como uma alternativa a metodologias clássicas de isolados e busca de traços específicos de promoção de crescimento. A metodologia utilizada apresenta vantagens como a recuperação de um número maior de microrganismos, triagem para seleção dos melhores candidatos e a possibilidade de encontrar diferentes perfis metabólicos que possam ser usados em diferentes estudos que derivam do trabalho inicial. É possível, a partir das evidências aqui encontradas outros estudos realizarem uma investigação mais profunda sobre as interações reportadas e compreender essas interações.

6. CONCLUSÕES

A prospecção de microrganismos na forma de comunidades e triagem em planta em larga escala é apresentada como uma alternativa a metodologias clássicas de isolamento de microrganismos individuais e caracterização bioquímica em busca de traços de promoção de crescimento, pois apresenta vantagens como a recuperação de um número maior de microrganismos, preservação das relações de sinergia entre as bactérias, triagem para seleção dos melhores candidatos e a possibilidade de encontrar diferentes perfis metabólicos que possam ser usados em diferentes estudos que derivam do trabalho inicial.

Os resultados obtidos a partir da prospecção *in planta* permitiu encontrar e selecionar um grupo de comunidades que inicialmente apresentam aumento da germinação na planta *C. dactylon* e aumento da biomassa quando inoculadas em *B. ruziziensis*, e perfilam a *C. dactylon* como potencial planta modelo para triagem de comunidades de bactérias promotoras de crescimento vegetal (“Plant Growth-Promoting Bacteria” - PGPB).

O perfil fenotípico das comunidades mostrou a presença de traços de promoção de crescimento vegetal em níveis variáveis, principalmente na produção de ACC-desaminase, AIA, biofilme, sideróforos quitinase, e a capacidade de solubilizar fosfatos, assim como a presença de genes *nifH*. Algumas destas comunidades apresentam capacidades fisiológicas interessantes como a tolerância a altas concentrações de NaCl e glicerol.

Além disso, foi observado um maior enriquecimento de comunidades epifíticas de colmo sob cultivo convencional, pelo qual este ambiente pode ser considerado como reservatório de bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas à cana-de-açúcar.

As análises de dados de sequenciamento da região V3–V4, na plataforma Illumina, mostraram um total de 174 ASVs, distribuídos em um total de 34 gêneros e 24 espécies, nas 17 comunidades selecionadas com o melhor perfil de promoção de crescimento.

Da classificação no “ranking” destas comunidades, as primeiras 5 selecionadas, a partir de uma classificação baseada na promoção de crescimento vegetal e traços

funcionais e bioquímicos, possuíam uma alta diversidade de espécies, assim como espécies compartilhadas e quatro espécies únicas no caso da comunidade C28.

Os gêneros identificados neste trabalho também correspondem aos gêneros identificados no "core microbiome" da cana-de-açúcar reconhecido em trabalhos previos. Além disso a maior parte de espécies e gêneros tem sido reportadas como exclusivamente associadas às plantas, assim como também podem ser consideradas como colonizadores robustos dos tecidos da planta. Dessa forma, as comunidades identificadas podem ser exploradas a fim de constituírem bioinoculantes para culturas.

Como perspectiva futura, aponta-se a necessidade de realizar experimentos de isolamento das espécies que compõem as comunidades prospectadas, a fim de caracterizá-las quanto à promoção de crescimento de forma individual e fazendo parte de comunidades sintéticas ou consórcios. Dessa forma, poderíamos confirmar se há sinergia ou não entre microrganismos e essa informação seria extremamente útil na formulação de inoculantes ou co-inoculantes.

7. REFERÊNCIAS

Abhilash, P.C.C., Dubey, R.K., Tripathi, V., Gupta, V.K. e Singh, H.B. (2016). Plant Growth-Promoting Microorganisms for Environmental Sustainability. **Trends in Biotechnology** 34: 847–850.

Agler, M.T., Ruhe, J., Kroll, S., Morhenn, C., Kim, S.T., Weigel, D. e Kemen, E.M. (2016). Microbial Hub Taxa Link Host and Abiotic Factors to Plant Microbiome Variation. **PLoS Biology**. Public Library of Science 14: e1002352.

Ahmad, M., Zahir, Z.A., Asghar, H.N. e Arshad, M. (2012). The combined application of rhizobial strains and plant growth promoting rhizobacteria improves growth and productivity of mung bean (*Vigna radiata* L.) under salt-stressed conditions. **Annals of Microbiology** 62: 1321–1330.

Al Shaer, D., Al Musaimi, O., de la Torre, B.G. e Albericio, F. (2020). Hydroxamate siderophores: Natural occurrence, chemical synthesis, iron binding affinity and use as Trojan horses against pathogens. **European Journal of Medicinal Chemistry**. Elsevier Masson SAS.

Alavi, P., Starcher, M.R., Thallinger, G.G., Zachow, C., Müller, H. e Berg, G. (2014). *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. **BMC Genomics**. BioMed Central Ltd. 15: 482.

Alnahhas, R.N., Sadeghpour, M., Chen, Y., Frey, A.A., Ott, W., Josić, K. e Bennett, M.R. (2020). Majority sensing in synthetic microbial consortia. **Nature Communications**. Nature Research 11:.

Alves, L.D.F., Westmann, C.A., Lovate, G.L., De Siqueira, G.M.V., Borelli, T.C. e Guazzaroni, M.E. (2018). Metagenomic Approaches for Understanding New Concepts in Microbial Science. **International Journal of Genomics**. Hindawi Limited.

Alves, P.D.D., Siqueira, F. de F., Facchin, S., Horta, C.C.R., Victória, J.M.N. e Kalapothakis, E. (2014). Survey of Microbial Enzymes in Soil, Water, and Plant Microenvironments. **The Open Microbiology Journal**. Bentham Science Publishers Ltd. 8: 25–31.

Ambrosini, A. e Passaglia, L.M.P. (2017). Plant Growth–Promoting Bacteria (PGPB): Isolation and Screening of PGP Activities. **Current Protocols in Plant Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. 2: 190–209.

Andreote, F.D., Azevedo, J.L. e Araújo, W.L. (2009). Avaliação da diversidade de comunidades bacterianas associadas às plantas. **Brazilian Journal of Microbiology**. Sociedade Brasileira de Microbiologia.

Andrews, S. (2010). FastQC - A quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. **Babraham Bioinformatics**. Babraham Bioinf.

Angel, R., Nepel, M., Panhölzl, C., Schmidt, H., Herbold, C.W., Eichorst, S.A. e Woebken, D. (2018). Evaluation of Primers Targeting the Diazotroph Functional Gene and Development of NifMAP – A Bioinformatics Pipeline for Analyzing nifH Amplicon Data. **Frontiers in Microbiology** 9:.

Arkhipova, T.N., Veselov, S.U., Melentiev, A.I., Martynenko, E. V. e Kudoyarova, G.R. (2005). Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. **Plant and Soil**. Springer 272: 201–209.

Armanhi, J.S.L., de Souza, R.S.C., Damasceno, N. de B., de Araújo, L.M., Imperial, J. e Arruda, P. (2018). A Community-Based Culture Collection for Targeting Novel Plant Growth-Promoting Bacteria from the Sugarcane Microbiome. **Frontiers in Plant Science**. Frontiers 8: 2191.

Armanhi, J.S.L., de Souza, R.S.C., de Araujo, L.M., Okura, V.K., Mieczkowski, P., Imperial, J. e Arruda, P. (2016). Multiplex amplicon sequencing for microbe identification in community- based culture collections. **Scientific Reports**. Nature Publishing Group 6: 1–9.

Atlas, R. (2010). **Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition**. **Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition**.

Backer, R., Rokem, J.S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S. e Smith, D.L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**. Frontiers Media S.A.

Bacon, C.W. e Hinton, D.M. (2006). Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. **Plant-Associated Bacteria**. Springer Netherlands, p. 155–194.

Bacon, C.W. e White, J.F. (2016). Functions, mechanisms and regulation of endophytic and epiphytic microbial communities of plants. **Symbiosis**. Springer Netherlands 68: 87–98.

Baetz, U. e Martinoia, E. (2014). Root exudates: The hidden part of plant defense. **Trends in Plant Science** 19: 90–98.

Baldani, J.I. e Baldani, V.L.D. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias** 77: 549–579.

Baldani, J.I., Reis, V.M., Videira, S.S., Boddey, L.H. e Baldani, V.L.D. (2014). The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil** 384: 413–431.

Balsanelli, E., Pankievicz, V.C., Baura, V.A., de Oliveira Pedrosa, F. e de Souza, E.M. (2019). A new strategy for the selection of epiphytic and endophytic bacteria for enhanced plant performance. **Methods in Molecular Biology**. Humana Press Inc., p. 247–256.

Banerjee, S., Schlaeppli, K. e van der Heijden, M.G.A. (2018). Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. **Nature Reviews Microbiology**. Springer US 16: 567–576.

