UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Luana Patrícia Pinto Körber

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTIRPES BACTERIANAS ENDOFÍTICAS NO ALGODOEIRO

Porto Alegre
2025

Luana Patrícia Pinto Körber

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTIRPES BACTERIANAS ENDOFÍTICAS NO ALGODOEIRO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de doutor(a) em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientador(a): Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

Porto Alegre
2025

CIP - CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

Körber, Luana Patrícia Pinto
Potencial biotecnológico de estirpes bacterianas endofíticas no algodoeiro / Luana Patrícia Pinto Körber. -- 2026.
107 f.
Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2026.

1. Solubilização. 2. Inoculantes. 3. Promoção de crescimento. 4. Fixação de nitrogênio. I. de Sá, Enilson Luiz Saccol, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz e os seus planos serão bem-sucedidos.”

Provérbios 16:3

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permitir que eu desempenhasse este trabalho da melhor maneira possível com fé, foco e determinação;

Ao meu companheiro de vida, Ângelo Körber, por toda a paciência, suporte, estímulo e ajuda, por nunca ter soltado a minha mão em todo esse caminho;

À minha família que sempre estiveram comigo me estimulando a me provar e nunca parar de estudar;

Ao meu professor orientador Enilson Luíz Saccol de Sá, um ser de luz com um coração enorme que me aceitou e trilhou esse caminho comigo da melhor maneira que conseguimos, meu muito obrigado.

A minha equipe do Laboratório de Recursos Biológicos, agradeço principalmente pela paciência e pelas palavras de apoio.

Aos colegas do meu grupo de pesquisa, especialmente a Jéssica, pelas palavras e apoio mesmo a uma certa distância, se fez presente.

Aos meus colegas Thiago Ribeiro e Wesley Rivadavea, que me deram todo o suporte técnico em microbiologia e desenvolvimento de protocolos;

Ao Emerson Colpo que me instigou imensamente a iniciar essa jornada;

À Fernanda Zilles por todas as conversas e apoio.

Ao Arthur Almeida, Tiago Madalosso e Guilherme Scheffer que sempre me deram o direcionamento interno para desenvolver um ótimo projeto com futuros frutos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS);

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA), que me ofereceu a possibilidade de desenvolver a tese.

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE ESTIRPES BACTERIANAS ENDOFÍTICAS NO ALGODOEIRO

Autor: Luana Patrícia Pinto Körber

Orientador(a): Prof(ª). Dr(ª). Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

As bactérias endofíticas são microrganismos capazes de promover o crescimento vegetal por meio de mecanismos diretos e indiretos. O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), uma das principais commodities agrícolas mundiais e cultura estratégica para o Brasil, apresenta elevada dependência de fertilizantes, tornando a prospecção de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) uma alternativa relevante para aumento da eficiência agronômica. Este estudo teve como objetivo isolar bactérias endofíticas de raízes de algodoeiro cultivado em área comercial em Sapezal, MT, e avaliar seu potencial biotecnológico na promoção de crescimento inicial sob condição de 50 % do nitrogênio recomendado. Foram obtidas 221 estirpes a partir de três cultivares comerciais, utilizando diferentes meios seletivos. As estirpes foram avaliadas quanto à fixação biológica de nitrogênio (FBN) em vida livre, produção de ácido indolacético (AIA), solubilização de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) e de silicato de potássio (K_2SiO_4), além da promoção de crescimento *in vitro*. Do total, 35,3 % apresentaram crescimento em meio NFb, 21,7 % solubilizaram $Ca_3(PO_4)_2$, 28,9 % solubilizaram K_2SiO_4 e 10,9 % produziram AIA ≥ 10 µg.mL^{-1}. A caracterização molecular indicou elevada diversidade genética entre as estirpes, contribuindo para a identificação de isolados funcionalmente distintos. Estirpes multifuncionais foram identificadas, com destaque para aquelas capazes de combinar solubilização de nutrientes e fixação biológica de nitrogênio. A análise multivariada evidenciou estirpes com maior eficiência no acúmulo de biomassa sob nitrogênio reduzido *in vitro*, apresentando desempenho equivalente ou superior aos controles. Os resultados demonstram que estirpes endofíticas nativas do algodoeiro apresentam elevado potencial funcional e biotecnológico, sendo candidatas promissoras para o desenvolvimento de inoculantes voltados à redução do uso de fertilizantes nitrogenados, contribuindo para maior eficiência no uso do nutriente na cultura.

Palavras-chave: solubilização; inoculantes; promoção de crescimento; fixação de nitrogênio.

[1]Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (107 p.) abril, 2026.

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF ENDOPHYTIC BACTERIAL STRAINS IN COTTON

Autor: Luana Patrícia Pinto Körber

Orientador(a): Prof[(a)]. Dr[(a)]. Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT

Endophytic bacteria are microorganisms capable of promoting plant growth through direct and indirect mechanisms. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), one of the main global agricultural commodities and a strategic crop for Brazil, exhibits a high dependence on fertilizers, making the prospecting of plant growth-promoting bacteria (PGPB) a relevant alternative to increase agronomic efficiency. This study aimed to isolate endophytic bacteria from roots of cotton plants cultivated in a commercial field in Sapezal, MT, and to evaluate their biotechnological potential in promoting early plant growth under a condition of 50% of the recommended nitrogen level. A total of 221 strains were obtained from three commercial cultivars using different selective media. The strains were evaluated for free-living biological nitrogen fixation (BNF), indole-3-acetic acid (IAA) production, solubilization of tricalcium phosphate ($Ca_3(PO_4)_2$) and potassium silicate (K_2SiO_4), as well as for *in vitro* plant growth promotion. Among the isolates, 35.3% showed growth in NFb medium, 21.7% solubilized $Ca_3(PO_4)_2$, 28.9% solubilized K_2SiO_4, and 10.9% produced IAA ≥ 10 µg mL^{-1}. Molecular characterization indicated high genetic diversity among the strains, contributing to the identification of functionally distinct isolates. Multifunctional strains were identified, particularly those capable of combining nutrient solubilization and biological nitrogen fixation. Multivariate analysis highlighted strains with greater efficiency in biomass accumulation under reduced nitrogen conditions *in vitro*, showing performance equivalent to or higher than the controls. The results demonstrate that native endophytic strains from cotton exhibit high functional and biotechnological potential, representing promising candidates for the development of inoculants aimed at reducing nitrogen fertilizer use and improving nutrient use efficiency in the crop.

Keywords: solubilization; inoculants; growth promotion; nitrogen fixation.

[1]Doctoral Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (107 p.) April, 2026.

Sumário

1. INTRODUÇÃO 1
2. HIPÓTESE 3
3. OBJETIVOS 4
3.1 Objetivo Geral 4
3.2 Objetivos Específicos 4
4. REVISÃO DA LITERATURA 5
4.1 O cultivo do algodão no Brasil 5
4.2 Relações microrganismos e planta-hospedeiras 7
4.3 Bactérias endofíticas e mecanismos promotores de crescimento 10
4.4 Uso de microrganismos promotores de crescimento em algodoeiro 12
5. MATERIAL E MÉTODOS 15
5.1 Caracterização da área e amostragem 15
5.2 Obtenção dos isolados de bactérias endofíticas 16
5.3 Capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) de vida livre 17
5.4 Solubilização de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) e solubilização de silicato de potássio (K_2SiO_4) 17
5.5 Quantificação da produção de ácido indolacético (AIA) 18
5.6 Teste *in vitro* para promoção de crescimento em algodoeiro 18
5.7 Extração de DNA das estirpes bacterianas endofíticas selecionadas 19
5.8 Análise de diversidade genômica de fragmentos gerados por BOX-PCR 20
5.9 Análise estatística e correlação dos dados 20
6. ARTIGOS 23
6.1 ARTIGO 1: Promoción del crecimiento en algodón por bacterias endófitas diazotróficas 23
6.2 ARTIGO 2: Growth promotion in cotton by endophytic spore-forming bacilos strains producing indole-3-acetic acido (IAA) 42
7. RESULTADOS GERAIS 60
7.1 Quantificação dos isolados bacterianos de plantas do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e caracterização das estirpes selecionadas 60
7.2 Dendrogramas de similaridades estirpes Gram-negativas e Gram-positivas 63
7.3 Mecanismos de promoção de crescimento: fixação de N_2, solubilização de P/K e

produção de AIA 68
7.4 Promoção de crescimento *in vitro* em plântulas de algodoeiro (TMG47B2RF)75
8. DISCUSSÃO GERAL..... 81
9. CONCLUSÃO 89
10. REFERÊNCIAS..... 90
11. APÊNDICES 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantificação de colônias de bactérias endofíticas isoladas de macerado de raízes de algodoeiro, por variedade e meio de cultura. 600
Tabela 2: Isolados bacterianos endofíticos de raizés de algodoeiro selecionados para avaliação quanto à morfologia colonial e características promotoras de crescimento de plantas.....611
Tabela 3: Morfologia celular e coloração de Gram dos isolados bacterianos endofíticos de raiz de algodoeiro estudados.....622
Tabela 4: Morfologia celular dos isolados bacterianos endofíticos de raiz de algodoeiro por meio de cultura. 633
Tabela 5: Interseções significativas entre funções de promoção de crescimento vegetal em estirpes bacterianas endofíticas do algodoeiro.....744
Tabela 6: Desempenho univariado (CA, CR, MSA, MSR) de plântulas de algodoeiro TMG47B2RF inoculadas com estirpes endofíticas de raiz de algodoeiro selecionadas em comparação aos controles (N50, N100 e AZOS). 755
Tabela 7: Estirpes endofíticas selecionadas com desempenho de promoção de crescimento *in vitro* e em mecanismos de promoção de crescimento avaliados. 800

Artigo 1: Promoción del crecimiento en algodón por bacterias endófitas diazotróficas

Tabla 1: Número de aislados endófitos obtenidos por variedad y medio de cultivo en el aislamiento de raíces de algodonero…..... 37

Artigo 2: Growth promotion in cotton by endophytic spore-forming bacilos strains producing indole-3-acetic acido (IAA)

Tabela 1: Crescimento inicial de plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) inoculadas com as estirpes endofíticas de bacilos Gram-positivos esporulados selecionados com base no incremento significativo de massa seca da parte aérea (MSA) 50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Pontos em que foram realizadas as coletas de plantas de algodoeiro para isolamento das estirpes endofíticas. 16
Figura 2: Número de isolados bacterianos endofíticos obtidos a partir de raízes de três variedades de algodoeiro, distribuídos por meio de cultura seletivo. As barras empilhadas representam a contribuição de cada meio: King B (preferencialmente *Pseudomonas*), NA (bacilos Gram-positivos esporulados), NFb (bactérias fixadoras de N_2 de vida livre) e YMA (rizóbios). 611
Figura 3: Dendrograma de similaridade genética das estirpes Gram-positivas endofíticas de bacilos esporulados isoladas da raiz de algodoeiro 65
Figura 4: Dendrograma de similaridade genética das estirpes Gram-negativas endofíticas de raiz de algodoeiro 68
Figura 5: Índice de solubilização (IS) de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) em meio NBRIP dos isolados bacterianos endofíticos de raiz de algodoeiro 69
Figura 6: Índice de solubilização de silicato de potássio (K_2SiO_4) dos isolados bacterianos endofíticos de raiz de algodoeiro em meio Aleksandrov. 700
Figura 7: Produção de ácido indolacético (AIA) por estirpes endofíticas de raiz de algodoeiro. 711
Figura 8: Produção de ácido indolacético (AIA) por estirpes bacterianas endofíticas de raiz de algodoeiro com média acima de 10,00 µg ml^{-1} 722
Figura 9: Diagrama de Venn representando as interseções significativas entre as funções de bioquímicas em estirpes endofíticas da raiz do algodoeiro. 733
Figura 10: Massa seca da parte aérea (MSA) de plântulas de algodoeiro, variedade TMG47B2RF inoculadas com estirpes bacterianas endofíticas de raiz de algodoeiro selecionadas em comparação aos controles N50, N100 e AZOS. 777
Figura 11: Massa seca da raiz (MSR) de plântulas de algodoeiro, variedade TMG47B2RF inoculadas com estirpes bacterianas endofíticas selecionadas em comparação aos controles N50, N100 e AZOS. 788
Figura 12: Análise de componentes principais (PCA) com base nas variáveis de promoção de crescimento na variedade de algodoeiro TMG47B2RF 79

Artigo 1: Promoción del crecimiento en algodón por bacterias endófitas diazotróficas

Figura 1: (a) Índice de solubilización (IS) de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) obtenido en ensayos *in vitro* con bacterias endófitas de algodonero. (b). Índice de solubilización (IS) de silicato de potasio (K_2SiO_4) obtenido en ensayos *in vitro* con bacterias endófitas de algodonero… 38
Figure 2: Producción de auxinas ($\mu g \cdot mL^{-1}$) por bacterias endófitas aisladas de algodonero.399
Figure 3: Dendrograma de similitud entre grupos bacterianos obtenidos a partir de variables de crecimiento de algodonero cultivado *in vitro* en comparación con controles; análisis con corte al 80 % de similitud mediante agrupamiento jerárquico (Ward). 40
Figure 4: Análisis de componentes principales (PCA) con base en variables agronómicas evaluadas en la variedad de algodonero TMG47B2RF (CR: longitud de raíz; CA: longitud de parte aérea; MSA: masa seca de parte aérea; MSR: masa seca de raíz)..... 41

Artigo 2: Promotion of cotton growth by indole-3-acetic acido-producing endophytic *Bacillus* strains