Barbehenn, V.R., Karowe, D.N., Spickard, A., Barbehenn, R. V., Karowe, D.N., Spickard, A., Barbehenn, V.R., Karowe, D.N. e Spickard, A. (2004). Effects of elevated atmospheric CO₂ on the nutritional ecology of C₃ and C₄ grass-feeding caterpillars. **Oecologia** 140: 86–95.

Barra, P.J., Inostroza, N.G., Acuña, J.J., Mora, M.L., Crowley, D.E. e Jorquera, M.A. (2016). Formulation of bacterial consortia from avocado (*Persea americana* Mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress. **Applied Soil Ecology**. Elsevier B.V. 102: 80–91.

Bashan, Y., Kamnev, A.A. e de-Bashan, L.E. (2013). Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: A proposal for an alternative procedure. **Biology and Fertility of Soils**. Springer-Verlag 49: 465–479.

Batista, B.D., Lacava, P.T., Ferrari, A., Teixeira-Silva, N.S., Bonatelli, M.L., Tsui, S., Mondin, M., Kitajima, E.W., et al. (2018). Screening of tropically derived, multi-trait plant growth- promoting rhizobacteria and evaluation of corn and soybean colonization ability. **Microbiological Research** 206: 33–42.

Behrendt, U., Ulrich, A. e Schumann, P. (2008). *Leucobacter tardus* sp. nov., isolated from the phyllosphere of *Solanum tuberosum* L. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. Microbiology Society 58: 2574–2578.

Berendsen, R.L., Pieterse, C.M.J. e Bakker, P.A.H.M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**. Elsevier 17: 478–486.

Berg, G., Eberl, L. e Hartmann, A. (2005). The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. **Environmental Microbiology**. John Wiley & Sons, Ltd 7: 1673–1685.

Berg, G. e Martinez, J.L. (2015). Friends or foes: can we make a distinction between beneficial and harmful strains of the *Stenotrophomonas maltophilia* complex?. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A. 6:.

Bertani, I., Abbruscato, P., Piffanelli, P., Subramoni, S. e Venturi, V. (2016). Rice bacterial endophytes: Isolation of a collection, identification of beneficial strains and microbiome analysis. **Environmental Microbiology Reports** 8: 388–398.

Bhattacharyya, P.N. e Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 28: 1327–1350.

Bhatti, F., Asad, S., Khan, Q.M., Mobeen, A., Iqbal, M.J. e Asif, M. (2019). Risk assessment of genetically modified sugarcane expressing AVP1 gene. **Food and Chemical Toxicology**. Elsevier Ltd 130: 267–275.

Bikel, S., Valdez-Lara, A., Cornejo-Granados, F., Rico, K., Canizales-Quinteros, S., Soberón, X., Del Pozo-Yauner, L. e Ochoa-Leyva, A. (2015). Combining metagenomics, metatranscriptomics and viromics to explore novel microbial interactions: towards a systems-level understanding of human microbiome. **Computational and structural biotechnology journal**. Elsevier 13: 390–401.

Bodor, A., Bounedjoum, N., Vincze, G.E., Erdeiné Kis, Á., Laczi, K., Bende, G., Szilágyi, Á., Kovács, T., et al. (2020). Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**. Springer 19: 1–22.

Borges, B.M.M.N., Strauss, M., Camelo, P.A., Sohi, S.P. e Franco, H.C.J. (2020). Re-use of sugarcane residue as a novel biochar fertiliser - Increased phosphorus use efficiency and plant yield. **Journal of Cleaner Production**. Elsevier Ltd 262: 121406.

Boyd, M.A., Antonio, M.A.D. e Hillier, S.L. (2005). Comparison of API 50 CH Strips to Whole-Chromosomal DNA Probes for Identification of *Lactobacillus* Species. **Journal of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology (ASM) 43: 5309–5311.

Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F. e Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. **Current Opinion in Biotechnology** 27: 30–37.

Bueno, E., Mesa, S., Bedmar, E.J., Richardson, D.J. e Delgado, M.J. (2012). Bacterial Adaptation of Respiration from Oxic to Microoxic and Anoxic Conditions: Redox Control. **Antioxidants & Redox Signaling** 16: 819–852.

Bukin, Y.S., Galachyants, Y.P., Morozov, I. V., Bukin, S. V., Zakharenko, A.S. e Zemskaya, T.I. (2019). The effect of 16s rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. **Scientific Data**. Nature Publishing Groups 6: 1–14.

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E.V.L., Schulze-Lefert, P., van Themaat, E.V.L., Schulze-Lefert, P., van Themaat, E.V.L., et al. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**. Annual Reviews 64: 807–838.

Burke, C., Kjelleberg, S. e Thomas, T. (2009). Selective extraction of bacterial DNA from the surfaces of macroalgae. **Applied and Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology (ASM) 75: 252–256.

Burketova, L., Trda, L., Ott, P.G. e Valentova, O. (2015). Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens. **Biotechnology Advances** 33: 994–1004.

Calhoun, P. (2015). Exact: Unconditional Exact Test.

Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A. e Holmes, S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods** 13: 581–583.

Camargo, J.M.O., Gallego-Ríos, J.M., Neto, A.M.P., Antonio, G.C., Modesto, M. e Leite, J.T.C. (2020). Characterization of sugarcane straw and bagasse from dry cleaning system of sugarcane for cogeneration system. **Renewable Energy**. Elsevier Ltd 158: 500–508.

Caneschi, W.L., Felestrino, É.B., Fonseca, N.P., Villa, M.M., Lemes, C.G. d. C., Cordeiro, I.F., Assis, R. de A.B.B., Sanchez, A.B., et al. (2018). Brazilian ironstone plant communities as reservoirs of culturable bacteria with diverse biotechnological potential. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers 9: 1638.

Cardona, C.A., Quintero, J.A. e Paz, I.C. (2010). Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology** 101: 4754–4766.

Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C.A., Holland, T.A., Keseler, I.M., et al. (2014). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. **Nucleic Acids Research**. Oxford Academic 42: D459–D471.

Castro-González, R., Martínez-Aguilar, L., Ramírez-Trujillo, A., Estrada-de los Santos, P., Caballero-Mellado, J., los Santos, P. e Caballero-Mellado, J. (2011). High diversity of culturable Burkholderia species associated with sugarcane. **Plant and Soil** 345: 155–169.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. e Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**. Elsevier 69: 330–339.

Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. e Young, C.C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied Soil Ecology** 34: 33–41.

Cherif-Silini, H., Thissera, B., Bouket, A.C., Saadaoui, N., Silini, A., Eshelli, M., Alenezi, F.N., Vallat, A., et al. (2019). Durum wheat stress tolerance induced by endophyte pantoea agglomerans with genes contributing to plant functions and secondary metabolite Arsenal. **International Journal of Molecular Sciences**. MDPI AG 20:.

Choudhary, D.K., Prakash, A. e Johri, B.N. (2007). Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. **Indian Journal of Microbiology** 47: 289–297.

Cipriano, M.A.P., Lupatini, M., Lopes-Santos, L., da Silva, M.J., Roesch, L.F.W., Destéfano, S.A.L., Freitas, S.S. e Kuramae, E.E. (2016). Lettuce and rhizosphere microbiome responses to growth promoting Pseudomonas species under field conditions. **FEMS Microbiology Ecology** 92: fiw197.

Cordovez, V., Schop, S., Hordijk, K., de Boulois, H.D., Coppens, F., Hanssen, I., Raaijmakers, J.M. e Carrión, V.J. (2018). Priming of plant growth promotion by volatiles of root-associated Microbacterium spp. **Applied and Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology 84:.

Da Costa, P.B., Granada, C.E., Ambrosini, A., Moreira, F., De Souza, R., Dos Passos, J.F.M., Arruda, L. e Passaglia, L.M.P. (2014). A model to explain plant growth promotion traits: A multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. **PLoS ONE**. Public Library of Science 9:.

da Silva, J.M., dos Santos, T.M.C., de Albuquerque, L.S., Montaldo, Y.C., de Oliveira, J.U.L., da Silva, S.G.M., Nascimento, M.S. e Teixeira, R. da R.O. (2015). Potential of the endophytic bacteria (*Herbaspirillum* spp. and *Bacillus* spp.) to promote sugarcane growth. **Australian Journal of Crop Science** 9: 754–760.

da Silveira, A.P.D., Iório, R. de P.F., Marcos, F.C.C., Fernandes, A.O., de Souza, S.A.C.D., Kuramae, E.E. e Cipriano, M.A.P. (2019). Exploitation of new endophytic bacteria and their ability to promote sugarcane growth and nitrogen nutrition. **Antonie van Leeuwenhoek**. Springer Netherlands 112: 283–295.