Figura 1: Produção de ácido indolacético (AIA) por estirpes Gram-positivas endofíticas de *Bacillus* isoladas de raiz de algodoeiro. 49
Figura 2: Análise de componentes principais (PCA) baseada nas variáveis de promoção de crescimento na variedade de algodoeiro TMG47B2RF. 52
Figura 3: Dendrograma de similaridade genética das estirpes endofíticas de bacilos esporulantes isoladas de raiz de algodoeiro, obtido pelo método UPGMA a partir de perfis BOX-PCR. 55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRAPA	Associação Brasileira dos Produtores de Algodão
ACC-deaminase	1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminase
AIA	Ácido Indolacético
AIA > Q3 ∩ P ∩ K	Estirpes com AIA acima de Q3 e Positivas para P e K
AIA > Q3 ∩ FBN	Estirpes com Solub. De K e FBN Positiva
AIA $\mu g.ml^{-1}$	Produção de Ácido Indolacético em Micrograma por mililitro
Aleksandrov	Meio de Aleksandrov para Bactérias Solubilizadoras de Potássio
ALxxx	Código das Estirpes
Am	Clima Tropical Úmido/subúmido
ANOVA	Análise de Variância
AZOS	Tratamento com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 + N50
A. brasilense	*Azospirillum brasilense* Ab-V5 (Bactéria Diazotrófica de Vida Livre)
Bacillus spp.	Bacilos Gram-positivos
Bastonetes	Forma Celular
BOX-PCR	Amplificação de regiões BOX por PCR
BPCV	Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal
CA	Comprimento de Parte Aérea
$Ca_3(PO_4)_2$	Fosfato Tricálcico
$CaCl_2.2H_2O$	Cloreto de Cálcio Dihidratado
$CaCO_3$	Carbonato de Cálcio
$Ca(NO_3)_2.5H_2O$	Nitrato de Cálcio Pentahidratado
cm	Centímetros
Cocos	Forma Celular
Cocobacilos	Forma Celular
Conab	Companhia Nacional de Abastecimento
CR	Comprimento de Raiz
DAE	Dias Após Emergência
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ExpDes	Pacote R para Delineamentos

Factoextra	Pacote R para Visualização Multivariada
FactoMineR	Pacote R para Análise Multivariada
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
FBN ∩ K ∩ AIA	Três Mecanismos Combinados de Fixação de N_2, Solub. De K e AIA
$FeCl_3$	Cloreto de Ferro (III)
FeEDTA	Ferro-EDTA
FMA	Fungos Micorrízicos Arbusculares
FM985GLTP	Variedade de Algodoeiro
Games-Howell	Teste de Comparação Múltiplas para Variância Desiguais
GelJ	*Software* para Análise de Bandas
Gram + / Gram -	Classificação da Coloração de Gram
IS	Índice de Solubilização
ISR	Indução de Resistência Sistêmica
Jaccard	Índice de Similaridade
K	Potássio
KASVI	Marca do Transluminador
K_2SiO_4	Silicato de Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
kg/ha	Quilograma por Hectare
KH_2PO_4	Fosfato de Potássio Monobásico
King B	Meio para *Pseudomonas* spp.
KNO_3	Nitrato de Potássio
K ∩ FBN	Solubilização de K + FBN
LED	Light-Emitting Diode
MFA	Massa Fresca de Parte Aérea
MFR	Massa Fresca de Raiz
mg	Miligramas (unidade de massa)
$MgSO_4.7H_2O$	Sulfato de Magnésio Heptahidratado
ml	Mililitro (unidade de medida)
MSA	Massa Seca de Parte Aérea
MSR	Massa Seca de Raiz
MT	Mato Grosso

$mg.ml^{-1}$	Miligrama por Mililitro
$\mu g.ml^{-1}$	Micrograma por Mililitro
N	Nitrogênio
N°	Número (contagem de estirpes)
N_2	Nitrogênio Molecular (estado gasoso)
N50	Controle com 50 % da Dose de N da Solução Nutritiva
N100	Controle com 100 % da Dose de N da Solução Nutritiva
NA	Nutrient Agar
NBRIP	National Botanical Research Institute's Phosphate medium
NFb	Meio Semissólido Para Fixadores de N_2 de Vida Livre
NPK	Nitrogênio (N), Fósforo (P), Potássio (K)
n/s	Não significativo (Diferença Não Significativa)
P	Fósforo
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC1	Primeiro Componente Principal
PC2	Segundo Componente Principal
PCA	Principal Component Analysis
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
$P \cap K \cap FBN$	Interseção de Estipes com Solub. De K, Solub. De P e FBN Positiva
Q1	Primeiro Quartil da Distribuição dos Valores de AIA
Q2	Segundo Quartil da Distribuição dos Valores de AIA
Q3	Terceiro Quartil da Distribuição dos Valores de AIA
RStudio	Ambiente de Desenvolvimento R
Safer Dye	Corante Não-Mutagênico
Scott-Knott	Teste de Agrupamento de Médias
Spearman	Coeficiente de Correlação de Spearman entre MSA e MSR
sp.	Espécie
spp.	Espécies
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TMG44B2RF	Variedade de Algodoeiro
TMG47B2RF	Variedade de Algodoeiro

Trp	Triptofano (precursor de AIA)
TSB	Tryptic Soy Broth
UFC/ml	Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro
Unid	Unidade
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
USDA	United States Department of Agriculture
YMA	Yeast Mannitol Agar
°C	Graus Celsius
%	Percentual
“-“na tabela	Não Detectado

1. INTRODUÇÃO

A demanda global por grãos e fibras tem crescido de forma contínua nas últimas décadas, tendência que deve se manter no médio e longo prazo. Paralelamente, políticas ambientais mais rigorosas, especialmente em países importadores, como da União Europeia, vêm impulsionando transformações nas cadeias produtivas. O consumidor final, cada vez mais atento às práticas agrícolas, pressiona por sistemas de produção sustentáveis e rastreáveis.

O Brasil, como um dos maiores exportadores de matérias-primas, entre elas grãos e fibras, ocupa posição estratégica no abastecimento global e no fornecimento de insumos para as indústrias alimentícia e têxtil. Nesse contexto, o valor agregado dos produtos agrícolas torna-se determinante para a competitividade, redefinindo padrões de produção e consumo.

A cultura do algodão apresenta elevada relevância econômica em escala global, com produção anual da ordem de dezenas de milhões de toneladas de fibra, ocupando posição estratégica no agronegócio brasileiro. Com isso, tem passado por reformulações no manejo, com ênfase na adoção de insumos e tecnologias menos agressivos ao ambiente. Entre as alternativas em ascensão, destacam-se os produtos biológicos, que contribuem para o estabelecimento inicial dos cultivos, para a solubilização, a absorção de nutrientes e para a promoção do crescimento vegetal.

Embora já existam diversos inoculantes registrados como promotores de crescimento e fixadores de nitrogênio em culturas amplamente cultivadas no Brasil, como soja, milho, trigo, arroz, feijão e cana-de-açúcar, a oferta de soluções específicas para o algodoeiro ainda é limitada.

Atualmente, recomenda-se sobretudo o uso de microrganismos do gênero *Azospirillum*, em razão do hábito de vida livre e da capacidade de associação com diferentes espécies vegetais. No entanto, na cultura do algodoeiro, os custos com adubação NPK ainda são expressivos, com destaque para o nitrogênio. A ureia, principal fonte nitrogenada, é obtida de recursos não renováveis, apresentou aumento de preço nos últimos anos e está associada a impactos ambientais, como a lixiviação de nitratos para corpos d’água e lençóis freáticos.

Diante deste cenário, intensificam-se os esforços de pesquisa e

desenvolvimento de bioinsumos. A prospecção de bactérias endofíticas com potencial promotor de crescimento desponta como uma estratégia promissora para o algodoeiro, por explorar interações mutualísticas capazes de otimizar a assimilação de nutrientes, reduzir a dependência de fertilizantes sintéticos e aumentar a eficiência dos sistemas produtivos.

Dessa forma, este estudo justifica-se pela necessidade de soluções biotecnológicas que conciliem produtividade e sustentabilidade no cultivo do algodoeiro, ampliem o portfólio de bioinsumos disponíveis para a cultura, mitiguem custos associados à adubação nitrogenada e minimizem impactos ambientais. A investigação, o isolamento e a caracterização de estirpes bacterianas endofíticas com potencial de promoção de crescimento configuram um caminho consistente para agregar valor à cadeia de produção do algodão, fortalecer a competitividade do setor e apoiar práticas agrícolas alinhadas às demandas atuais do mercado e da sociedade.

2. HIPÓTESE

Bactérias endofíticas isoladas de plantas de algodão, obtidas de áreas de cultivo com histórico contínuo de produção por múltiplos ciclos agrícolas, são eficientes na promoção de crescimento em algodoeiro. Tais bactérias apresentam diferentes mecanismos fisiológicos e metabólicos, como fixação biológica de nitrogênio, produção de ácido indolacético (AIA) e solubilização de nutrientes, que podem contribuir para o desenvolvimento vegetal.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Isolar bactérias endofíticas a partir das raízes de plantas de algodão da região Sudoeste do Estado do Mato Grosso para avaliar o potencial biotecnológico destas quanto à promoção de crescimento vegetal em algodoeiro.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Isolar bactérias endofíticas das raízes de algodoeiro das cultivares TMG47B2RF, TMG44B2RF e FM985GLTP utilizando os meios de cultura NFb, King B, NA e YMA.

3.2.2 Testar e selecionar os isolados bacterianos fixadores de nitrogênio;

3.2.3 Testar e selecionar os isolados bacterianos com alta capacidade de produção de ácido indolacético (AIA);

3.2.4 Testar e selecionar os isolados bacterianos quanto a solubilização de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) e silicato de potássio (K_2SiO_4);

3.2.5 Verificar o efeito das estirpes selecionadas quanto à promoção de crescimento inicial em algodoeiro, considerando adubação nitrogenada reduzida.

4. REVISÃO DA LITERATURA

4.1 O cultivo do algodão no Brasil

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.), pertencente à família Malvaceae, é uma das culturas agrícolas mais antigas e cultivadas pela humanidade, com registros históricos de uso por diversas civilizações para a produção de fibras e tecidos. No Brasil, evidências indicam que povos indígenas já utilizavam o algodão na confecção de redes, mantas e utensílios, muito antes da colonização europeia (BELTRÃO; AZEVEDO, 2008).

A cotonicultura estruturada ganhou destaque econômico no século XVIII, com o Maranhão consolidando-se como o primeiro polo exportador, projetando o algodão brasileiro no mercado internacional (ROSSI et al., 2020; FERREIRA et al., 2022).

A partir da década de 1980, a cotonicultura nacional passou por um processo de transformação significativa. A ocorrência do bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*), praga exótica que devastou lavouras nordestinas, provocou o deslocamento do eixo produtivo para a região do Cerrado brasileiro (SILVA; RAMALHO, 2013). Essa mudança foi acompanhada da adoção de novas cultivares, com fibras médias, ciclo mais curto e maior potencial produtivo, favorecendo o uso de tecnologias mais modernas e sistemas de cultivo mecanizados (RAMOS et al., 2022).

No início do século XXI, a cotonicultura brasileira passou por um processo intenso de modernização tecnológica, marcado pela incorporação de sementes geneticamente melhoradas, mecanização agrícola e integração com culturas como a soja (*Glycine max* (L.) Merr) (ALANE; PANDOLFI, 2019).

Em escala global, a produção de algodão é liderada pela China, seguida pela Índia e pelos Estados Unidos, sendo este último o principal exportador mundial da fibra. Neste contexto, o Brasil ocupa a quarta posição entre os maiores produtores globais e a segunda colocação em volume de exportações, com os estados de Mato Grosso e Bahia respondendo conjuntamente por cerca de 80 % da produção nacional (MROJINSKI et al., 2020; FERREIRA et al., 2022).

Segundo dados da Conab (2025), a safra 2023/24 produziu cerca de

3,04 milhões de toneladas de pluma e projeções indicam que a produção pode alcançar 3,9 milhões de toneladas na safra 2024/25, evidenciando o papel estratégico da cultura para a balança comercial brasileira (ABRAPA, 2023; USDA, 2025).

O principal produto da cultura é a pluma, amplamente utilizada na indústria têxtil para a fabricação de fios, tecidos, algodão hidrófilo, cotonetes e diversos outros derivados (ROSSI et al., 2020). Entretanto, os subprodutos também apresentam elevado valor econômico: as sementes são aproveitadas na produção de óleo vegetal e ração animal, o caroço pode ser utilizado como combustível renovável e as fibrilas encontram aplicação na fabricação de feltros e estofamentos (FERREIRA et al., 2022). O aproveitamento integral da planta fortalece a cadeia produtiva, gerando maior sustentabilidade econômica.

Apesar dos avanços tecnológicos, o algodoeiro é considerado uma cultura altamente exigente em nutrientes. Para alcançar níveis elevados de produtividade, são necessários, em média 180 a 200 kg/ha de nitrogênio (N), 120 a 180 kg/ha de potássio (K) e 70 a 130 kg/ha de fósforo (P), geralmente aplicados em múltiplas etapas durante o ciclo da cultura (SANTOS et al., 2020). A ureia é a principal fonte de nitrogênio utilizada, seguida pelo sulfato de amônio e pelo nitrato de amônio, insumos fundamentais para o crescimento vegetativo, na formação radicular e a qualidade de fibra (KHAN et al., 2017).

Nos solos do Cerrado brasileiro, onde se concentra a maior parte da produção, predominam características como alta acidez natural e baixa disponibilidade de fósforo e potássio, fatores que exigem o uso intensivo de fertilizantes minerais e corretivos (AQUINO et al., 2012; KANEKO et al., 2014). Essa elevada dependência de insumos aumenta os custos de produção e gera riscos ambientais, como lixiviação de nutrientes, contaminação de águas subterrâneas e compactação do solo (FERREIRA et al., 2022).

A adubação nitrogenada, em particular, representa um dos maiores desafios da cotonicultura. A ureia, principal fonte utilizada, é derivada de recursos não renováveis, e está associada à lixiviação de nitratos e à emissão de gases de efeito estufa, com impactos ambientais significativos (ROSOLEM, 2001). Além disso, doses inadequadas podem desequilibrar o desenvolvimento fisiológico das plantas, estimulando crescimento vegetativo excessivo e

prejudicando a formação dos capulhos, ou seja, o fruto (GEIB et al., 2015).