Davis, D., Malone, S. e Lovell, C. (2018). Responses of Salt Marsh Plant Rhizosphere Diazotroph Assemblages to Drought. **Microorganisms**. MDPI AG 6: 27.

de Souza, R., Ambrosini, A. e Passaglia, L.M.P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**. Sociedade Brasileira de Genética 38: 401–419.

de Souza, R.S.C., Armanhi, J.S.L., Damasceno, N. de B., Imperial, J. e Arruda, P. (2019). Genome Sequences of a Plant Beneficial Synthetic Bacterial Community Reveal Genetic Features for Successful Plant Colonization. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers 10: 1779.

de Souza, R.S.C., Okura, V.K., Armanhi, J.S.L., Jorrín, B., Lozano, N., da Silva, M.J., González-Guerrero, M., de Araújo, L.M., et al. (2016). Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**. Nature Publishing Group 6: 28774.

De Vleeschauwer, D., Djavaheri, M., Bakker, P.A.H.M.H.M. e Hofte, M. (2008). *Pseudomonas fluorescens* WCS374r-Induced Systemic Resistance in Rice against *Magnaporthe oryzae* Is Based on Pseudobactin-Mediated Priming for a Salicylic Acid-Repressible Multifaceted Defense Response. **Plant Physiology** 148: 1996–2012.

Dimkpa, C. (2016). Microbial siderophores: Production, detection and application in agriculture and environment. **Endocytobiosis and Cell Research** 27: 7–16.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A. e Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**. Springer 212: 155–164.

Dormontt, E.E., van Dijk, K.J., Bell, K.L., Biffin, E., Breed, M.F., Byrne, M., Caddy-Retalic, S., Encinas-Viso, F., et al. (2018). Advancing DNA barcoding and metabarcoding applications for plants requires systematic analysis of herbarium collections-an Australian perspective. **Frontiers in Ecology and Evolution**. Frontiers Media S.A. 6: 134.

Edgar, R.C. (2013). UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. **Nature Methods**. Nature Research 10: 996–998.

Edwards, J., Johnson, C., Santos-Medellín, C., Lurie, E., Podishetty, N.K., Bhatnagar, S., Eisen, J.A., Sundaresan, V. e Jeffery, L.D. (2015). Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. National Academy of Sciences 112: E911–E920.

Egamberdieva, D., Wirth, S.J., Shurigin, V.V., Hashem, A. e Abd Allah, E.F. (2017). Endophytic bacteria improve plant growth, symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and induce suppression of root rot caused by *Fusarium solani* under salt stress. **Frontiers in Microbiology** 8: 1887.

El-Sayed, W.S., Akhkha, A., El-Naggar, M.Y. e Elbadry, M. (2014). In vitro antagonistic activity, plant growth promoting traits and phylogenetic affiliation of rhizobacteria associated with wild plants grown in arid soil. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media SA 5: 651.

Elliott, M.. L. e Des Jardin, E.. A. (1999). Comparison of media and diluents for enumeration of aerobic bacteria from Bermuda grass golf course putting greens. **Journal of Microbiological Methods** 34: 193–202.

Epstein, S.S. (2013). The phenomenon of microbial uncultivability. **Current Opinion in Microbiology**. Elsevier Current Trends.

Estévez, J., Dardanelli, M.S., Megías, M. e Rodríguez-Navarro, D.N. (2009). Symbiotic performance of common bean and soybean co-inoculated with rhizobia and *Chryseobacterium balustinum* Aur9 under moderate saline conditions. **Symbiosis**. Springer 49: 29–36.

Fadrosh, D.W., Ma, B., Gajer, P., Sengamalay, N., Ott, S., Brotman, R.M. e Ravel, J. (2014). An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. **Microbiome**. BioMed Central 2: 6.

Fasciglione, G., Casanovas, E.M., Quillehauquy, V., Yommi, A.K., Goñi, M.G., Roura, S.I. e Barassi, C.A. (2015). Azospirillum inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae** 195: 154–162.

Gaby, J.C. e Buckley, D.H. (2012). A Comprehensive Evaluation of PCR Primers to Amplify the nifH Gene of Nitrogenase. **PLoS ONE** 7: e42149.

Ghani, A., Dexter, M. e Perrott, K.W. (2003). Hot-water extractable carbon in soils: A sensitive measurement for determining impacts of fertilisation, grazing and cultivation. **Soil Biology and Biochemistry** 35: 1231–1243.

Gillis, M., Kersters, K., Hoste, B., Janssens, D., Kroppenstedt, R.M., Stephan, M.P., Teixeira, K.R.S., Dobereiner, J., et al. (1989). *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. **International Journal of Systematic Bacteriology** 39: 361–364.

Glick, B.R. (2005). Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters** 251: 1–7.

Gnanamanickam, S.S. e Immanuel, J.E. (2006). Epiphytic bacteria, their ecology and functions. **Plant-Associated Bacteria**. Springer Netherlands, p. 131–153.

Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., et al. (2010). Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. **Science** 327: 812–818.

Gómez Ramírez, M., Rojas Avelizapa, L.I., Rojas Avelizapa, N.G. e Cruz Camarillo, R. (2004). Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue R®, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. **Journal of Microbiological Methods**. Elsevier 56: 213–219.

Haggag, W.M. e Timmusk, S. (2008). Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* initiates biocontrol against crown rot disease. **Journal of Applied Microbiology** 104: 961–969.

Haney, C.H., Samuel, B.S., Bush, J. e Ausubel, F.M. (2015). Associations with rhizosphere bacteria can confer an adaptive advantage to plants. **Nature Plants**. Springer Science and Business Media LLC 1:.

Hartman, K., van der Heijden, M.G.A.A., Wittwer, R.A., Banerjee, S., Walser, J.C. e Schlaeppi, K. (2018). Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. **Microbiome**. BioMed Central Ltd. 6: 14.

Hassani, M.A., Durán, P. e Hacquard, S. (2018). Microbial interactions within the plant holobiont. **Microbiome**. NLM (Medline) 6: 58.

Heckman, J. (2006). A history of organic farming: Transitions from Sir Albert Howard's War in the Soil to USDA National Organic Program. **Renewable Agriculture and Food Systems**. Cambridge University Press 21: 143–150.

Hennessey, R.C., Jørgensen, N.O.G., Scavenius, C., Enghild, J.J., Greve-Poulsen, M., Sørensen, O.B. e Stougaard, P. (2018). A screening method for the isolation of bacteria capable of degrading toxic steroidal glycoalkaloids present in potato. **Frontiers in Microbiology** 9:.

Hermann Desire, M., Bernard, F., Rosaline Forsah, M., Thaddeus Assang, C. e Ndoumou Denis, O. (2014). Enzymes and qualitative phytochemical screening of endophytic fungi isolated from *Lantana camara* Linn. Leaves. **Journal of Applied Biology & Biotechnology** 2: 1–006.

Hoagland, D.R. e Arnon, D.I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular** 347: 1–32.

Howard, A. (1943). **An agricultural testament**. Oxford: Oxford University Press.

Huang, K., Jiang, Q., Liu, L., Zhang, S., Liu, C., Chen, H., Ding, W. e Zhang, Y. (2020). Exploring the key microbial changes in the rhizosphere that affect the occurrence of tobacco root-knot nematodes. **AMB Express**. Springer 10: 72.

Hughes, E.J.L.L. e Bayly, R.C. (1983). Control of catechol meta-cleavage pathway in *Alcaligenes eutrophus*. **Journal of Bacteriology**. J Bacteriol 154: 1363–1370.

Hütsch, B.W., Augustin, J. e Merbach, W. (2002). Plant rhizodeposition — an important source for carbon turnover in soils. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science** 165: 397.

Islam, M.S., Kawasaki, H., Nakagawa, Y., Hattori, T. e Seki, T. (2007). *Labrys okinawensis* sp. nov. and *Labrys miyagiensis* sp. nov., budding bacteria isolated from rhizosphere habitats in Japan, and emended descriptions of the genus *Labrys* and *Labrys monachus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 57: 552–557.

Janda, J.M. e Abbott, S.L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls. **Journal of Clinical Microbiology**. J Clin Microbiol.

Jiang, Z.K., Tuo, L., Huang, D.L., Osterman, I.A., Tyurin, A.P., Liu, S.W., Lukyanov, D.A., Sergiev, P. V., et al. (2018). Diversity, novelty, and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria from mangrove plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A. 9: 868.

Joe, M.M., Devaraj, S., Benson, A. e Sa, T. (2016). Isolation of phosphate solubilizing endophytic bacteria from *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn: Evaluation of plant growth promotion and antioxidant activity under salt stress. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**. Elsevier GmbH 3: 71–77.

Johnston-Monje, D., Mousa, W.K., Lazarovits, G. e Raizada, M.N. (2014). Impact of swapping soils on the endophytic bacterial communities of pre-domesticated, ancient and modern maize. **BMC Plant Biology** 14:.

Johnston-Monje, D. e Raizada, M.N. (2011). Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. **PLoS ONE** 6: e20396.

Kaeberlein, T. (2002). Isolating “Uncultivable” Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. **Science** 296: 1127–1129.

Kassambara, A. (2020). ‘ggpubr’: “ggplot2” Based Publication Ready Plots. **R package version 0.2.5**.

Khan, A.L., Waqas, M., Kang, S.-M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., Al-Khiziri, S., Ullah, I., et al. (2014). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology** 52: 689–695.

Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., von Mering, C. e Vorholt, J.A. (2012). Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. **The ISME Journal** 6: 1378–1390.

Konietschke, F., Placzek, M., Schaarschmidt, F. e Hothorn, L.A. (2015). nparcomp: An R software package for nonparametric multiple comparisons and simultaneous confidence intervals. **Journal of Statistical Software**. American Statistical Association 64: 1–17.

Kumar, A. e Verma, J.P. (2018). Does plant—Microbe interaction confer stress tolerance in plants: A review?. **Microbiological Research** 207: 41–52.

Kumar, D. (2014). Salicylic acid signaling in disease resistance. **Plant Science** 228: 127–134.

Kumar Meena, R., Kumar Singh, R., Pal Singh, N., Kumari Meena, S. e Singh Meena, V. (2015). Isolation of low temperature surviving plant growth - promoting rhizobacteria (PGPR) from pea (*Pisum sativum* L.) and documentation of their plant growth promoting traits. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. Elsevier 4: 806–811.

Lamb, P.D., Hunter, E., Pinnegar, J.K., Creer, S., Davies, R.G. e Taylor, M.I. (2019). How quantitative is metabarcoding: A meta-analytical approach. **Molecular Ecology**. Blackwell Publishing Ltd 28: 420–430.

Langille, M.G.I.I., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A., Clemente, J.C., Burkepille, D.E., et al. (2013). Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**. Nature Research 31: 814–821.

Lei, S., Xu, X., Cheng, Z., Xiong, J., Ma, R., Zhang, L., Yang, X., Zhu, Y., et al. (2019). Analysis of the community composition and bacterial diversity of the rhizosphere microbiome across different plant taxa. **MicrobiologyOpen**. Blackwell Publishing Ltd 8:.

Leo, L. e Shetty, S. (2017). microbiome R package. **Bioconductor**.

Levy, A., Salas Gonzalez, I., Mittelviefhaus, M., Clingenpeel, S., Herrera Paredes, S., Miao, J., Wang, K., Devescovi, G., et al. (2018). Genomic features of bacterial adaptation to plants. **Nature Genetics** 50: 138–150.

Li, Y., Wang, Z., Liu, X., Song, Z., Li, R., Shao, C. e Yin, Y. (2016). Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for the dimorphic fungus *Nomuraea rileyi* conidiation, dimorphism transition, resistance to oxidative stress, pigmented microsclerotium formation, and virulence. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Research Foundation 7: 931.

Liang, Y.-L., Zhang, Z., Wu, M., Wu, Y. e Feng, J.-X. (2014). Isolation, Screening, and Identification of Cellulolytic Bacteria from Natural Reserves in the Subtropical Region of China and Optimization of Cellulase Production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. **BioMed Research International** 2014: 1–13.

Liebeke, M., Brözel, V.S., Hecker, M. e Lalk, M. (2009). Chemical characterization of soil extract as growth media for the ecophysiological study of bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology** 83: 161–173.

Liotti, R.G., da Silva Figueiredo, M.I., da Silva, G.F., de Mendonça, E.A.F. e Soares, M.A. (2018). Diversity of cultivable bacterial endophytes in *Paullinia cupana* and their potential for plant growth promotion and phytopathogen control. **Microbiological Research**. Elsevier GmbH 207: 8–18.

Liu, F., Xing, S., Ma, H., Du, Z. e Ma, B. (2013). Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. **Applied Microbiology and Biotechnology**. Appl Microbiol Biotechnol 97: 9155–9164.

Liu, K., McInroy, J.A., Hu, C.H. e Kloepper, J.W. (2018). Mixtures of plant-growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple plant diseases and plant-growth promotion in the presence of pathogens. **Plant Disease**. American Phytopathological Society 102: 67–72.

Liu, X., Li, Q., Li, Y., Guan, G. e Chen, S. (2019). *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. **PeerJ** PeerJ Inc. 2019:.

Loganayagan, S., Chandra Mohan, N. e Dhivyabharathi, S. (2020). Sugarcane bagasse ash as alternate supplementary cementitious material in concrete. **Materials Today: Proceedings**. Elsevier BV.

Love, M.I., Huber, W. e Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**. BioMed Central Ltd. 15: 550.

Lundberg, D.S., Lebeis, S.L., Paredes, S.H., Yourstone, S., Gehring, J., Malfatti, S., Tremblay, J., Engelbrektson, A., et al. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**. Nature Publishing Group 488: 86–90.

Madhaiyan, M., Saravanan, V.S., Jovi, D.B.S.S., Lee, H., Thenmozhi, R., Hari, K. e Sa, T. (2004). Occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in tropical and subtropical plants of Western Ghats, India. **Microbiological Research**. Elsevier GmbH 159: 233–243.

Marchesi, J.R. e Ravel, J. (2015). The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**. Springer Nature 3: 31.

MARQUES, M.O. (2006). Aspectos técnicos e legais da produção, transporte e aplicação de vinhaça. **Livro Ceres** 369–375.

Martínez-Hidalgo, P., Maymon, M., Pule-Meulenberg, F. e Hirsch, A.M. (2019). Engineering root microbiomes for healthier crops and soils using beneficial, environmentally safe bacteria. **Canadian Journal of Microbiology** 65: 91–104.

Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G. e Mora, M.L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. Sociedad Chilena de la Ciencia del Suelo 10: 293–319.

Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, Ö. e Mengel, K. (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. **Biology and Fertility of Soils**. Springer Verlag 30: 433–439.

McMurdie, P.J. e Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. **PLoS ONE**. Public Library of Science 8: e61217.

Medina, D., Walke, J.B., Gajewski, Z., Becker, M.H., Swartwout, M.C. e Belden, L.K. (2017). Culture media and individual hosts affect the recovery of culturable bacterial diversity from Amphibian skin. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers 8: 1574.

Meghana, M. e Shastri, Y. (2020). Sustainable valorization of sugar industry waste: Status, opportunities, and challenges. **Bioresource Technology**. Elsevier Ltd.

Mehnaz, S. (2011). Plant Growth-Promoting Bacteria Associated with Sugarcane. **Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 165–187.

Mello, I.S., Targanski, S., Pietro-Souza, W., Frutuoso Stachack, F.F., Terezo, A.J. e Soares, M.A. (2020). Endophytic bacteria stimulate mercury phytoremediation by modulating its bioaccumulation and volatilization. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. Academic Press 202: 110818.

Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Madala, N.E., Labuschagne, N. e Dubery, I.A. (2018). The chemistry of plant–microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. **Frontiers in Plant Science**. Frontiers Media S.A.

Mitter, B., Petric, A., Shin, M.W., Chain, P.S.G., Hauberg-Lotte, L., Reinhold-hurek, B., Nowak, J. e Sessitsch, A. (2013). Comparative genome analysis of Burkholderia phytofirmans PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. **Frontiers in plant science** 4: 120.

Moore, P.H. e Botha, F.C. (2013). **Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology**. **Sugarcane: Physiology, Biochemistry, and Functional Biology**. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.

Moran-Salazar, R.G., Sanchez-Lizarraga, A.L., Rodriguez-Campos, J., Davila-Vazquez, G., Marino-Marmolejo, E.N., Dendooven, L. e Contreras-Ramos, S.M. (2016). Utilization of vinasses as soil amendment: consequences and perspectives. **SpringerPlus** 5: 1007.

Mueller, U.G. e Sachs, J.L. (2015). Engineering Microbiomes to Improve Plant and Animal Health. **Trends in Microbiology** 23: 606–617.

Müller, C.A., Obermeier, M.M. e Berg, G. (2016). Bioprospecting plant-associated microbiomes. **Journal of Biotechnology**. Elsevier 235: 171–180.

Mumtaz, M.Z., Ahmad, M., Jamil, M. e Hussain, T. (2017). Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. **Microbiological Research**. Urban & Fischer 202: 51–60.

Murashige, T. e Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. **Physiologia Plantarum**. Wiley/Blackwell (10.1111) 15: 473–497.

Naureen, Z., Ur Rehman, N., Hussain, H., Hussain, J., Gilani, S.A., Al Housni, S.K., Mabood, F., Khan, A.L., et al. (2017). Exploring the potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A. 8:.

Navarrete, A.A., Diniz, T.R., Braga, L.P.P., Silva, G.G.Z., Franchini, J.C., Rossetto, R., Edwards, R.A. e Tsai, S.M. (2015). Multi-analytical approach reveals potential microbial indicators in soil for sugarcane model systems. **PLoS ONE**. Public Library of Science 10: e0129765.