Diante deste cenário, o setor enfrenta o desafio de conciliar alta produtividade com sustentabilidade. A crescente demanda do mercado internacional por produtos de baixo impacto ambiental impulsiona o desenvolvimento de novas biotecnologias. Nesse contexto, os microrganismos promotores de crescimento vegetal (BPCV) surgem como alternativa promissora, capazes de otimizar a absorção de nutrientes, reduzir a dependência de fertilizantes químicos e minimizar os impactos ambientais da cotonicultura (ZHAO et al., 2024).

Nesse contexto, compreender as interações entre microrganismos e plantas-hospedeiras torna-se essencial para identificar estratégias biotecnológicas que promovam o crescimento vegetal e reduzam a dependência de insumos químicos.

4.2 Relações microrganismos e plantas-hospedeiras

Os microrganismos do solo constituem uma das comunidades mais abundantes e diversificadas dos ecossistemas terrestres. Estima-se que um único grama de solo possa conter mais de 100 milhões de bactérias, cada grupo desempenhando funções essenciais na ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica e manutenção da fertilidade (TORSVIK; OVREAS, 2002). No solo, a rizosfera destaca-se como região de maior diversidade microbiana, onde ocorre intensa interação entre raízes e bactérias (TURATTO et al., 2018).

As rizobactérias desempenham papel central em processos biogeoquímicos como a solubilização de nutrientes, produção de fitormônios e síntese de metabólitos antimicrobianos, favorecendo o crescimento vegetal, aumentando a resistência a patógenos e favorecendo a adaptação da planta ao ambiente (RODRÍGUEZ et al., 2020).

As associações planta-microrganismo resultam de um processo evolutivo que selecionou relações mutualísticas altamente específicas. Um exemplo clássico é a simbiose entre espécies do gênero *Bradyrhizobium* e a soja, que possibilita a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (HUNGRIA; MENDES, 2015). Nessa associação, as bactérias formam nódulos radiculares e convertem o nitrogênio atmosférico (N_2) em formas assimiláveis, suprindo a

necessidade de nitrogênio da cultura e reduzindo a dependência de fertilizantes nitrogenados (DURÁN et al., 2014; CAIXETA; REIS, 2023).

Em leguminosas, os rizóbios são fundamentais para suprir as demandas nutricionais, possibilitando a manutenção de altos rendimentos com menor uso de nitrogênio mineral. Em feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), por exemplo, a inoculação com rizóbios comerciais pode aumentar significativamente a produtividade, inclusive em áreas sem histórico de cultivo (BRITO et al., 2015; SOARES et al., 2016).

Estudos recentes com feijão-carioca demonstraram que a inoculação com *Rhizobium tropici* (Cepas Semia 4077, Semia 4080 e Semia 4088), associada à co-inoculação com *Azospirillum brasilense* (inoculante comercial) e suplementação com micronutrientes, melhorou a produtividade semelhante ao manejo convencional, mas com redução de custo de produção (RIBEIRO et al., 2024).

A ampliação do conhecimento sobre a fixação biológica de nitrogênio em plantas não-leguminosas representa um avanço conceitual importante na microbiologia agrícola, ao demonstrar que esse processo não se restringe aos sistemas nodulares clássicos. Estudos pioneiros conduzidos no Brasil evidenciaram a ocorrência de associações diazotróficas em gramíneas tropicais, estabelecendo o conceito de fixação biológica de nitrogênio associativa (DÖBEREINER, 1978; BALDANI et al., 1987).

Esses trabalhos contribuíram para a caracterização do gênero *Azospirillum*, incluindo *A. brasilense*, consolidando esse grupo como um dos principais modelos de bactérias promotoras de crescimento vegetal associadas a culturas não-leguminosas pela sua capacidade de colonizar raízes de gramíneas, como o milho, promovendo fixação parcial de nitrogênio, a estimulação do crescimento radicular via produção de fitormônios e o aumento da tolerância a estresses abióticos (DÖBEREINER et al., 1995; KAPPES et al., 2013).

Em geral, a inoculação com *Azospirillum* (estirpes Ab-V5 e Ab-V6) pode elevar a produtividade em 24-30 % dependendo do híbrido, permitindo reduzir as doses de adubação nitrogenada sem comprometer o rendimento (SANTOS et al., 2021). Os benefícios dessas bactérias também se estendem à

cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), onde a aplicação de *Azospirillum* (Ab-V5 e Ab-V6) resulta em maior crescimento do colmo, incremento de biomassa e acúmulo de matéria seca, potencializando a produtividade mesmo com doses menores de fertilizantes nitrogenados (GÍRIO et al., 2015; MOURA et al., 2019; WATANABE et al., 2023).

De forma semelhante, em pastagens, como aveia preta (*Avena strigosa* Schreb), aveia branca (*Avena sativa* L.) e azevém (*Lolium multiforum* Lam.), a inoculação promove um acúmulo significativo de biomassa, permitindo reduzir substancialmente as doses de nitrogênio sem perdas agronômicas (BRUM et al., 2021). Em espécies como a fava (*Vicia faba*) o uso de isolados nativos de rizóbios mostrou potencial para substituir inoculantes comerciais, favorecendo a sustentabilidade do sistema produtivo e a adaptação às condições edafoclimáticas locais (MESELE et al., 2025).

Em sistemas silvipastoris, a leucena (*Leucaena leucocephala)* depende dos rizóbios para a FBN e maior eficiência produtiva. Um estudo identificou espécies nativas eficientes que aumentam o crescimento e a assimilação de nitrogênio pela planta (CUBILLOS-HINOJOSA et al., 2021). Recentemente a co-inoculação com rizóbios, *A. brasilense* e substâncias húmicas potencializou a biomassa e a FBN em leucena e feijão-fava permitindo reduzir o uso de fertilizantes nitrogenados (CUBILLOS-HINOJOSA et al., 2024).

Estudos com fungos micorrízicos arbusculares (FMA) reforçam a sua importância nas interações planta-microrganismo em diferentes culturas, evidenciando seu potencial em otimizar a absorção de nutrientes e aumentar a tolerância a estresses ambientais. Em culturas como girassol (*Helianthus annuus* L.) e abóbora (*Cucurbita* spp.), a inoculação com *Funneliformis mosseae* (FMA) resultou em maior eficiência nutricional, incremento de biomassa e melhora na qualidade do óleo produzido (ALAYAFI et al., 2025).

Em milho (*Zea mays* L.) o uso de FMA promoveu aumentos de rendimento entre 12 % e 40 % superando os ganhos obtidos apenas com o melhoramento genético tradicional (LUTZ et al., 2023). Além disso, estudos demonstram que plantas inoculadas com FMA apresentam maior eficiência fotossintética e acúmulo de clorofila em condições de baixa temperatura (CHOWDHARY et al., 2025).

4.3 Bactérias endofíticas e mecanismos promotores de crescimento

Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são microrganismos capazes de estimular o desenvolvimento da planta por diferentes mecanismos, que podem atuar de forma direta ou indireta sobre a planta. Esses efeitos incluem desde a otimização da absorção de nutrientes até o aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos, além da proteção contra patógenos (ALMEIDA et al., 2017).

Durante o crescimento, as plantas selecionam comunidades microbianas específicas por meio de sinalizações químicas e coevolução, formando uma microbiota rizosférica própria para cada espécie vegetal, para cada cultura (MONNERATT et al., 2020). Entre esses microrganismos, destacam-se as bactérias endofíticas, que colonizam os tecidos internos da planta sem causar danos e podendo estabelecer interações mutualísticas, contribuindo para o metabolismo, adaptação e produtividade (AFZAL et al., 2019).

As bactérias endofíticas são encontradas em praticamente todos os órgãos vegetais, raízes, caules, folhas, flores, sementes e frutos, e apresentam diversas características que favorecem a interação com o hospedeiro, como a produção de enzimas hidrolíticas, polissacarídeos, comunicação via *quorum sensing* e estruturas de mobilidade, como flagelos (MEI; FLINN, 2010; SESSITSCH et al., 2012; HAHN et al., 2016).

O potencial agrícola destes microrganismos decorre da capacidade de promover crescimento por múltiplos mecanismos. Nos mecanismos diretos, destacam-se a fixação biológica de nitrogênio (FBN), que converte o N_2 atmosférico em formas assimiláveis pela planta, e a produção de fitormônios como auxinas, giberelinas e citocinina, responsáveis por estimular a divisão celular, o alongamento radicular e o desenvolvimento da parte aérea (ZULUAGA et al., 2020).

Além disso, muitas estirpes endofíticas atuam na solubilização de nutrientes pouco disponíveis, como fósforo, potássio, cálcio e silício, aumentam a disponibilidade de ferro por meio da síntese de sideróforos e liberam compostos orgânicos voláteis que modulam processos fisiológicos, otimizando o metabolismo vegetal (CHAVES et al., 2013).

Enquanto os mecanismos indiretos relacionam-se à proteção contra fitopatógenos e à adaptação da planta, a condições de estresse. Diversas bactérias endofíticas produzem antibióticos, lipopeptídeos e cianeto de hidrogênio, competindo com microrganismos invasores por espaço e nutrientes, além de sintetizarem enzimas líticas, como quitinases, celulases e proteases, que degradam as paredes celulares de fungos e bactérias patogênicas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Outro mecanismo importante é a indução de resistência sistêmica (IRS), que ativa genes de defesa na planta e a torna mais preparada para enfrentar infecções (GLICK, 2012). Em condições adversas, como seca, salinidade e temperaturas externas, muitas dessas bactérias produzem ACC-deaminase e reguladores osmóticos, aumentando a tolerância da planta a estresses abióticos (LIU et al., 2013).

Diversos gêneros bacterianos apresentam potencial biotecnológico com ampla aplicação agrícola, espécies do gênero *Pseudomonas*, como *Pseudomonas fluorescens*, são conhecidas por estimular o crescimento vegetal por meio da produção de AIA, solubilização de fósforo e potássio e biocontrole de patógenos, beneficiando culturas como soja, milho e arroz (GUIMARÃES; KLEIN, 2023). Espécies do gênero *Bacillus* também tem ganhado destaque, por formarem endósporos de resistência, apresentam maior adaptabilidade a condições ambientais adversas, sendo amplamente aplicadas em programas de biocontrole e biofertilização (LIU et al., 2013).

Em um estudo, foi possível identificar estirpes de *Bacillus* (SC10, SC11, SC15, SC32) com elevada atividade antifúngica contra *Fusarium oxysporum*, associada à produção de quitinases, celulases e sideróforos, promovendo maior vigor e sanidade vegetal (ASLAM et al., 2025).

Os rizóbios, tradicionalmente estudados pela simbiose com leguminosas, também vem sendo estudados em culturas não leguminosas, como milho, trigo e cana-de-açúcar. Quando associados à *A. brasilense*, esses microrganismos potencializam o crescimento e a produtividade, principalmente por combinarem a fixação biológica de nitrogênio com a produção de fitormônios (SANTOS et al., 2019; TEHERAN-SIERRA et al., 2021).

O gênero *Azospirillum*, em particular, tem sido amplamente utilizado

no Brasil e as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 são recomendadas para diversas culturas, incluindo o algodoeiro, devido à sua capacidade de estimular o desenvolvimento radicular e aumentar a eficiência de absorção de nutrientes (SABOYA et al., 2023).

Apesar dos avanços, os estudos sobre o uso de bactérias endofíticas no algodoeiro são reduzidas. Assim, diante de um cenário, marcado por restrições ao uso intensivo de insumos químicos e pela busca por sistemas agrícolas mais sustentáveis, a exploração de bactérias endofíticas com potencial promotor de crescimento surge como uma estratégia biotecnológica promissora. No Brasil, o número de bioinsumos registrados tem crescido significativamente nos últimos anos (GERUM et al., 2023), refletindo o avanço da pesquisa e o interesse do setor produtivo.

4.4 Uso de microrganismos promotores de crescimento em algodoeiro

O aumento da produtividade do algodoeiro em áreas já cultivadas requer estratégias que conciliem eficiência agronômica e sustentabilidade ambiental. Nesse contexto, práticas de agricultura regenerativa têm sido amplamente adotadas, visando a recuperação e manutenção da saúde do solo e a redução da dependência de insumos químicos. Entre essas práticas, destacam-se o plantio direto, o uso racional de fertilizantes naturais, a descompactação do solo e sobretudo, a aplicação de produtos biológicos no manejo de pragas, doenças e na promoção de crescimento vegetal (WRATTEN et al., 2019).

Neste cenário, o uso de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) tem despertado crescente interesse na cotonicultura, principalmente devido ao potencial de otimizar a absorção de nutrientes, induzir a resistência a estresses e melhorar o desenvolvimento radicular e aéreo. Entre os microrganismos mais estudados, o gênero *Bacillus* ocupa posição de destaque, ensaios com *B. subtilis* já evidenciaram ganhos expressivos em crescimento e rendimento do algodoeiro (YAO et al., 2006).

De forma semelhante, isolados de *Bacillus* sp. demonstraram capacidade de produzir ácido indolacético (AIA), sideróforos e solubilizar fosfatos, atributos que sugerem seu potencial como inoculantes promissores

(PINDI et al., 2014). Mais recentemente, um estudo demonstrou que comunidades microbianas sintéticas (SynComs) enriquecidas com *Bacillus* FZB 24 foram capazes de estimular o crescimento do algodoeiro, aumentar a resistência a patógenos e melhorar a assimilação de nutrientes, indicando avanços no uso de consórcios microbianos para culturas perenes (WU et al., 2024).

Além de *Bacillus*, outras bactérias endofíticas têm sido estudadas, *Pseudomonas* sp. (N1 e L4), por exemplo, foram associadas à resistência à murcha de *Verticillium*, atuando tanto na supressão da doença quanto na promoção de crescimento em genótipos suscetíveis (ZENG et al., 2022). De forma complementar, pesquisas indicam que *B. subtilis* pode aumentar a tolerância ao estresse hídrico, favorecendo o desenvolvimento do algodoeiro em regiões com baixas disponibilidade de água (REN et al., 2025).