Nguyen, T.M., Seo, C., Ji, M., Paik, M.J., Myung, S.W. e Kim, J. (2018). **Effective soil extraction method for cultivating previously uncultured soil bacteria**. **Applied and Environmental Microbiology**.

Niu, B., Paulson, J.N., Zheng, X. e Kolter, R. (2017). Simplified and representative bacterial community of maize roots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. National Academy of Sciences 114: E2450–E2459.

O'Toole, G.A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. **Journal of Visualized Experiments**. Journal of Visualized Experiments.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., et al. (2019). vegan: Community Ecology Package.

Olanrewaju, O.S., Glick, B.R. e Babalola, O.O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 33: 197.

Owen, D., Williams, A.P., Griffith, G.W. e Withers, P.J.A. (2015). Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorous acquisition. **Applied Soil Ecology**. Elsevier.

Pan, B.O., Vessey, J.K. e Pan, B.O. (2001). Response of the Endophytic Diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* on Solid Media to Changes in Atmospheric Partial O₂ Pressure. Response of the Endophytic Diazotroph *Gluconacetobacter diazotrophicus* on Solid Media to Changes in Atmospheric Partial O₂. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY** 67: 4694–4700.

Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M. e Kaushik, S. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. Academy of Scientific Research and Technology, Egypt 15: 379–391.

Pariona-Llanos, R., de Santi Ferrara Felipe, F., Soto Gonzales, H.H., Barbosa, H.R., Ibañez de Santi Ferrara Felipe, F., Soto Gonzales, H.H., Barbosa, H.R., de Santi Ferrara Felipe, F., et al. (2010). Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. **European Journal of Soil Biology** 46: 387–393.

Pasapula, V., Shen, G., Kuppu, S., Paez-Valencia, J., Mendoza, M., Hou, P., Chen, J., Qiu, X., et al. (2011). Expression of an Arabidopsis vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene (AVP1) in cotton improves drought- and salt tolerance and increases fibre yield in the field conditions. **Plant Biotechnology Journal**. Plant Biotechnol J 9: 88–99.

Patel, C.B., Singh, V.K., Singh, A.P., Meena, M. e Upadhyay, R.S.S. (2019). Microbial Genes Involved in Interaction With Plants. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, p. 171–180.

Payne, S.M. (1994). Detection, isolation, and characterization of siderophores. **Methods in Enzymology**, p. 329–344.

Penrose, D.M. e Glick, B.R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Physiologia Plantarum**. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111) 118: 10–15.

Pham, V.H.T.T. e Kim, J. (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. **Trends in Biotechnology** 30: 475–484.

Pietro-Souza, W., de Campos Pereira, F., Mello, I.S., Stachack, F.F.F., Terezo, A.J., Cunha, C.N. da., White, J.F., Li, H., et al. (2020). Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. **Chemosphere**. Elsevier Ltd 240: 124874.

Pisa, G., Magnani, G.S., Weber, H., Souza, E.M., Faoro, H., Monteiro, R.A., Daros, E., Baura, V., et al. (2011). Diversity of 16S rRNA genes from bacteria of sugarcane rhizosphere soil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 44: 1215–1221.

Plummer, E. e Twin, J. (2015). A Comparison of Three Bioinformatics Pipelines for the Analysis of Preterm Gut Microbiota using 16S rRNA Gene Sequencing Data. **Journal of Proteomics & Bioinformatics** 8: 283–291.

Qiao, C., Penton, C.R., Xiong, W., Liu, C., Wang, R., Liu, Z., Xu, X., Li, R. e Shen, Q. (2019). Reshaping the rhizosphere microbiome by bio-organic amendment to enhance crop yield in a maize-cabbage rotation system. **Applied Soil Ecology**.

Qin, Y., Druzhinina, I.S., Pan, X. e Yuan, Z. (2016). Microbially Mediated Plant Salt Tolerance and Microbiome-based Solutions for Saline Agriculture. **Biotechnology Advances**. Elsevier 34: 1245–1259.

Quince, C., Walker, A.W., Simpson, J.T., Loman, N.J. e Segata, N. (2017). Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**. Nature Publishing Group.

Quiza, L., St-Arnaud, M. e Yergeau, E. (2015). Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering. **Frontiers in Plant Science**. Frontiers Media S.A.

R Development Core Team. (2018). A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria.

Ramnath, L., Sithole, B. e Govinden, R. (2017). Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to Eucalyptus wood species for application in the pulping industry. **Biotechnology Reports**. Elsevier 15: 114–124.

Reis, V.M., Olivares, F.L. e Döbereiner, J. (1994). Improved methodology for isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and confirmation of its endophytic habitat. **World journal of microbiology & biotechnology** 10: 401–5.

Ren, D., Madsen, J.S., de la Cruz-Perera, C.I., Bergmark, L., Sørensen, S.J. e Burmølle, M. (2014). High-Throughput Screening of Multispecies Biofilm Formation and Quantitative PCR-Based Assessment of Individual Species Proportions, Useful for Exploring Interspecific Bacterial Interactions. **Microbial Ecology** 68: 146–154.

Rezki, S., Campion, C., Simoneau, P., Jacques, M.-A., Shade, A. e Barret, M. (2018). Assembly of seed-associated microbial communities within and across successive plant generations. **Plant and Soil**. Springer International Publishing 422: 67–79.

Roca, A., Pizarro-Tobías, P., Udaondo, Z., Fernández, M., Matilla, M.A., Molina-Henares, M.A., Molina, L., Segura, A., et al. (2013). Analysis of the plant growth-promoting properties encoded by the genome of the rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD-1. **Environmental Microbiology**. Wiley/Blackwell (10.1111) 15: 780–794.

Rodríguez, H. e Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances** 17: 319–339.

Rosenblueth, M., Ormeño-Orrillo, E., López-López, A., Rogel, M.A., Reyes-Hernández, B.J., Martínez-Romero, J.C., Reddy, P.M. e Martínez-Romero, E. (2018). Nitrogen fixation in cereals. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A.

Rout, M.E. (2014). The Plant Microbiome. **Advances in Botanical Research**. Academic Press 69: 279–309.

Rubin, R.L., Jones, A.N., Hayer, M., Shuman-Goodier, M.E., Andrews, L. V., Hungate, B.A., Andrews, V.L., Hungate, B.A., et al. (2020). Opposing effects of bacterial endophytes on biomass allocation of a wild donor and agricultural recipient. **FEMS Microbiology Ecology** 96:.

Sala-trepat, J.M. e Evans, W.C. (1971). The meta Cleavage of Catechol by *Azotobacter* Species: 4-Oxalocrotonate Pathway. **European Journal of Biochemistry**. Eur J Biochem 20: 400–413.

Santi, C., Bogusz, D. e Franche, C. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**. Oxford University Press 111: 743–767.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M. e Glick, B.R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**. Elsevier GmbH. 183: 92–99.

Sarabia, M., Jakobsen, I., Grønlund, M., Carreon-Abud, Y. e Larsen, J. (2018). Rhizosphere yeasts improve P uptake of a maize arbuscular mycorrhizal association. **Applied Soil Ecology**. Elsevier B.V. 125: 18–25.

Sarhan, M.S., Hamza, M.A., Youssef, H.H., Patz, S., Becker, M., ElSawey, H., Nemr, R., Daanaa, H.S.A., et al. (2019). Culturomics of the plant prokaryotic microbiome and the dawn of plant-based culture media – A review. **Journal of Advanced Research**. Elsevier 19: 15–27.

Sarkar, A., Ghosh, P.K., Pramanik, K., Mitra, S., Soren, T., Pandey, S., Mondal, M.H. e Maiti, T.K. (2018). A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. **Research in Microbiology**. Elsevier Masson SAS 169: 20–32.

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods** 9: 676–682.

Schipanski, M.E., Barbercheck, M.E., Murrell, E.G., Harper, J., Finney, D.M., Kaye, J.P., Mortensen, D.A. e Smith, R.G. (2017). Balancing multiple objectives in organic feed and forage cropping systems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. Elsevier 239: 219–227.

Schlaeppli, K. e Bulgarelli, D. (2015). The Plant Microbiome at Work. **Molecular Plant-Microbe Interactions** 28: 212–217.

Schleifer, K.H. (2004). Microbial Diversity: Facts, Problems and Prospects. **Systematic and Applied Microbiology** 27: 3–9.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Bolchacova, E., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. National Academy of Sciences 109: 6241–6246.

Schwyn, B. e Neilands, J.B.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry** 160: 47–56.

Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S. e Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**. BioMed Central 12: R60.

Shade, A. e Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. **Environmental Microbiology**. John Wiley & Sons, Ltd 14: 4–12.

Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. **Current Opinion in Plant Biology** 6: 365–371.

Sharma, C.K., Vishnoi, V.K., Dubey, R.C. e Maheshwari, D.K. (2018). A twin rhizospheric bacterial consortium induces systemic resistance to a phytopathogen *Macrophomina phaseolina* in mung bean. **Rhizosphere**. Elsevier B.V. 5: 71–75.