O uso de produtos biológicos na cotonicultura tem crescido de forma exponencial, principalmente no manejo integrado de pragas e doenças. Além de ganhos ambientais, os produtores têm demonstrado interesse crescente no uso dessas ferramentas visando redução de custos e melhor aproveitamento de nutrientes (PARRA, 2019).

Embora os trabalhos com algodoeiro ainda sejam relativamente escassos, os resultados disponíveis são promissores. Além dos citados anteriormente, destacam-se registros da ocorrência natural de *Bacillus thuringiensis* em folhas de algodão, indicando seu potencial para biocontrole (MONNERAT et al., 2003).

Assim como, diversas bactérias endofíticas das folhas de algodoeiro foram determinadas com potencial de controle para doenças foliares (RODRIGUES et al., 2017). Além disso, foram identificados fungos endofíticos no algodoeiro com capacidade de controlar patógenos causadores da mancha-alvo e da podridão radicular, como *Corynespora cassicola* e *Fusarium solani* (HIREMANI et al., 2020).

Aumentos significativos no teor de nitrogênio foram observados em algodoeiro após a inoculação com bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Azospirillum* na rizosfera (GUZMÁN et al., 2012). Também se observou efeitos de três espécies de *Bacillus* – *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus velezensis* e

Paenibacillus lentimorbus – no controle da ramulose do algodoeiro, obtendo até 62 % de eficiência no controle com *B. amyloliquefaciens* (FERRO et al., 2020).

Os resultados obtidos demonstram que as BPCV representam ferramentas estratégicas para tornar a cotonicultura mais sustentável e eficiente, mas ainda há uma lacuna significativa de pesquisas voltadas para o algodoeiro. A prospecção de novas estirpes com múltiplos mecanismos de ação é essencial para reduzir a dependência de insumos químicos e aumentar a resiliência da cultura frente a estresses bióticos e abióticos.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Caracterização da área e amostragem

As plantas de algodão foram coletadas em fevereiro de 2022 na cidade de Sapezal – MT, correspondente à região da Chapada dos Parecis, um bioma típico de Cerrado, onde o solo predominante é o latossolo vermelho-amarelo argissólico com textura argilosa em 70 % e relevo suavemente ondulado (SANTOS et al., 2018). O clima é classificado como tropical úmido ou sub-úmido (Am) e a pluviosidade média anual é de 2.200 mm (ALVARES et al., 2013) com temperaturas médias de 25 °C. A área em estudo tem histórico de 10 anos de sucessão de cultivo de soja e algodão.

A amostragem das plantas foi realizada em áreas subdivididas da propriedade agrícola, que representa um espaço mínimo de cultivo de acordo com o planejamento de cultivo, chamados de “talhões” que pode apresentar um tamanho de até 200 hectares (ha). Ao todo foram coletadas amostras em 28 pontos em sete talhões.

Os pontos selecionados foram em locais cultivados com as variedades de algodoeiro TMG47B2RF, TMG44B2RF e FM985GLTP, para cada variedade, respectivamente, foram determinados 12, 8 e 8 pontos de coleta. A determinação destas cultivares foi embasada no histórico de cultivo já existente destas plantas nas áreas amostradas. As plantas foram coletadas de 25 a 35 dias após a emergência (DAE) utilizando-se uma pá reta para retirada da planta inteira preservando o máximo possível a raiz.

Em cada ponto foram coletadas cinco plantas que compuseram uma amostra composta de cada local. As plantas foram armazenadas em sacos de coleta e transportadas em caixa de isopor com gelo sendo destinadas ao laboratório para processamento e posterior isolamento. Cada ponto de coleta foi georreferenciado via aplicativo Avenza ENGESAT (2020) e os dados transferidos para o Google Earth (Figura 1).



Figura 1: Pontos em que foram realizadas as coletas de plantas de algodoeiro para isolamento das bactérias endofíticas.

5.2 Obtenção dos isolados de bactérias endofíticas

As plantas amostradas foram lavadas em água corrente em laboratório para retirada do excesso de solo, em seguida as raízes foram cortadas em tamanhos de até 5 cm. Posteriormente, as raízes das plantas foram lavadas segundo o método de Hungria (1994) adaptado, o qual consiste na desinfecção inicial com álcool 70 % por 30 seg, água sanitária (2 %) por um minuto, seguido por sete lavagens com água autoclavada, posteriormente realizou-se a maceração das raízes com cerca de 5 mL de solução salina a 0,85 % seguido de estriamento da solução obtida em placas com o meio de cultura desejado por até cinco dias de incubação à 27 °C.

Os meios de cultura utilizados para o cultivo das bactérias endofíticas foram os meios específicos para alguns grupos, sendo o meio semissólido NFb para bactérias fixadoras de N_2 de vida livre (DÖBEREINER et al., 1995), meio King B para favorecer o crescimento de *Pseudomonas* spp. (KING et al., 1954) e o meio YMA (Yest-Mannitol-Ágar) para crescimento de rizóbios (VINCENT, 1970).

Para o isolamento dos bacilos esporulantes, a solução salina obtida após a maceração das raízes recebeu um choque térmico o qual consistiu na

inserção da amostra em um banho-maria a 80 ºC por 12 minutos e posteriormente inseridas em gelo à 4 ºC por 5 minutos, após este procedimento foi realizado o estriamento da solução em meios de cultura NA (Nutrient-Ágar) para favorecer o crescimento de bacilos esporulantes (MONNERATT et al., 2020), as placas foram incubadas por até cinco dias à 27 °C. Para fins de classificação morfológica os isolados foram preparados utilizando o método de coloração de Gram segundo Romeiro (2001) e avaliados em microscópio óptico, seguido de armazenamento em geladeira em caldo nutriente para posterior execução dos testes *in vitro.*

Os isolados obtidos em cada meio de cultura foram avaliados quanto ao crescimento no meio de origem e quanto à morfologia da colônia, analisando-se características como borda, elevação, margem, pigmentação, consistência, velocidade de crescimento e coloração segundo protocolo de Hofling e Gonçalves (2011).

5.3 Capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) de vida livre

Para o teste da capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em vida livre das bactérias isoladas em meio de cultura sólido, foi preparado o meio semissólido NFb (DÖBEREINER et al., 1995), em que as colônias foram cultivadas em duplicata e incubadas à 27 °C por 10 dias, ao final, foram avaliadas a alteração de pH e a formação de biofilme nas amostras.

5.4 Solubilização de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) e solubilização de silicato de potássio (K_2SiO_4)

Para a determinação das bactérias solubilizadoras de fósforo, foi adotada a metodologia descrita por Verma et al. (2001), utilizando meio NBRIP suplementado com 1 $g.L^{-1}$ de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$). As estirpes foram inoculadas em triplicata e incubadas a 27 °C por até 10 dias. A atividade solubilizadora foi avaliada pela formação de halo ao redor das colônias, sendo o Índice de Solubilização (IS) calculado pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia (BERRAQUERO et al., 1976).

A capacidade das bactérias solubilizadoras de potássio, foi avaliada

conforme a metodologia de Aleksandrov (1967), utilizando meio Aleksandrov (HIMEDIA, Lote M1996-500G) composto por 5,0 g.L^{-1} de glicose, 0,5 g.L^{-1} $MgSO_4$, 0,005 g.L^{-1} de $FeCl_3$, 0,1 g.L^{-1} $CaCO_3$, 2,0 g.L^{-1} $Ca_3(PO_4)_2$, 2,0 g.L^{-1} de silicato de alumínio e potássio (K_2SiO_4) e 15,0 g.L^{-1} de ágar bacteriológico. As estirpes foram cultivadas em triplicata e incubadas a 27 ºC por 10 dias. A solubilização foi determinada pela formação de halo, sendo o IS igualmente obtido pela razão entre o diâmetro do halo e o diâmetro da colônia.

Para ambos os ensaios, os valores de IS foram classificados em escala qualitativa conforme Berraquero (1976), sendo considerados baixos (IS < 2), médio (2 a 4) e alto (IS > 4).

5.5 Quantificação da produção de ácido indolacético (AIA)

Para a quantificação da produção de ácido indolacético (AIA) foi utilizada a metodologia de Asghar et al. (2002), que consiste na inoculação do isolado em meio de cultura TSB contendo 0,05 mg. L^{-1} de L-triptofano e incubado a 28 °C por 32 horas. Em seguida as amostras foram centrifugadas, e o sobrenadante foram misturados na proporção 1:1 com o reagente de Salkowski, em seguida, foram incubados por 30 minutos no escuro. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro em 530 nm, a concentração de AIA foi obtida comparando-se com uma curva padrão a partir de concentrações de 0; 5; 10; 20; 80; 100 e 120 µg ml^{-1}.

5.6 Teste *in vitro* para promoção de crescimento em algodoeiro

Para condução do ensaio, as estirpes isoladas foram cultivadas em meio de cultura líquido caldo nutriente, incubadas por até 48 horas, até obtenção de concentração celular padronizada em torno de $1,0x10^6$ UFC/mL (KAPULNIK et al., 1985).

Foram realizados os testes *in vitro* utilizando tubos de ensaio preparados com uma solução nutritiva e cultivados com sementes da variedade TMG47B2RF, amplamente cultivada na região. O protocolo foi estipulado segundo Vincent (1970), o qual consiste no uso de sementes de algodão previamente desinfestadas utilizando uma solução de álcool absoluto para

lavagem por 30 segundos, seguido de uma lavagem com água sanitária por 1 minuto, por fim, sete lavagens com água destilada autoclavada. Todas as sementes foram pré-germinadas e selecionadas somente as que emitiram a radícula.

Em seguida foram preparados os tubos de ensaio contendo cerca de 25 mL de um gel da solução nutritiva de Hoagland e Arnold (1950) (composição: 136,09 g/L de KH_2PO_4, 101,11 g/L de KNO_3, 236,16 g/L de $Ca(NO_3)_2.5H_2O$, 237,47 g/L de $MgSO_4.7H_2O$, 74,56 g/L de KCl, 147,02 g/L de $CaCl_2.2H_2O$, solução de micronutrientes e solução de FeEDTA) com 0,75 % de ágar bacteriológico. Esses tubos foram esterilizados em autoclave e posteriormente inoculados com 100 µl das estirpes cultivadas em meio líquido (concentração de $1,0x10^6$ UFC/mL, aproximadamente) para verificação da promoção de crescimento.

Os tratamentos foram preparados da seguinte maneira: (i) os tubos inoculados com as bactérias candidatas a promotores de crescimento foram preparados com solução nutritiva com 50 % de N total (N50); (ii) controle positivo com 100 % de N total (N100) da solução nutritiva testada; (iii) controle com a inoculação de *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (AZOS) em tubos com 50 % de N; e (iv) controle negativo com 50 % de N total sem inoculação.

Cada tratamento foi realizado em triplicata e mantido a 27 ºC por 20 dias com fotoperíodo de 12 horas. Após esse período, avaliou-se o comprimento de raiz (CR) e parte aérea (CA), a massa seca raiz (MSR) e massa seca parte aérea (MSA).

5.7 Extração de DNA das estirpes bacterianas endofíticas selecionadas

Para as extrações de DNA das 155 estirpes Gram-negativas, estas foram cultivadas em meio caldo nutriente por 48 horas em seguida foram retiradas alíquotas de 1 mL. O DNA foi extraído com o kit Wizard® Promega conforme as recomendações do fabricante.

Para a extração de DNA das 66 estirpes Gram-positivas, foi necessário realizar adaptações para promover a lise da parede celular. Diferente do proposto pelo Kit Wizard® Promega o precipitado foi ressuspendido em 480 uL de solução tampão de fosfato salino e então, foi adicionado 60 ul da enzima

lisozima e incubado por uma hora a 37 °C. Finalizando essa primeira lise, a amostra foi precipitada novamente e realizado o mesmo protocolo anterior seguindo as especificações do fabricante.

A quantificação relativa e qualificação do DNA foram feitas por eletroforese em gel de agarose a 1 % com o tampão TAE e uma voltagem constante (90 V) por 45 minutos. Foi usado o marcador molecular Low DNA Mass Ladder para ser possível a quantificação tanto do comprimento do DNA quanto da sua concentração. Após, foi utilizado o corante não-mutagênico *Safer Dye* e o gel foi visualizado com transluminador de LED de luz dupla azul/branca (KASVI).

5.8 Análise de diversidade genômica de fragmentos gerados por BOX-PCR

Foi criado um perfil genômico para as estirpes endofíticas utilizando o oligonucleotideo iniciador BOX-A1R (5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG -3') segundo protocolo proposto por Versalovic et al. (1994) e Vinuesa et al. (1998). Utilizou-se o kit FIREPol® Master Mix conforme as recomendações do fabricante para a reação.

As reações de PCR executadas foram realizadas em termociclador com gradiente de temperatura (KASVI K33 20TG). A amplificação foi realizada com a etapa de desnaturação inicial de 95 °C por dez minutos, seguidos por 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por um minuto, anelamento em 53 °C por um minuto, extensão a 65 °C por oito minutos, em seguida procedeu-se uma etapa de extensão final a 65 °C por 16 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2 % utilizando-se voltagem constante (90V) por quatro horas. Foi utilizado o corante não-mutagênico *Safer Dye* e os fragmentos foram visualizados em transiluminador de LED de luz dupla azul/branca (KASVI).

5.9 Análise estatística e correlação dos dados

As estirpes com resultado positivo para a solubilização de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) e solubilização de silicato de potássio (K_2SiO_4) foram submetidas à análise de pressupostos de normalidade e homogeneidade das

variâncias avaliadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. A independência dos dados foi assegurada pelo delineamento experimental adotado. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) conforme os pressupostos de Fisher (1925), e, quando observadas diferenças significativas, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$) (SCOTT; KNOTT, 1974).