Sharma, I.P. e Sharma, A.K. (2017). Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. **Symbiosis** 71: 175–183.

Shehata, H.R., Dumigan, C., Watts, S. e Raizada, M.N. (2017). An endophytic microbe from an unusual volcanic swamp corn seeks and inhabits root hair cells to extract rock phosphate. **Scientific Reports** 7:.

Shehata, H.R., Lyons, E.M. e Raizada, M.N. (2018). Turfgrasses as model assay systems for high-throughput in planta screening of beneficial endophytes isolated from cereal crops. **Symbiosis** 76: 71–76.

Shen, S.Y. e Fulthorpe, R. (2015). Seasonal variation of bacterial endophytes in urban trees. **Frontiers in Microbiology** 6: 1–13.

Shukla, A., Kumar, A., Chaturvedi, O.P., Nagori, T., Kumar, N. e Gupta, A. (2018). Efficacy of rhizobial and phosphate-solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi to ameliorate shade response on six pulse crops. **Agroforestry Systems**. Springer Netherlands 92: 499–509.

Silveira, A.P.D. da., Sala, V.M.R., Cardoso, E.J.B.N., Labanca, E.G. e Cipriano, M.A.P. (2016). Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. **Applied Soil Ecology** 107: 313–319.

Singh, R. e Dubey, A.K. (2018). Diversity and applications of endophytic actinobacteria of plants in special and other ecological niches. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A. 9:.

Singh, R.P. e Jha, P.N. (2016). The Multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 Augments Induced Systemic Resistance and Enhanced Salinity Tolerance of Wheat (*Triticum aestivum* L.). **PLOS ONE** 11: e0155026.

Solanki, M.K., Wang, Z., Wang, F.Y., Li, C.N., Lan, T.J., Singh, R.K., Singh, P., Yang, L.T. e Li, Y.R. (2017). Intercropping in Sugarcane Cultivation Influenced the Soil Properties and Enhanced the Diversity of Vital Diazotrophic Bacteria. **Sugar Tech.** Springer India 19: 136–147.

Streit, W.R. e Schmitz, R.A. (2004). Metagenomics - The key to the uncultured microbes. **Current Opinion in Microbiology.** Curr Opin Microbiol.

Strobel, G.A. (2003). Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection** 5: 535–544.

Sumayo, M., Hahm, M.-S.S. e Ghim, S.-Y.Y. (2013). Determinants of Plant Growth-promoting *Ochrobactrum lupini* KUDC1013 Involved in Induction of Systemic Resistance against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Tobacco Leaves. **The Plant Pathology Journal.** Korean Society of Plant Pathology 29: 174–181.

Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C. e Galli-Terasawa, L.V. (2014). Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. **AMB Express.** Springer Berlin Heidelberg 4: 1–9.

Takenaka, S., Murakami, S., Shinke, R., Hatakeyama, K., Yukawa, H. e Aoki, K. (1997). Novel genes encoding 2-aminophenol 1,6-dioxygenase from *Pseudomonas* species AP-3 growing on 2-aminophenol and catalytic properties of the purified enzyme. **Journal of Biological Chemistry.** J Biol Chem 272: 14727–14732.

Taulé, C., Mareque, C., Barlocco, C., Hackembruch, F., Reis, V.M., Sicardi, M. e Battistoni, F. (2012). The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant and Soil** 356: 35–49.

Thomas, T., Gilbert, J. e Meyer, F. (2012). Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation.** Springer Science and Business Media LLC 2: 3.

Torsvik, V., Øvreås, L. e Thingstad, T.F. (2002). Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. **Science.** Science.

Tsukanova, K.A., Chebotar, V., Meyer, J.J.M. e Bibikova, T.N. (2017). Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. **South African Journal of Botany** 113: 91–102.

Tuomisto, H.L., Hodge, I.D., Riordan, P. e Macdonald, D.W. (2012). Does organic farming reduce environmental impacts? – A meta-analysis of European research. **Journal of Environmental Management** 112: 309–320.

Tzec-Interián, J.A., Desgarennes, D., Carrión, G., Monribot-Villanueva, J.L., Guerrero-Analco, J.A., Ferrera-Rodríguez, O., Santos-Rodríguez, D.L., Liahut-Guin, N., et al. (2020). Characterization of plant growth-promoting bacteria associated with avocado trees (*Persea americana* Miller) and their potential use in the biocontrol of *Scirtothrips perseae* (avocado thrips). **PLOS ONE**. Public Library of Science 15: e0231215.

Vaishnav, A., Singh, J., Singh, P., Rajput, R.S., Singh, H.B. e Sarma, B.K. (2020). *Sphingobacterium* sp. BHU-AV3 Induces Salt Tolerance in Tomato by Enhancing Antioxidant Activities and Energy Metabolism. **Frontiers in Microbiology**. Frontiers Media S.A. 11:.

Van Der Heijden, M.G.A.G.A.A.G.A.A., Bruin, D.S., Luckerhoff, L., van Logtestijn, R.S.P.P.S.P.S.P., Schlaeppli, K., Bruin, S. De., Luckerhoff, L., van Logtestijn, R.S.P.P.S.P.S.P., et al. (2016). A widespread plant-fungal-bacterial symbiosis promotes plant biodiversity, plant nutrition and seedling recruitment. **The ISME Journal**. Nature Publishing Group 10: 389–399.

Vandenkoornhuyse, P., Quaiser, A., Duhamel, M., Le Van, A. e Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. **New Phytologist**. Wiley/Blackwell (10.1111) 206: 1196–1206.

Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S. e Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability-A review. **Molecules** 21:.

Verma, S., Kingsley, K., Bergen, M., Kowalski, K. e White, J. (2018a). Fungal Disease Prevention in Seedlings of Rice (*Oryza sativa*) and Other Grasses by Growth-Promoting Seed-Associated Endophytic Bacteria from Invasive *Phragmites australis*. **Microorganisms** 6: 21.

Verma, S.K., Kingsley, K., Bergen, M., English, C., Elmore, M., Kharwar, R.N. e White, J.F. (2018b). Bacterial endophytes from rice cut grass (*Leersia oryzoides* L.) increase growth, promote root gravitropic response, stimulate root hair formation, and protect rice seedlings from disease. **Plant and Soil** 422: 223–238.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A. e Klessig, D.F. (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. **Annual Review of Phytopathology** 47: 177–206.

Wang, Q., Chen, L., He, L.Y. e Sheng, X.F. (2016). Increased biomass and reduced heavy metal accumulation of edible tissues of vegetable crops in the presence of plant growth-promoting *Neorhizobium huautlense* T1-17 and biochar. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. Elsevier B.V. 228: 9–18.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M. e Cole, J.R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and Environmental Microbiology**. American Society for Microbiology 73: 5261–5267.

Wang, Z., Liao, L., Yuan, X., Guo, H., Guo, A. e Liu, J. (2013). Genetic diversity analysis of *Cynodon dactylon* (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers. **Biochemical Systematics and Ecology**. Pergamon 46: 108–115.

Wang, Z., Yuan, X., Zheng, Y. e Liu, J. (2009). Molecular identification and genetic analysis for 24 turf-type *Cynodon* cultivars by Sequence-Related Amplified Polymorphism markers. **Scientia Horticulturae** 122: 461–467.

White, J.F., Kingsley, K.I., Kowalski, K.P., Irizarry, I., Micci, A., Soares, M.A. e Bergen, M.S. (2018). Disease protection and allelopathic interactions of seed-transmitted endophytic pseudomonads of invasive reed grass (*Phragmites australis*). **Plant and Soil** 422: 195–208.

White, P.M., Viator, R.P. e Webber, C.L. (2020). Temporal and varietal variation in sugarcane post-harvest residue biomass yields and chemical composition. **Industrial Crops and Products**. Elsevier B.V. 154: 112616.

Xu, Y., Chen, M., Zhang, W. e Lin, M. (2003). Genetic organization of genes encoding phenol hydroxylase, benzoate 1,2-dioxygenase alpha subunit and its regulatory proteins in *Acinetobacter calcoaceticus* PHEA-2. **Current Microbiology**. Curr Microbiol 46: 235–240.

Yakhin, O.I., Lubyantsev, A.A., Yakhin, I.A. e Brown, P.H. (2017). Biostimulants in plant science: A global perspective. **Frontiers in Plant Science**. Frontiers Media S.A. 7:.

Yanni, Y.G., Dazzo, F.B. e Zidan, M.I. (2011). Beneficial Endophytic Rhizobia as Biofertilizer Inoculants for Rice and the Spatial Ecology of This Bacteria–Plant Association. **Bacteria in Agrobiological Crop Ecosystems**. Springer Berlin Heidelberg, p. 265–294.