Para a produção de AIA, os valores foram divididos em quartis para classificação semiquantitativa em baixa, moderada, alta ou muito alta de produção a partir da definição dos Q1, Q2, Q3 e produção > Q3 (BISQUERRA et al., 2009). As estirpes com produção superior a 10 μg ml^{-1}, foram avaliadas por ANOVA e Scott-Knott ($p < 0,05$) no *software* R (RSTUDIO TEAM, 2022) utilizando o pacote *ExpDes* (FERREIRA et al., 2014).

Para a análise da multifuncionalidade das estirpes, foi construído um diagrama de Venn a partir da interseção dos resultados positivos para fixação biológica de nitrogênio (FBN) em vida livre, solubilização de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) e solubilização de silicato de potássio (K_2SiO_4), bem como da produção de ácido indolacético (AIA). Essa abordagem permitiu identificar estirpes com múltiplos mecanismos de promoção de crescimento vegetal, evidenciando combinações funcionais entre os diferentes atributos avaliados.

Para as análises de BOX-PCR, os géis foram fotografados e analisados quanto a presença de fragmentos de DNA. Os perfis de banda foram marcados manualmente e analisados utilizando-se o programa GelJ (HERAS et al., 2015). A similaridade genética entre as estirpes foi estimada pelo coeficiente de Jaccard por ser indicado para dados binários e, por fim, o agrupamento hierárquico foi realizado pelo método de média aritmética não-ponderada (UPGMA), amplamente empregado em estudos de Fingerprinting bacterianos baseados em dados binários de presença e ausência de bandas (SNEATH; SOKAL, 1973). Todos os perfis que apresentaram uma similaridade maior que 80 % entre si foram arbitrariamente considerados como pertencentes a um mesmo grupo.

A promoção de crescimento vegetal *in vitro* foi mensurada pelas variáveis comprimento da parte aérea (CA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSA) e massa seca de raiz (MSR). As estirpes foram

comparadas com os controles (N100 e N50). Para a análise univariada do banco original de 221 estirpes, consideraram-se apenas as estirpes com desempenho igual ou superior ao controle N50, a fim de reduzir a quantidade de dados a ser trabalhado e focar nas estirpes com potencial efetivo de promoção de crescimento de plântulas de algodoeiro.

Os dados foram submetidos à análise de pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Como os dados não atenderam ao pressuposto de homocedasticidade, aplicou-se a ANOVA de Welch (WELCH, 1951), seguida do teste de Games-Howell ($p < 0,05$) (GAMES; HOWELL, 1976) para comparações múltiplas entre as estirpes e os controles utilizando um algoritmo heterocedástico. As análises foram conduzidas no *software* R com pacotes auxiliares que foram utilizados na importação, organização e manipulação dos dados, bem como para a execução das análises estatísticas.

Na análise de componentes principais (PCA), os dados foram centralizados na média, padronizados pelo desvio padrão e realizada sobre a matriz de correlações no *software* R, utilizando os pacotes *FactoMineR* e *factoextra* (LÊ et al., 2008; KASSAMBARA; MUNDT, 2020). A relevância dos componentes principais (PCA) foi considerada com base na proporção de variância explicada, na retenção de autovalores maiores que 1 (critério de Kaiser) e ajuste ao modelo Broken-stick permitindo distinguir componentes associados à estrutura real dos dados daqueles atribuídos ao ruido aleatório, conforme recomendado para análises multivariadas exploratórias (JACKSON, 1993; LEGENDRE; LEGENDRE, 2012).

Como análise complementar, foi estimada a correlação de Spearman entre as variáveis, por se tratar de um método não-paramétrico robusto para avaliação de associações monotônicas entre variáveis biológicas, permitindo interpretar padrões de alocação de biomassa em plântulas do algodoeiro (CONOVER, 1999; ZAR, 2010).

6. ARTIGOS

6.1 ARTIGO 1: Promoción del crecimiento en algodón por bacterias endófitas diazotróficas

Luana Patrícia Pinto Korber[1]; Thiago Gonçalves Ribeiro[2]; Wesley Ribeiro Rivadavea[3], Patrícia Orlando Royer[4]; Enilson Luiz Saccol de Sá[5]

[1] Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – PPGMAA – UFRGS, e-mail: korber.luana@gmail.com

[2] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, e-mail: tfarllon@gmail.com

[3] Universidade do Paraná – UNIPAR, e-mail: wesribeiro.rr@gmail.com

[4] Instituto Federal de Rondônia – IFRO, e-mail: patrícia.royer.ta@hotmail.com

[5] Departamento de Solos – PPGMAA – UFRGS, e-mail: enilson.sa@gmail.com

Artigo submetido para publicação na “Revista Acta Biológica Colombiana”

Promoción del crecimiento en algodón por bacterias endófitas diazotróficas

Cotton growth promotion by diazotrophic endophytic bacteria

RESUMEN

Las bacterias endófitas pueden estimular la absorción de nutrientes y el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos bioquímicos y fisiológicos; sin embargo, aún son limitados los estudios en el algodonero (*Gossypium hirsutum* L.), cultivo de alta relevancia económica en Brasil. En este contexto, el objetivo de este estudio fue aislar, caracterizar y evaluar cepas diazotróficas de vida libre, determinando su potencial funcional y agronómico *in vitro*. Se obtuvieron 77 cepas a partir de tres variedades cultivadas en Sapezal-MT (TMG47B2RF, TMG44B2RF y FM985GLTP), utilizando los medios NFb (medio semisólido libre de nitrógeno) y YMA (agar extracto de levadura-manitol). Las cepas fueron evaluadas en fijación de nitrógeno, producción de ácido indolacético (AIA), solubilización de fosfato y silicato de potasio, y promoción de crecimiento *in vitro* en TMG47B2RF con 50% de la dosis recomendada de N, en diseño completamente aleatorizado con tres repeticiones. Los datos fueron sometidos a análisis multivariado. De las cepas evaluadas, 61 presentaron fijación de N y 20 produjeron AIA por encima de 3,87 $\mu g.mL^{-1}$. Se destacaron en pruebas específicas: AL263 (AIA), AL046 (K_2SiO_4) y AL226 (N y $Ca_3(PO_4)_2$). El análisis multivariado identificó a AL232 y AL039 como las más promisorias, promoviendo incrementos significativos en la biomasa aérea y radicular, incluso con reducción del 50% de N, con desempeño comparable al control con 100% de N y a *Azospirillum brasilense* Ab-V5. Estos resultados demuestran que cepas endófitas nativas multifuncionales pueden sostener el crecimiento del algodonero bajo menor fertilización nitrogenada, evidenciando su potencial como base para el desarrollo de bioinoculantes más eficientes y sostenibles.

Palabras clave: Biofertilizantes, bioinoculantes, *Gossypium hirsutum*.

ABSTRACT

Endophytic bacteria can stimulate nutrient uptake and plant growth through diverse biochemical and physiological mechanisms; however, studies in cotton (*Gossypium hirsutum* L.), a crop of high economic relevance in Brazil, remain limited. In this context, the objective of this study was to isolate, characterize, and evaluate free-living diazotrophic strains, determining their functional and agronomic potential *in vitro*. A total of 77 strains were obtained from three cultivars grown in Sapezal-MT (TMG47B2RF, TMG44B2RF, and FM985GLTP), using NFb medium (nitrogen-free semi-solid medium) and YMA (yeast extract mannitol agar). The strains were evaluated for nitrogen fixation, indole-3-acetic acid (IAA) production, phosphate and potassium silicate solubilization, and *in vitro* plant growth promotion in TMG47B2RF under 50% of the recommended N dose, in a completely randomized design with three replications. Data were subjected to multivariate analysis. Among the evaluated strains, 61 showed nitrogen fixation ability and 20 produced IAA above 3.87 $\mu g.mL^{-1}$. Strains AL263 (IAA), AL046 (K_2SiO_4), and AL226 (N and $Ca_3(PO_4)_2$) stood out. Multivariate analysis identified AL232 and AL039 as the most promising strains, promoting significant increases in shoot and root biomass

even under 50% N reduction, with performance comparable to the 100% N control and to *Azospirillum brasilense* Ab-V5. These results demonstrate that native multifunctional endophytic strains can sustain cotton growth under reduced nitrogen fertilization, highlighting their potential as a basis for the development of more efficient and sustainable bioinoculants.

Keywords: Biofertilizers, bioinoculants, *Gossypium hirsutum*.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos del suelo son altamente diversos y desempeñan funciones esenciales en los ciclos biogeoquímicos, especialmente en la rizosfera, donde interactúan con las plantas y contribuyen al equilibrio del suelo (Wu et al., 2021). La interacción planta–microorganismo, establecida a lo largo de la evolución, favorece a las especies que mantienen la actividad metabólica del suelo y sustentan sistemas agrícolas intensivos (Nadeem et al., 2021).

Las bacterias endófitas habitan diferentes partes de las plantas, como raíces, tallos, hojas y estructuras florales, y pueden beneficiar al hospedero mediante la producción de fitohormonas, el aumento de la absorción de nutrientes y la inducción de resistencia a estreses bióticos (Compant, et al., 2021).

En este contexto, las bacterias endófitas diazotróficas de vida libre se definen como aquellas capaces de fijar nitrógeno atmosférico sin formar estructuras simbióticas especializadas, pero que pueden colonizar internamente los tejidos vegetales y establecer asociaciones beneficiosas con la planta (Adeleke et al., 2021; Compant et al., 2021). Entre ellas, destacan las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), que participan en la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de fósforo y potasio, y la síntesis de sideróforos (Ladha et al., 2016; Nadeem et al., 2021).

Dentro de los grupos más estudiados, las bacterias diazotróficas se destacan, como *Bradyrhizobium* spp. en soja y *Azospirillum* spp. en maíz, trigo y centeno han sido ampliamente utilizadas en la agricultura brasileña (Saboya et al., 2023). Sin embargo, en el cultivo del algodón el uso de estos microorganismos como inoculantes biológicos aún permanece menos explorado en comparación con otros cultivos, especialmente en lo que respecta a bacterias endófitas asociadas a raíces.

Brasil es el mayor exportador y el segundo mayor productor mundial de algodón, con más de 3,5 millones de toneladas exportadas y aproximadamente 2 millones de hectáreas cultivadas, concentradas principalmente en Mato Grosso y Bahía (Ferreira

et al., 2022; Conab, 2024). Se trata de un cultivo exigente en fertilidad, con requerimientos promedio de 180–200 kg ha^{-1} de nitrógeno (N), 130–190 kg ha^{-1} de potasio (K_2O) y 90–150 kg ha^{-1} de fósforo (P_2O_5), lo que refuerza la necesidad de estrategias alternativas que contribuyan a una nutrición más eficiente (Santos et al., 2020).

Estudios han reportado que bacterias diazotróficas asociadas al algodonero, como *Azospirillum* y *Azotobacter*, pueden aumentar significativamente el contenido de N en la planta (Guzmán et al., 2012; Saboya et al., 2023). No obstante, aún es limitada la información sobre la diversidad funcional de cepas endófitas y su potencial combinado en la promoción del crecimiento vegetal. En este contexto, este estudio tuvo como objetivo aislar bacterias diazotróficas endófitas asociadas a las raíces de algodonero, caracterizar su funcionalidad mediante diferentes mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y evaluar su potencial de crecimiento vegetal *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Caracterización del área y muestreo: Las plantas de algodón fueron recolectadas en el municipio de Sapezal – MT, Brasil (13°15’39,91” S, 58°43’33,87” W), región del bioma Cerrado con un historial de diez años de cultivo sucesivo de soja y algodón. Se muestrearon 28 puntos distribuidos en siete áreas cultivadas con las variedades de algodón TMG47B2RF, TMG44B2RF y FM985GLTP, entre 25 y 35 días después de la emergencia (DAE). En cada punto, se recolectaron cinco plantas que conformaron una muestra compuesta; el material vegetal fue acondicionado en bolsas estériles y transportado al laboratorio en una caja de poliestireno con hielo manteniendo condiciones de refrigeración (~4-10°C). El procesamiento de las muestras se realizó dentro de las 24h posteriores a la recolección.

2.2 Obtención e identificación de los aislados: El aislamiento se realizó según el método de Döbereiner et al. (1995) adaptado. Las raíces de algodón fueron sometidas a desinfección superficial mediante inmersión en etanol al 70% durante 30s, seguida de solución de hipoclorito de sodio (2,5%) por 1min, y posterior enjuague con agua destilada estéril. Posteriormente, se maceraron aproximadamente 1g de tejido radicular en 5mL de solución salina estéril (NaCl 0,85 %), y la suspensión obtenida fue sembrada por estría en medios específicos: NFb semisólido para bacterias diazotróficas de vida libre y YMA (agar extracto de levadura-manitol) para rizobios (Vincent, 1970). Las placas se

incubaron a 28°C durante cinco días. La selección de los aislados se realizó con base en características morfológicas distintivas de las colonias, considerando forma, borde, elevación, margen y pigmentación (Hofling; Gonçalves, 2011). Se realizó tinción de Gram para la caracterización preliminar. No se efectuó identificación molecular en esta etapa.

2.3 Fijación biológica de nitrógeno (N) en vida libre: Las cepas fueron inoculadas por duplicado en medio NFb semisólido e incubadas a 28°C durante diez días. La actividad fijadora se evaluó mediante la formación de una película subsuperficial característica y el cambio de pH del medio, evidenciado por la variación de color del indicador (de verde a azul), según la metodología de Döbereiner et al. (1995).

2.4 Solubilización de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) (BSP) y solubilización de silicato de potasio (K_2SiO_4) (BSK): La solubilización del fosfato ($Ca_3(PO_4)_2$) se evaluó según Verma et al. (2001), en medio sólido suplementado con 1 $g \cdot L^{-1}$ del compuesto. La solubilización del silicato (K_2SiO_4) se realizó en medio Aleksandrov (Aleksandrov, 1967), con 2,0 $g \cdot L^{-1}$ de la sal. Las cepas fueron inoculadas puntualmente en placas y incubadas a 28°C durante diez días. La formación de halos de solubilización se evaluó midiendo el diámetro del halo y de la colonia, y el índice de solubilización (IS) se calculó como la relación entre ambos (Berraquero et al., 1976). Cada ensayo se realizó con tres repeticiones.