Yeoh, Y.K., Dennis, P.G., Paungfoo-Lonhienne, C., Weber, L., Brackin, R., Ragan, M.A., Schmidt, S. e Hugenholtz, P. (2017). Evolutionary conservation of a core root microbiome across plant phyla along a tropical soil chronosequence. **Nature Communications** 8:.

Zanardo, M., Rosselli, R., Meneghesso, A., Sablok, G., Stevanato, P., Engel, M., Altissimo, A., Peserico, L., et al. (2018). Response of Bacterial Communities upon Application of Different Innovative Organic Fertilizers in a Greenhouse Experiment Using Low-Nutrient Soil Cultivated with *Cynodon dactylon*. **Soil Systems** 2: 52.

Zgadzaj, R., Garrido-Oter, R., Jensen, D.B., Koprivova, A., Schulze-Lefert, P. e Radutoiu, S. (2016). Root nodule symbiosis in *Lotus japonicus* drives the establishment of distinctive rhizosphere, root, and nodule bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. National Academy of Sciences 113: E7996–E8005.

Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T. e Stamatakis, A. (2014). PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. **Bioinformatics** Oxford University Press 30: 614–620.

Zhang, S., Liao, S. an., Yu, X., Lu, H., Xian, J. an., Guo, H., Wang, A. e Xie, J. (2015). Microbial diversity of mangrove sediment in Shenzhen Bay and gene cloning, characterization of an isolated phytase-producing strain of SPC09 *B. cereus*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 99: 5339–5350.

APÊNDICE

Material Suplementar - Análises estatísticas e dados de avaliação da prospecção de comunidades de bactérias provenientes de solo rizosférico e tecidos de cana-de-açúcar em condições de cultura orgânica e convencional usando a planta modelo *Cynodon dactylon* (Tabela Suplementar 1 e Tabela Suplementar 2). As informações sobre condições experimentais encontram-se descritas na secção de materiais e métodos.

RESPOSTA_CONTROL		RESPOSTA_TRAT	
Média	49,79666667	Média	52,54297
Erro padrão	1,31690043	Erro padrão	0,534254
Mediana	49,385	Mediana	52,665
Modo	#N/A	Modo	50
Desvio padrão	7,212960717	Desvio padrão	6,499479
Variância da amostra	52,0268023	Variância da amostra	42,24322
Curtose	3,817447227	Curtose	-0,02023
Assimetria	1,143269944	Assimetria	-0,05613
Intervalo	37,04	Intervalo	38,57
Mínimo	37,76	Mínimo	33,52
Máximo	74,8	Máximo	72,09
Soma	1493,9	Soma	7776,36
Contagem	30	Contagem	148
Nível de confiança (95.0%)	2,693363796	Nível de confiança (95.0%)	1,05581

	CONTROL	TRAT
Mínimo	37,76	33,52
Máximo	74,8	72,09
Quartil 1	45,5325	48,3325
Quartil 2	49,385	52,665
Quartil 3	54,2525	57,14

Teste-F: duas amostras para variâncias

	<i>RESPOSTA_CONTROL</i>	<i>RESPOSTA_TRAT</i>
Média	49,79666667	52,54297297
Variância	52,0268023	42,24322375
Observações	30	148
gl	29	147
F	1,231601134	
P(F<=f) uni-caudal	0,210891643	
F crítico uni-caudal	1,544750083	

Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes

	<i>RESPOSTA_CONTROL</i>	<i>RESPOSTA_TRAT</i>
Média	49,79666667	52,54297297
Variância	52,0268023	42,24322375
Observações	30	148
Variância agrupada	43,85529067	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	176	
Stat t	-2,071187713	
P(T<=t) uni-caudal	0,019900199	
t crítico uni-caudal	1,653557435	
P(T<=t) bi-caudal	0,039800398	
t crítico bi-caudal	1,973534388	

Tabela Suplementar 1. Dados de germinação (porcentagem) dos controles ao longo dos testes de prospecção de comunidades em *Cynodon dactylon*.

Resposta do controle

Item	PLACA	ID	TRAT	RESP_CONTROL	Item	PLACA	ID	TRAT	RESP_CONTROL
1	RB2_P1-3	Control_neg_1	CONTROL	44,19	16	RB3_P2-3	Control_neg_4	CONTROL	74,8
2	RB2_P1-3	Control_neg_2	CONTROL	52,81	17	RB4_P1-4	Control_neg_1	CONTROL	51,72
3	RB2_P1-3	Control_neg_3	CONTROL	40,54	18	RB4_P1-4	Control_neg_2	CONTROL	56,97
4	RB2_P1-3	Control_neg_4	CONTROL	45,53	19	RB4_P1-4	Control_neg_3	CONTROL	54,59
5	RB2_P3-3	Control_neg_1	CONTROL	44,37	20	RB4_P1-4	Control_neg_4	CONTROL	57,31
6	RB2_P3-3	Control_neg_2	CONTROL	39,02	21	RB4_P2-4	Control_neg_1	CONTROL	51,68
7	RB2_P3-3	Control_neg_3	CONTROL	44,05	22	RB4_P2-4	Control_neg_2	CONTROL	55,14
8	RB2_P3-3	Control_neg_4	CONTROL	39,75	23	RB4_P2-4	Control_neg_3	CONTROL	49,42
9	RB3_P1-3	Control_neg_1	CONTROL	49,35	24	RB4_P3-4	Control_neg_1	CONTROL	51,46
10	RB3_P1-3	Control_neg_2	CONTROL	54,49	25	RB4_P3-4	Control_neg_2	CONTROL	45,54
11	RB3_P1-3	Control_neg_3	CONTROL	48,65	26	RB4_P3-4	Control_neg_3	CONTROL	48,78
12	RB3_P1-3	Control_neg_4	CONTROL	46,43	27	RB4_P3-4	Control_neg_4	CONTROL	51,03
13	RB3_P2-3	Control_neg_1	CONTROL	48,91	28	RB4_P4-4	Control_neg_1	CONTROL	54,88
14	RB3_P2-3	Control_neg_2	CONTROL	55,48	29	RB4_P4-4	Control_neg_2	CONTROL	37,76
15	RB3_P2-3	Control_neg_3	CONTROL	53,54	30	RB4_P4-4	Control_neg_3	CONTROL	45,71

Tabela Suplementar 2. Resposta dos tratamentos de inoculação de comunidades em *Cynodon dactylon*. São apresentadas apenas aquelas comunidades que tiveram respostas fenotípicas positivas e sua distribuição nos diferentes quartis. A porcentagem de germinação é apresentada na coluna RESP_TRAT. Foram selecionadas unicamente aquelas do Q3 (> Q3_RESP) para os testes posteriores.

COMUNIDADE	PLACA	ID	ORIGEM	RESP_TRAT	> Q3_RESP	> Q2_RESP	> Q1_RESP
1	RB2_P1-3	A5	OSP2	48,04	0	0	1
2	RB2_P1-3	A7	OSP2	54,59	0	1	1
3	RB2_P1-3	B5	OSP2	51,67	0	0	1
4	RB2_P1-3	B8	OSP2	33,52	0	0	0
5	RB2_P1-3	C7	OSP2	44,44	0	0	0
6	RB2_P1-3	D5	OSP2	55,41	0	1	1
7	RB2_P1-3	D8	OSP2	52	0	0	1
8	RB2_P1-3	E5	OSP2	50,43	0	0	1
9	RB2_P1-3	E6	OSP2	45,45	0	0	0
10	RB2_P1-3	F5	OSP2	48,59	0	0	1
11	RB2_P1-3	F7	OSP2	55,56	0	1	1
12	RB2_P1-3	G5	OSP2	40,17	0	0	0
13	RB2_P1-3	H6	OSP2	52,73	0	1	1
14	RB2_P1-3	H7	OSP2	49,55	0	0	1
15	RB2_P1-3	A4	OLP2	50	0	0	1
16	RB2_P1-3	B4	OLP2	59,03	1	1	1
17	RB2_P3-3	A1	ORN2	47,03	0	0	0
18	RB2_P3-3	A2	ORN2	44,35	0	0	0
19	RB2_P3-3	A3	ORN2	48,35	0	0	1
20	RB2_P3-3	A11	ORZ2	53,29	0	1	1
21	RB2_P3-3	A12	ORZ2	48,11	0	0	1
22	RB2_P3-3	B1	ORN2	40	0	0	0
23	RB2_P3-3	B2	ORN2	49,75	0	0	1
24	RB2_P3-3	B3	ORN2	57,14	0	1	1
25	RB2_P3-3	B12	ORZ2	50,56	0	0	1
26	RB2_P3-3	C1	ORN2	60,49	1	1	1
27	RB2_P3-3	C2	ORN2	40,91	0	0	0
28	RB2_P3-3	C3	ORN2	47,98	0	0	0
29	RB2_P3-3	C4	ORN2	46,36	0	0	0
30	RB2_P3-3	D2	ORN2	45,86	0	0	0
31	RB2_P3-3	D3	ORN2	41,77	0	0	0
32	RB2_P3-3	D11	ORZ2	43,48	0	0	0
33	RB2_P3-3	D12	ORZ2	40,76	0	0	0
34	RB2_P3-3	E1	ORN2	47,86	0	0	0
35	RB2_P3-3	E2	ORN2	53,96	0	1	1
36	RB2_P3-3	E3	ORN2	52,26	0	0	1
37	RB2_P3-3	E9	CRZ2	45,52	0	0	0
38	RB2_P3-3	E10	ORZ2	55,63	0	1	1
39	RB2_P3-3	E11	ORZ2	53,07	0	1	1
40	RB2_P3-3	F1	ORN2	44,75	0	0	0

Tabela Suplementar 2. Continuação.