2.5 Producción de auxinas (ácido indolacético – AIA): La producción de AIA se determinó según la metodología descrita por Asghar et al. (2002). Las cepas fueron cultivadas en medio líquido TSB suplementado con L-triptofano (0,05 $mg.L^{-1}$) durante 32 h a 28°C. Posteriormente, los cultivos fueron centrifugados y el sobrenadante fue utilizado para la cuantificación. La determinación de AIA se realizó mediante la reacción con el reactivo de Salkowski y lectura en espectrofotómetro a 530 nm. La cuantificación se efectuó a partir de una curva estándar con concentraciones de 0, 5, 10, 20, 80, 100 y 120 $\mu g \cdot mL^{-1}$, obteniéndose un coeficiente de determinación (R^2) de 0,9996. Los resultados se expresaron en $\mu g \cdot mL^{-1}$.

2.6 Ensayos de promoción de crecimiento in vitro: Las semillas de algodón (TMG47B2RF) fueron previamente desinfectadas mediante inmersión en etanol a 70% durante 30 s, seguida de solución de hipoclorito de sodio (2,5%) por 1 min, y posterior enjuague con agua estéril. Las semillas se cultivaron en tubos con solución nutritiva de Hoagland y Arnold (1950) solidificada con 0,75 % de agar y ajustada al 50% de la

concentración total de nitrógeno de la solución original. En los tratamientos inoculados, se añadieron 100 µL suspensión bacteriana con densidad aproximada de 1,0 x 10^6 UFC mL^{-1}. El experimento se estableció en un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones por tratamiento, bajo condiciones controladas de temperatura (27°C) y fotoperiodo de 12 h. Se incluyeron tres testigos absolutos: (i) sin inoculación y con 100% de N (control positivo), (ii) *Azospirillum brasilense* Ab-V5 con 50% de N y (iii) sin inoculación, con 50% de N (control negativo). Después de 20 días a 27°C, período considerado suficiente para el desarrollo inicial de las plantas y la expresión de efectos de las cepas bacterianas. Se evaluaron las variables agronómicas: longitud de raíz (LR) y longitud de la parte aérea (LA) medidas con paquímetro y la masa seca de la raíz (MSR) y de la parte aérea (MSA) determinadas mediante secado en estufa a 65°C hasta peso constante, seguido de pesaje en balanza analítica.

2.7 Análisis estadístico: Para la solubilización, los valores de IS se clasificaron como bajos (IS < 2), medios (2–4) y altos (IS > 4). La producción de AIA se clasificó en cuartiles: ausente, baja, moderada y alta. Los datos se sometieron a pruebas de normalidad, homogeneidad e independencia. Se aplicó análisis de varianza (ANOVA) considerando como factor las cepas bacterianas, seguido de la prueba de medias de Scott-Knott ($p < 0,05$), seleccionada por su capacidad de agrupar tratamientos en conjuntos homogéneos. Los análisis se realizaron con el paquete ExpDes en RStudio (RStudio Team, 2022). En la evaluación de crecimiento, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico (método Ward.D2) basado en la distancia euclidiana entre las variables estandarizadas. El número de grupos se validó mediante superposición con el análisis de componentes principales (PCA). Los análisis se realizaron utilizando RStudio con las funciones dist(), hclust(), factoextra::fviz_dend() y factoextra::fviz_cluster() (Kassambara, 2017).

RESULTADOS

Se obtuvieron 77 aislados bacterianos a partir de raíces de algodonero cultivadas en los medios NFb semisólido (38 aislados) y YMA levadura-manitol (39 aislados). Los aislados del medio NFb presentaron características indicativas de fijación biológica de nitrógeno en vida libre, mientras que los aislados en YMA mostraron morfología típica de rizobios.

En la Tabla 1, se observa que la variedad TMG47B2RF generó el mayor número de cepas, con un total de 41 aislados, seguida por FM985GLTP con 27 cepas y TMG44B2RF con nueve bacterias seleccionadas.

Entre las bacterias evaluadas en cuanto a fijación de nitrógeno (N_2) en vida libre, 61 cepas demostraron capacidad positiva, destacándose AL001, AL033, AL037, AL043, AL044, AL045, AL052, AL145, AL161, AL226 y AL258.

En la evaluación de solubilización de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) (Fig. 1), 11 cepas (14%) presentaron halo de solubilización. Los aislados AL226, AL066 y AL145 presentaron los mayores índices de solubilización (IS = 3,41 ± 0,09; 2,89 ± 0,19 y 2,42 ± 0,22, respectivamente), diferenciándose significativamente de los aislados con baja solubilización (IS < 2) ($p < 0,05$). Otras ocho cepas presentaron baja solubilización, siendo estadísticamente inferiores, según los criterios en los que IS < 2 se considera bajo, 2–4 medio y > 4 alto.

En cuanto a la solubilización de silicato de potasio (K_2SiO_4), 15 cepas (19,5 %) presentaron actividad positiva (Fig. 1). El aislado AL046 presentó el mayor índice de solubilización (IS = 9,75 ± 1,04), seguido por AL252 (4,23 ± 0,25) y AL038 (4,11 ± 0,19), clasificados como de alta solubilización, diferenciándose significativamente de los demás tratamientos ($p < 0,05$). Otros siete aislados presentaron IS medio (2–4), y cinco fueron clasificados como de baja solubilización (IS < 2), conforme a los criterios adoptados.

En la producción de auxinas (ácido indolacético – AIA), 20 cepas presentaron producción alta (superior a 3,87 $\mu g \cdot mL^{-1}$), 19 moderada (3,82–2,86 $\mu g \cdot mL^{-1}$) y 38 baja o ausente (inferior a 2,85 $\mu g \cdot mL^{-1}$) (Fig. 2). Los aislados más productivos fueron AL263 (7,94 ± 1,13), AL012 (6,34 ± 0,54), AL164 (5,53 ± 0,85), AL257 (5,25 ± 0,90) y AL161 (5,01 ± 0,72), siendo estadísticamente superiores a los de menor producción ($p < 0,05$).

En el ensayo *in vitro* de promoción de crecimiento, se evaluaron la longitud de la parte aérea (LA) y de la raíz (LR), así como la masa seca de la parte aérea (MSA) y de la raíz (MSR) en la variedad TMG47B2RF. Con base en estos datos, se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico utilizando la distancia euclidiana como medida de similitud, con un corte del 80% para formar grupos con respuestas semejantes a los tratamientos bacterianos y a los controles. Los resultados indicaron diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Se destaca el agrupamiento formado por AL232, AL039 y AL148, que presentaron los mayores valores de biomasa seca, destacándose en MSA (120,60 ± 17,40;

112,70 ± 6,52 y 105,77 ± 1,76 mg, respectivamente) y MSR (10,13 ± 1,69; 14,63 ± 0,57 y 12,00 ± 1,75 mg). Estas cepas se agruparon junto a los controles con 100% de N y *A. brasilense* Ab-V5, indicando un desempeño similar aún bajo reducción del 50% de N (Fig. 3).

El análisis de componentes principales (PCA) complementó estos resultados, explicando el 75,6% de la variabilidad total (PC1 = 56,0%; PC2 = 19,6%). Las cepas AL232 y AL039 se posicionaron en regiones asociadas a mayores valores de biomasa, destacándose AL232 por su relación con la masa seca de la parte aérea (MSA) y AL039 con la masa seca de la raíz (MSR) y el crecimiento radicular (LR). Asimismo, los aislados AL010, AL064 y AL069 presentaron comportamiento intermedio, ubicándose en la misma tendencia de respuesta, lo que refuerza su potencial en la promoción de crecimiento del algodonero *in vitro* (Fig. 4).

DISCUSIÓN

La selección de microorganismos mediante medios específicos permite maximizar la recuperación de aislamientos de interés. En este estudio, el uso de medios de cultivo selectivos favoreció la obtención de bacterias diazotróficas de vida libre, ya que, 61 de las 77 cepas presentaron capacidad de fijación de nitrógeno en vida libre. Resultados similares han sido reportados en estudios de bioprospección con géneros como *Azospirillum* sp., *Rhizobium* sp., y otros grupos como *Burkholderia* y *Herbaspirillum* (Kandasamy; Kathirvel, 2023; Matoso et al., 2023).

Sin embargo, factores como la variedad vegetal, la edad de la planta y las condiciones ambientales pueden influir en la diversidad microbiana (Adeleke et al., 2021; Kandasamy; Kathirvel, 2023), lo que podría explicar las diferencias observadas entre las variedades evaluadas.

Diversos géneros bacterianos asociados al algodonero han sido reportados previamente, incluyendo *Rhizobium* spp., *Pantoea* spp., *Klebsiella* spp. y *Enterobacter* spp. (Adeleke et al., 2021), así como otros grupos endófitos como *Erwinia* spp., *Bacillus* spp., *Bacillus pumilus* y *Clavibacter* spp. (Kandasamy; Kathirvel, 2023). En este estudio, la presencia de cepas con morfología similar a rizóbios refuerza su posible comportamiento endófito en plantas no leguminosas (Liu et al., 2021).

En relación con la solubilización de nutrientes, las cepas AL226, AL066 y AL145 presentaron valores comparables a los reportados en la literatura, lo que indica

una capacidad funcional relevante para la solubilización de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$), con valores promedio cercanos a un índice de solubilización (IS) de 3,0, siendo comparables a los reportados para rizobios en los que el IS alcanzó 2,4 (Sarmiento et al., 2024), y comparable con *Enterobacter* y *Pantoea* spp., los cuales su IS varió entre 1,24 y 4,46 (Fernandes et al., 2023).

Asimismo, la cepa AL046 destacó en la solubilización de silicato de potasio (K_2SiO_4), en el medio Aleksandrov, con valores iguales o superiores a los reportados en la literatura, donde los IS suelen variar entre 4,6 y 6,0, para cepas obtenidas de suelos rizosféricos (Basak et al., 2023). En otro estudio, se observaron valores de IS entre 3,8 y 5,2 para bacterias que utilizaron feldespato potásico como sustrato (Sun et al., 2020), con esto existe una alta capacidad de movilización de nutrientes minerales, probablemente asociada a la producción de ácidos orgánicos y compuestos quelantes (Oliveira-Paiva et al., 2022; Basak et al., 2023).

En cuanto a la producción de AIA, las cepas destacadas AL263 (7,94 $\mu g \cdot mL^{-1}$), AL012 (6,34 $\mu g \cdot mL^{-1}$), AL164 (5,53 $\mu g \cdot mL^{-1}$), AL257 (5,25 $\mu g \cdot mL^{-1}$) y AL161 (5,01 $\mu g \cdot mL^{-1}$) (Fig. 2), presentaron valores dentro del rango reportado para bacterias promotoras de crecimiento vegetal, lo que indica una capacidad relevante de biosíntesis de fitohormonas como la cepa Tp46 (*Rhizobium changzhiense*), con 5,33 $\mu g \cdot mL^{-1}$, y otros promotores de crecimiento que produjeron AIA entre 3,70 y 0,39 $\mu g \cdot mL^{-1}$ (Pereira et al., 2021; Sarmiento et al., 2024), así como en estudios con rizobacterias asociadas al maíz con valores de AIA entre 3,4 y 12,7 $\mu g \cdot mL^{-1}$ (Pérez-Pérez et al., 2021).

Aunque estos valores son inferiores a los máximos reportados para *Azospirillum brasilense* (15,2 a 30,5 $\mu g \cdot mL^{-1}$) bajo condiciones suplementadas con L-triptófano (Kandasamy; Kathirvel, 2023), los resultados de este estudio indican que los aislamientos analizados poseen alta capacidad de biosíntesis de auxinas.

En la evaluación de la promoción de crecimiento *in vitro* para algodón (Fig. 3), las cepas AL232, AL039 y AL148 presentaron mayor biomasa y se agruparon junto a los controles, indicando un desempeño similar bajo la reducción de nitrógeno con relación a los controles positivos y al uso de *A. brasilense* Ab-V5 refuerza el potencial de las bacterias diazotróficas como promotoras del crecimiento vegetal en el algodón (El-Beltagi et al., 2024). Este comportamiento sugiere que estas cepas comparten características funcionales que favorecen el crecimiento vegetal, posiblemente

relacionadas con la combinación de mecanismos como la producción de AIA, la fijación de nitrógeno y la solubilización de nutrientes.

El análisis de componentes principales mostró que AL232 se asoció principalmente a la biomasa aérea, mientras que AL039 se relacionó con el crecimiento radicular, lo que indica que distintas cepas pueden influir sobre diferentes componentes del desarrollo vegetal. Asimismo, otros aislados como AL010, AL064 y AL069 presentaron comportamiento similar, aunque con menor magnitud de respuesta (Fig. 4). Resultados similares fueron reportados en estudios recientes donde *A. brasilense* proporcionó mejoras significativas en el crecimiento y la biomasa vegetal bajo condiciones de estrés, aumentando parámetros fisiológicos y productivos en diferentes cultivos (Sun et al., 2025).

Estos resultados son consistentes con estudios que reportan efectos positivos de *Azotobacter* spp. y *Pseudomonas* spp. en el crecimiento del algodón, incluso bajo condiciones de reducción de fertilización nitrogenada (Romero-Perdomo et al., 2017; Adeleke et al., 2021; Sun et al., 2025).

Aunque los ensayos fueron realizados en condiciones *in vitro*, los resultados sugieren que estas cepas presentan potencial para su aplicación en sistemas productivos de algodón, especialmente en escenarios con menor uso de fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, es necesario validar estos efectos en condiciones de invernadero y campo. En conjunto, los aislamientos endófitos nativos con características funcionales, como fijación de N, producción de AIA y solubilización de nutrientes, representan una alternativa prometedora para la promoción del crecimiento en el algodonero (El-Beltagi et al., 2024).

Estos resultados sugieren su potencial aplicación en estrategias de manejo más sostenibles, con reducción del uso de fertilizantes nitrogenados, lo que podría generar beneficios económicos y ambientales. Además, estas cepas constituyen una base potencial para el desarrollo de bioinoculantes orientados a sistemas productivos de algodón.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que las bacterias diazotróficas autóctonas se encuentran asociadas a las raíces de algodonero en el Cerrado. De las 77 cepas aisladas, AL145 y AL226 presentan características multifuncionales, fijando nitrógeno y

solubilizando fosfato tricálcico; la cepa AL263 se destacó en la producción de AIA y AL046 en la solubilización de silicato de potasio; finalmente, las cepas AL232 y AL039 muestran capacidad de promover el crecimiento in vitro del algodonero mediante mecanismos aún no completamente dilucidados.

REFERENCIAS

Adeleke BS, Babalola OO, Glick BR. 2021. Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. Rhizosphere. 20:100433. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100433

Aleksandrov VG, Blagodvr RN, Il'ev IP. 1967. Phosphorus acid isolation from apatite produced by silicate bacteria. Mikrobiol Zhurnal. 29:111–114.

Asghar HN, Zahir Z, Arshad M, Khaliq A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. Biology and Fertility of Soils. 35:231–237. https://doi.org/10.1007/s00374-002-0462-8

Basak BB, Sarkar D, Biswas DR. 2023. Potassium solubilizing microorganisms: mechanisms and prospects for sustainable crop production. Archives of Microbiology. 205:42. https://doi.org/10.1007/s00203-023-03342-y

Berraquero FR, Baya AM, Cormenzana AR. 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. Ars Pharmaceutica. 17:399–406.

Conab – Companhia Nacional de Abastecimento. 2024. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, safra 2024/25, terceiro levantamento. Disponible en: https://www.conab.gov.br. Acceso: 10 feb. 2025.

Compant S, Cambon MC, Vacher C, Mitter B, Samad A, Sessitsch A. 2021. The plant endosphere world – bacterial life within plants. Environmental Microbiology. 23(4):1812–1829. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15240

Döbereiner J, Baldani V, Baldani I. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa-CNPAD. 60 p. Disponible en:

https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/622470. Acceso: 10 feb. 2025.

El-Beltagi H, El-Waraky EA, Almutairi HH, Al-Daej M, El-Nady MF, Shehata W. 2024. Morphophysiological and biochemical responses of cotton (*Gossypium barbadense* L.) to nano zinc and *Azospirillum* sp. under water deficit stress. Journal of Plant Nutrition. 48(2):326–344. https://doi.org/10.1080/01904167.2024.2402882

Fernandes ACV, Lisboa PHG, Andrade PHM, Vigna BBZ, Nogueira SR, Fávero AP, Lacava PT. 2023. Bactérias endófitas associadas a *Paspalum vaginatum* com potencial para promoção de crescimento vegetal e biocontrole. Brazilian Journal of Animal and Environmental Research. 6(2):1071–1089. https://doi.org/10.34188/bjaerv6n2-010

Ferreira BN, Montebello AES, Santos JA, Marjotta-Maistro MC. 2022. Cotton production chain in Brazil. Research, Society and Development. 11(10):e298111031730. https://doi.org/10.33448/rsd-v11i10.31730

Guzmán A, Obando M, Rivera D, Bonilla R. 2012. Selección y caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal asociadas al cultivo de algodón. Revista Colombiana de Biotecnología. 14(1):182–190. Disponible en: https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/42973. Acceso: 10 feb. 2025.

Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Circular 347.

Hofling JF, Gonçalves RB. 2011. Microscopia de luz en microbiología: morfología bacteriana y fúngica. Porto Alegre: ArtMed. 261 p.

Kandasamy GD, Kathirvel P. 2023. Insights into bacterial endophytic diversity and isolation with a focus on their potential applications – a review. Microbiological Research. 266:127256. https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127256

Ladha JK, Tirol-Padre A, Reddy CK, Cassman KG, Verma S, Powlson DS, Kessel C, Richter DC, Himanshu P. 2016. Global nitrogen budgets in cereals: a 50-year assessment for maize, rice and wheat production systems. Scientific Reports. 6:19355. https://doi.org/10.1038/srep19355

Liu H, Brettell LE, Qiu Z, Singh BK. 2021. Microbiome-mediated stress resistance in plants. Trends in Plant Science. 26(9):1–14. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.03.014

Matoso ES, Avancini AR, Maciel KFK, Alves MC, Simon EDT, Silva MT. 2023. Influência do uso de bactérias diazotróficas na biometria e clorofila em cana-de-açúcar. Brazilian Journal of Development. 6(2):7261–7274. https://doi.org/10.34117/bjdv6n2-141

Nadeem SM, Naveed M, Ayyub M, Khan MY, Zahir ZA. 2021. Microbial inoculants for sustainable agricultural productivity: advantages and limitations. Frontiers in Microbiology. 12:628167. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628167

Oliveira-Paiva CA, Alves VMC, Gomes EA, Sousa SM, Lana UGP, Marriel IE. 2022. Microrganismos solubilizadores de fósforo e potássio na cultura da soja. In: Bioinsumos na cultura da soja. Brasília. p. 1–20.

Pereira MMA, Araujo RC, Martins AD, Rodrigues FA, Pasqual M, Doria J. 2021. Isolamento e identificação de microrganismos promotores de crescimento e inoculação em mudas de bananeira in vitro. Research, Society and Development. 10:1–11. https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.12080

Pérez-Pérez R, Hernandez FI, Openda SY, Salcedo BJC, Sosa-Del CV, Perez-Martinez N. 2021. Characterization of potassium solubilizing bacteria isolated from corn rhizoplane. Agronomía Colombiana. 39(3):415–425. https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v39n3.98522

RStudio Team. 2022. RStudio: Integrated development for R. Disponible en: https://www.rstudio.com/. Acceso: 15 dic. 2024.

Romero-Perdomo F, Abril J, Camelo M, Moreno-Galván A, Pastrana I, Rojas-Tapias D, Bonilla R. 2017. *Azotobacter chroococcum* as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton. Argentinean Journal of Microbiology. 49(4):340–350. https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006

Saboya RCC, Tavares AJF, Silva AAR, Saboya LMF, Nascimento R, Costa MMMN. 2023. Crescimento e produção de algodoeiro sob estresse salino e inoculação com

Azospirillum brasilense. Irriga. 28(1):124–133. https://doi.org/10.15809/irriga.2023v28n1p124-133

Santos DMS, Lima IMO, Silva KC, Steiner F. 2020. Manejo da adubação nitrogenada para o algodoeiro. In: Zuffo AM, Aguilera JG (eds.). Agricultura 4.0. p. 6–25.

Sarmiento LH, Da Silva FB, Treichel B, Beneduzi A, De Sá ELS. 2024. Selection of multi-purpose native rhizobia from red clover. Rhizosphere. 29:100847. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100847

Sun F, Ou Q, Wang N, Guo ZX, Ou Y, Li N, Peng C. 2020. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria and their effect on plant growth. Global Ecology and Conservation. 23:e01141. https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01141

Sun W, Shahrajabian MH, Wang N. 2025. *Azospirillum* spp. and plant productivity under stress conditions. Plants. 14(2):267. https://doi.org/10.3390/plants14020267

Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK. 2001. Evaluation of plant growth promoting ability of diazotrophs from rice. Journal of Biotechnology. 91:127–141. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00333-9

Vincent JM. 1970. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific. 164 p.

Wu L, Wang Y, Zhang W, Wei W, Kuzyakov Y, Ding X. 2021. Fertilization effects on microbial communities in saline soils. Plant and Soil. 463:523–535. https://doi.org/10.1007/s11104-021-04909-w

TABLAS Y FIGURAS.

Tabla 1: Número de aislados endófitos obtenidos por variedad y medio de cultivo en el aislamiento de raíces de algodonero.

Variedad/Medio	**DDE***	**NFb – Fijación vida libre**	**YMA – Rizobios**	**Total**
TMG47B2RF	28 días	18	23	41
FM985GLTP	26 días	15	12	27
TMG44B2RF	35 días	5	4	9
Total		38	39	77

*DDE: Días después de la emergencia.

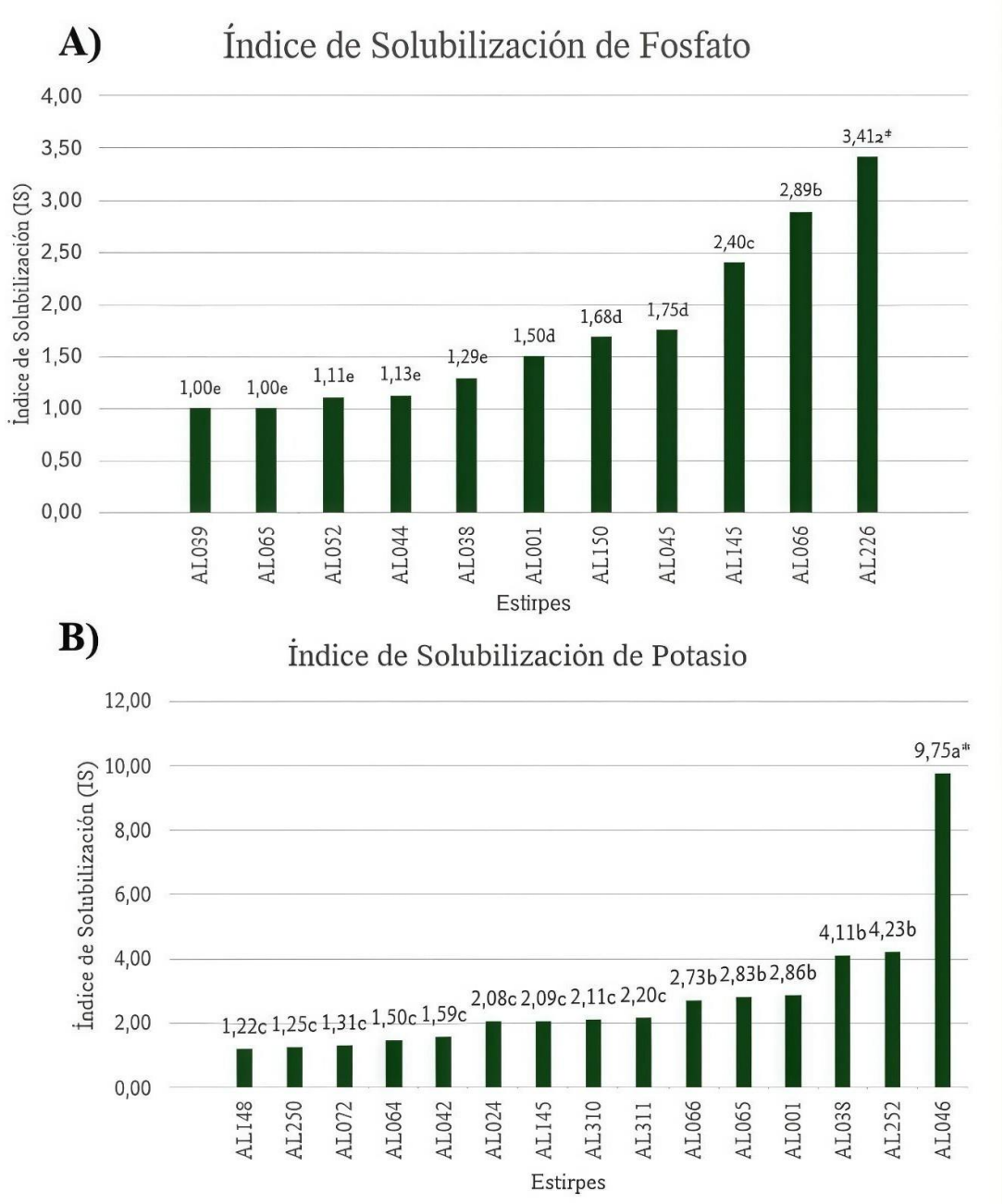


Figura 1. (a) Índice de solubilización (IS) de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) obtenido en ensayos *in vitro* con bacterias endófitas de algodonero. (b). Índice de solubilización (IS) de silicato de potasio (K_2SiO_4) obtenido en ensayos *in vitro* con bacterias endófitas de algodonero. Medias seguidas por las mismas letras no difieren significativamente según la prueba de Scott-Knott ($p < 0,05$).

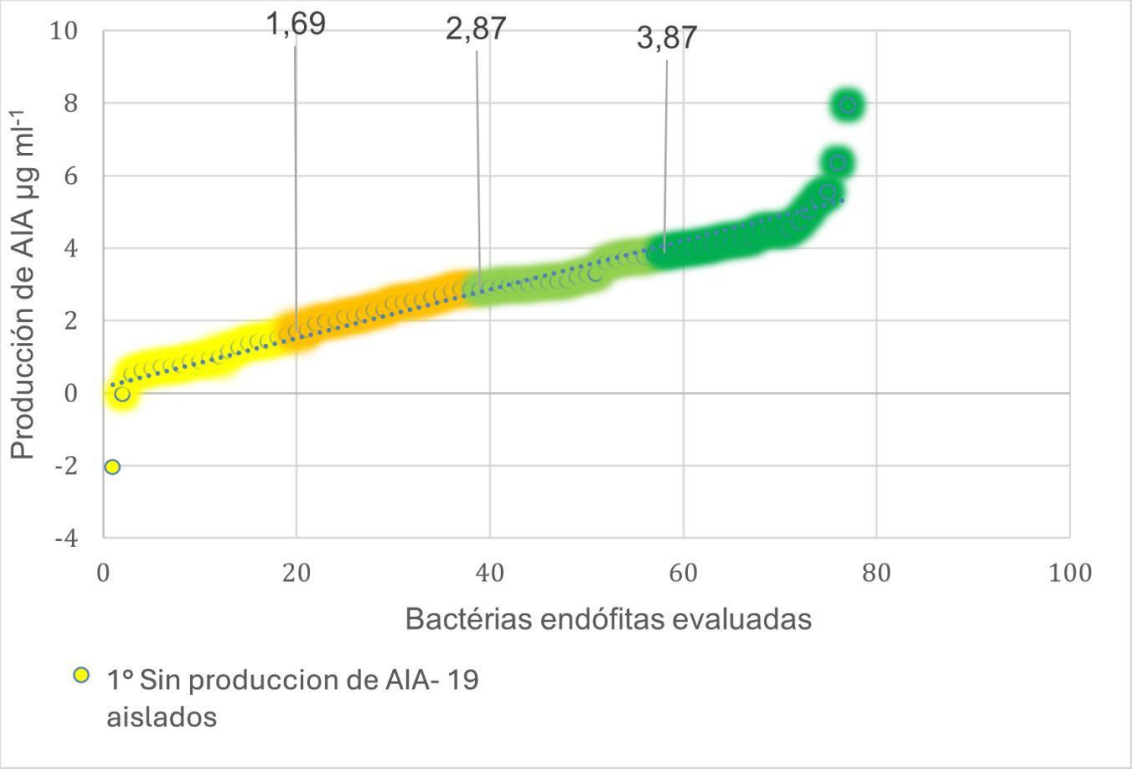


Figura 2. Producción de auxinas (µg·mL⁻¹) por bacterias endófitas aisladas de algodonero.