COMUNIDADE	PLACA	ID	ORIGEM	RESP_TRAT	> Q3_RESP	> Q2_RESP	> Q1_RESP
41	RB2_P3-3	F3	ORN2	44,24	0	0	0
42	RB2_P3-3	F8	CRZ2	43,09	0	0	0
43	RB2_P3-3	G2	ORN2	58,05	1	1	1
44	RB2_P3-3	G3	ORN2	39,88	0	0	0
45	RB2_P3-3	G9	CRZ2	49,11	0	0	1
46	RB2_P3-3	H1	ORN2	48,47	0	0	1
47	RB2_P3-3	H2	ORN2	51,92	0	1	1
48	RB2_P3-3	H3	ORN2	51,72	0	1	1
49	RB2_P3-3	H8	CRZ2	51,67	0	1	1
50	RB2_P3-3	H9	CRZ2	50	0	0	1
51	RB3_P1-3	A3	ORZ3	55,47	0	1	1
52	RB3_P1-3	B1	ORZ3	56,67	1	1	1
53	RB3_P1-3	B2	ORZ3	63,21	1	1	1
54	RB3_P1-3	B3	ORZ3	50,9	0	0	1
55	RB3_P1-3	C1	ORZ3	53,42	0	1	1
56	RB3_P1-3	D2	ORZ3	44,66	0	0	0
57	RB3_P1-3	D3	ORZ3	49,78	0	0	1
58	RB3_P1-3	D9	ORN3	55,28	0	1	1
59	RB3_P1-3	E1	ORZ3	52,91	0	1	1
60	RB3_P1-3	E3	ORZ3	52,6	0	1	1
61	RB3_P1-3	E8	ORN3	56,22	1	1	1
62	RB3_P1-3	E9	ORN3	45,16	0	0	0
63	RB3_P1-3	E10	ORN3	49,14	0	0	1
64	RB3_P1-3	F1	ORZ3	58,97	1	1	1
65	RB3_P1-3	F8	ORN3	54,72	0	1	1
66	RB3_P2-3	A3	OSN3	50,68	0	0	1
67	RB3_P2-3	A8	CSP3	63,19	1	1	1
68	RB3_P2-3	A9	CSP3	56,52	1	1	1
69	RB3_P2-3	B7	CSN3	59,54	1	1	1
70	RB3_P2-3	B9	CSP3	57,23	1	1	1
71	RB3_P2-3	B12	OLP3	59,26	1	1	1
72	RB3_P2-3	C8	CSP3	57,14	1	1	1
73	RB3_P2-3	C9	CSP3	63,24	1	1	1
74	RB3_P2-3	C11	OLP3	60,77	1	1	1
75	RB3_P2-3	C12	OLP3	58,55	1	1	1
76	RB3_P2-3	D8	CSP3	55,48	0	1	1
77	RB3_P2-3	D12	OLP3	54,72	0	1	1
78	RB3_P2-3	E3	OSN3	57,83	1	1	1
79	RB3_P2-3	E7	CSN3	63,54	1	1	1
80	RB3_P2-3	E8	CSP3	66,15	1	1	1

Tabela Suplementar 2. Continuação.

COMUNIDADE	PLACA	ID	ORIEGM	RESP_TRAT	> Q3_RESP	> Q2_RESP	> Q1_RESP
81	RB3_P2-3	E11	OLP3	58,58	1	1	1
82	RB3_P2-3	F10	CSP3	60,59	1	1	1
83	RB3_P2-3	F12	OLP3	61,81	1	1	1
84	RB3_P2-3	G8	CSP3	43,81	0	0	0
85	RB3_P2-3	G10	CSP3	72,09	1	1	1
86	RB3_P2-3	G11	OLP3	58,86	1	1	1
87	RB3_P2-3	G12	OLP3	60,32	1	1	1
88	RB3_P2-3	H3	OSN3	61,22	1	1	1
89	RB3_P2-3	H10	CSP3	49,48	0	0	1
90	RB3_P3-3	B2	OLP3	60,41	1	1	1
91	RB3_P3-3	C2	OLP3	52,98	0	1	1
92	RB3_P3-3	C8	OLN3	48,72	0	0	1
93	RB3_P3-3	D2	OLP3	43,4	0	0	0
94	RB3_P3-3	D7	CLN3	54,29	0	1	1
95	RB3_P3-3	F1	OLP3	47,47	0	0	0
96	RB3_P3-3	G1	OLP3	62,84	1	1	1
97	RB3_P3-3	G3	CLP3	51,47	0	0	1
98	RB3_P3-3	G8	OLN3	58,12	1	1	1
99	RB3_P3-3	G9	OLN3	56,2	0	1	1
100	RB4_P1-4	A9	CSN	56,72	1	1	1
101	RB4_P1-4	B8	CRN	54,6	0	1	1
102	RB4_P1-4	B12	CSN	62,81	1	1	1
103	RB4_P1-4	C8	CRN	50,87	0	0	1
104	RB4_P1-4	C9	CSN	52,94	0	1	1
105	RB4_P1-4	D9	CSN	51,56	0	0	1
106	RB4_P1-4	D12	CSN	48,28	0	0	1
107	RB4_P1-4	E12	CSN	53,71	0	1	1
108	RB4_P1-4	G11	CSN	56,65	1	1	1
109	RB4_P1-4	H10	CSN	59,26	1	1	1
110	RB4_P2-4	A1	CSP	41,21	0	0	0
111	RB4_P2-4	A6	CLN	53	0	1	1
112	RB4_P2-4	B1	CSP	54,6	0	1	1
113	RB4_P2-4	B4	CSP	53,02	0	1	1
114	RB4_P2-4	C3	CSP	59,65	1	1	1
115	RB4_P2-4	D1	CSP	48,54	0	0	1
116	RB4_P2-4	D4	CSP	61,63	1	1	1
117	RB4_P2-4	E1	CSP	50,3	0	0	1
118	RB4_P2-4	E2	CSP	54,1	0	1	1
119	RB4_P2-4	E4	CSP	51,96	0	0	1
120	RB4_P2-4	F1	CSP	60,91	1	1	1

Tabela Suplementar 2. Continuação.

COMUNIDADE	PLACA	ID	ORIGEM	RESP_TRAT	> Q3_RESP	> Q2_RESP	> Q1_RESP
121	RB4_P2-4	G3	CSP	53,38	0	1	1
122	RB4_P2-4	H1	CSP	65,45	1	1	1
123	RB4_P3-4	A10	OSN	42,35	0	0	0
124	RB4_P3-4	A12	OSN	54,75	0	1	1
125	RB4_P3-4	C7	ORN	48,09	0	0	1
126	RB4_P3-4	C8	ORN	51,61	0	0	1
127	RB4_P3-4	C9	OSN	51,92	0	0	1
128	RB4_P3-4	C12	OSN	42,41	0	0	0
129	RB4_P3-4	D11	OSN	43,19	0	0	0
130	RB4_P3-4	E7	ORN	54,1	0	1	1
131	RB4_P3-4	E11	OSN	40,12	0	0	0
132	RB4_P4-4	A1	OSP	57,33	1	1	1
133	RB4_P4-4	A6	OLP	50,68	0	0	1
134	RB4_P4-4	B8	OLP	50	0	0	1
135	RB4_P4-4	D7	OLP	62,81	1	1	1
136	RB4_P4-4	D8	OLP	59,39	1	1	1
137	RB4_P4-4	D9	OLN	54,29	0	1	1
138	RB4_P4-4	E4	OSP	52,21	0	1	1
139	RB4_P4-4	E6	OLP	55,77	0	1	1
140	RB4_P4-4	E7	OLP	52,98	0	1	1
141	RB4_P4-4	F1	OSP	52,41	0	1	1
142	RB4_P4-4	F5	OLP	50,41	0	0	1
143	RB4_P4-4	F6	OLP	51,69	0	0	1
144	RB4_P4-4	F9	OLN	47,62	0	0	0
145	RB4_P4-4	G2	OSP	60,4	1	1	1
146	RB4_P4-4	G10	OLN	48,06	0	0	1
147	RB4_P4-4	H7	OLP	44,85	0	0	0
148	RB4_P4-4	H9	OLN	57,59	1	1	1