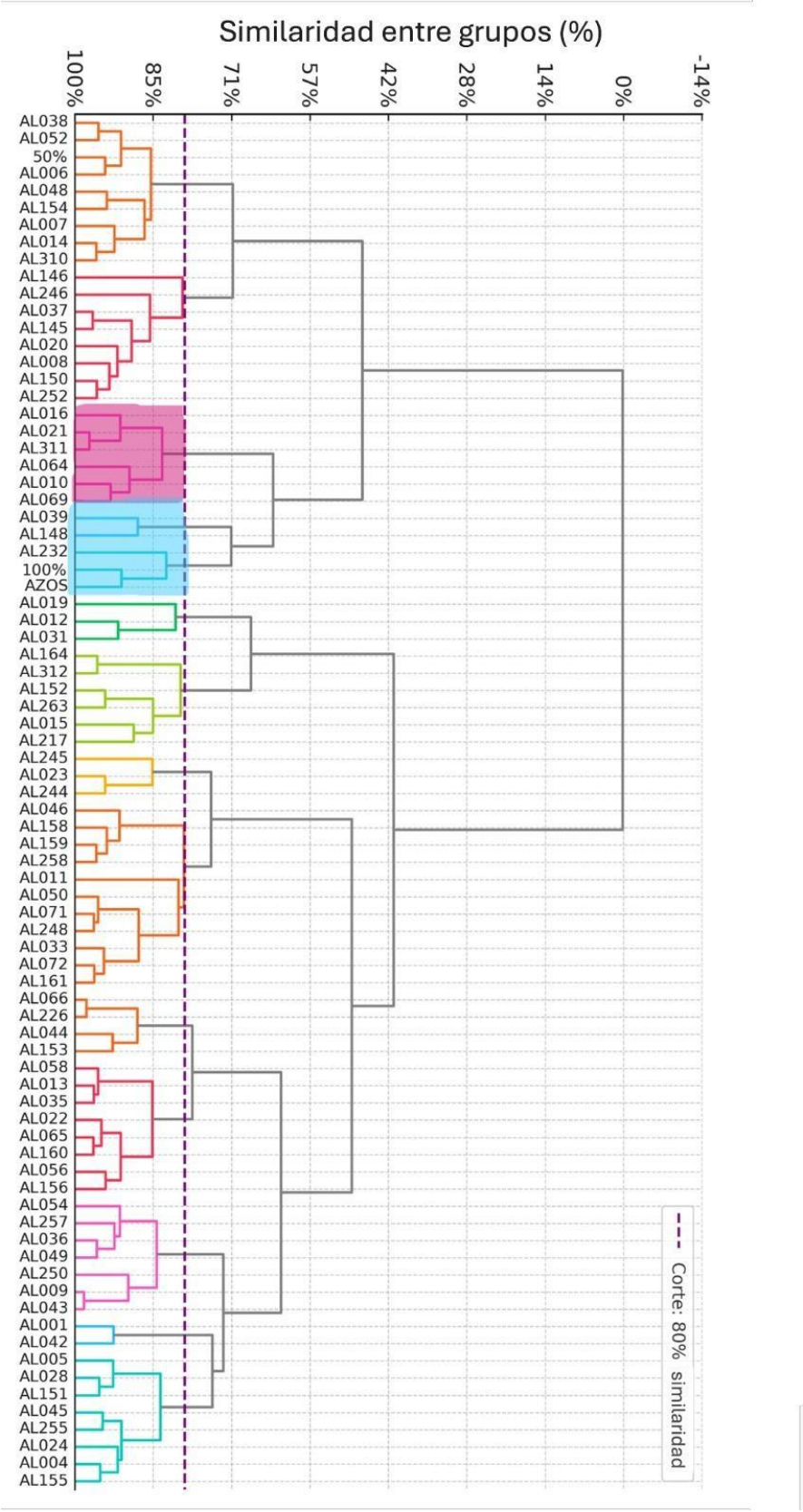


Figura 3. Dendrograma de similitud entre grupos bacterianos obtenidos a partir de variables de crecimiento de algodonero cultivado *in vitro* en comparación con controles; análisis con corte al 80 % de similitud mediante agrupamiento jerárquico (Ward).

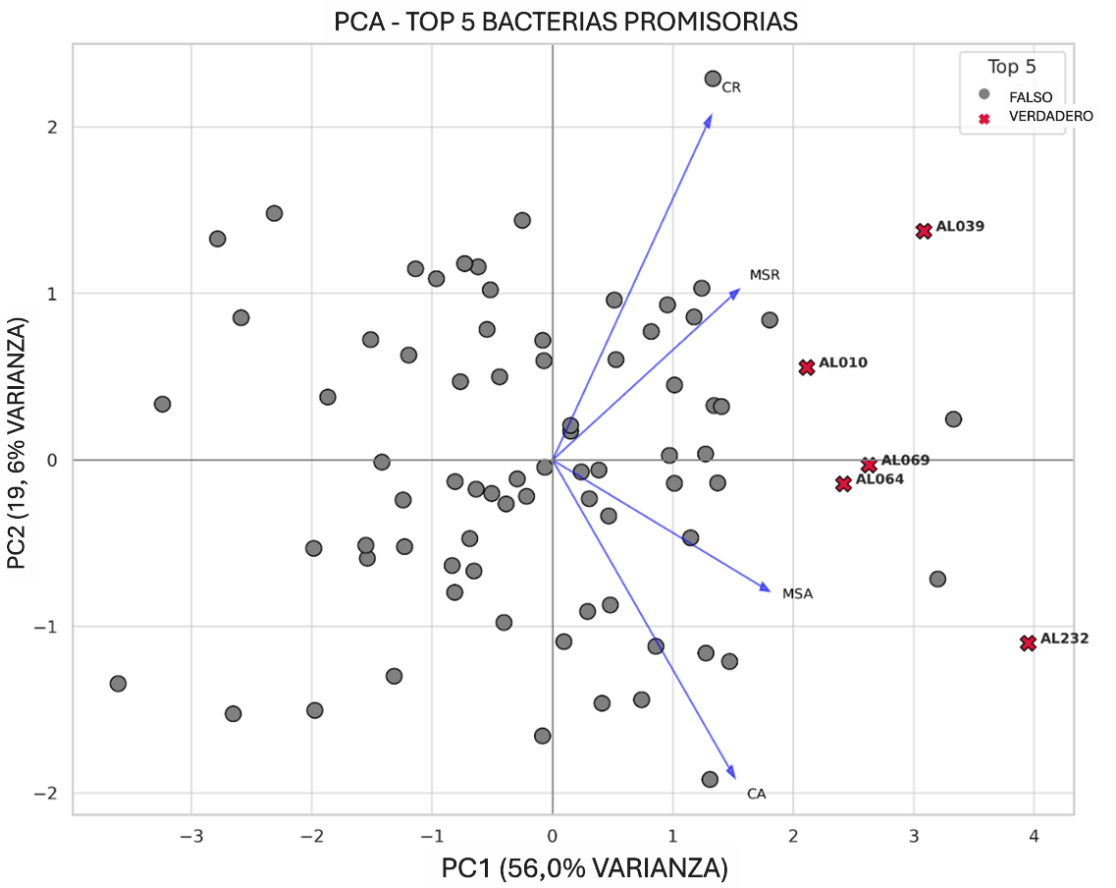


Figura 4. Análisis de componentes principales (PCA) con base en variables agronómicas evaluadas en la variedad de algodonero TMG47B2RF (LR: longitud de raíz; LPA: longitud de parte aérea; MSPA: masa seca de parte aérea; MSR: masa seca de raíz).

6.2 ARTIGO 2: Growth promotion in cotton by endophytic spore-forming bacilos strains producing indole-3-acetic acid (IAA)

Luana Patrícia Pinto Korber[1]; Thiago Gonçalves Ribeiro[2]; Wesley Ribeiro Rivadavea[3], Jéssica Maciel Machado[4]; Enilson Luiz Saccol de Sá[5]

[1] Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – PPGMAA – UFRGS, e-mail: korber.luana@gmail.com

[2] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, e-mail: tfarllon@gmail.com

[3] Universidade do Paraná – UNIPAR, e-mail: wesribeiro.rr@gmail.com

[4] Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Solos – UFRGS, e-mail: jessimm6@gmail.com

[5] Departamento de Solos – PPGMAA – UFRGS, e-mail: enilson.sa@gmail.com

Artigo a ser submetido para publicação na “Pesquisa Agropecuária Tropical”

Título: Promoção de crescimento em algodoeiro por estirpes endofíticas de bacilos esporulantes produtoras de ácido indolacético (AIA)

Título resumido: Crescimento do algodoeiro por bacilos esporulantes endofíticos

Resumo: O algodoeiro (Gossypium hirsutum L.) é uma cultura de elevada importância econômica no Brasil, cujo cultivo depende de altas doses de fertilizantes nitrogenados, elevando custos e impactos ambientais. Nesse contexto, bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) têm sido exploradas como alternativa para reduzir o uso de insumos químicos. Entretanto, ainda são limitadas as evidências sobre o potencial de estirpes endofíticas de bacilos esporulantes produtoras de ácido indolacético (AIA) na promoção de crescimento sob condições de nitrogênio reduzido. Este estudo teve como objetivo avaliar a produção de AIA e o efeito na promoção de crescimento in vitro de estirpes endofíticas de bacilos esporulantes isoladas de raízes de algodoeiro. Sessenta e seis estirpes Gram-positivas foram avaliadas, apresentando produção de AIA entre 0,41 e 19,17 $\mu g\ mL^{-1}$, com 24 % classificadas como de alta produção. No ensaio com plântulas, a estirpe AL129 destacou-se pelo maior incremento simultâneo em biomassa aérea e radicular (MSA/MSR), indicando elevada eficiência na promoção de acúmulo de matéria seca. Adicionalmente, AL127 apresentou maior efeito no crescimento estrutural, especialmente no desenvolvimento radicular. A análise multivariada (PCA) evidenciou dois padrões funcionais distintos relacionados ao acúmulo de biomassa e à expansão estrutural das plântulas. Os resultados indicam que a promoção de crescimento vegetal está associada a diferentes estratégias fisiológicas, com destaque para estirpes eficientes sob nitrogênio reduzido. Em conjunto, os achados evidenciam o potencial de estirpes endofíticas de bacilos esporulantes, especialmente AL129, para o desenvolvimento de bioinoculantes voltados ao cultivo do algodoeiro em sistemas mais sustentáveis.

Palavras-chave: BPCV; AIA; Interação planta-microrganismo.

Abstract: Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) is a crop of high economic importance in Brazil, whose cultivation depends on high doses of nitrogen fertilizers, increasing production costs and environmental impacts. In this context, plant growth-promoting bacteria (PGPB) have been explored as an alternative to reduce the use of chemical inputs.

However, evidence regarding the potential of endophytic Bacillus strains producing indole-3-acetic acid (IAA) to promote plant growth under reduced nitrogen conditions remains limited. This study aimed to evaluate IAA production and the in vitro growth-promoting effects of endophytic Bacillus strains isolated from cotton roots. Sixty-six Gram-positive strains were assessed, showing IAA production ranging from 0.41 to 19.17 μg mL^{-1}, with 24 % classified as high producers. In the seedling assay, strain AL129 showed the highest simultaneous increase in shoot and root biomass (MSA/MSR), indicating high efficiency in promoting dry matter accumulation. Additionally, strain AL127 showed a greater effect on structural growth, particularly in root development. Multivariate analysis (PCA) revealed two distinct functional patterns associated with biomass accumulation and structural expansion of seedlings. The results indicate that plant growth promotion is associated with different physiological strategies, highlighting strains effective under reduced nitrogen conditions. Overall, the findings demonstrate the potential of endophytic Bacillus strains, especially AL129, for the development of bioinoculants aimed at cotton cultivation in more sustainable systems.

Keywords: PGPB; IAA; Plant–microbe interaction.

INTRODUÇÃO

O cultivo do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) é uma das principais commodities agrícolas do Brasil, com alta relevância socioeconômica para regiões produtoras. Entretanto, o cultivo da espécie exige doses elevadas de fertilizantes nitrogenados e fosfatados, o que impacta diretamente no custo de produção e na sustentabilidade do sistema agrícola (Mapa, 2021).

Nesse contexto, a utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) tem sido estudada como alternativa para otimizar a absorção de nutrientes e reduzir o uso de insumos químicos, oferecendo benefícios fisiológicos às plantas por mecanismos diretos e indiretos (Wang et al., 2022; Zhao et al., 2023). Entretanto, ainda é necessária uma compreensão mais aprofundada sobre a contribuição do ácido indolacético (AIA) produzido por BPCV, considerando que os efeitos desse fitormônio

podem variar conforme a espécie hospedeira, o ambiente e a interação com outros compostos microbianos.

Entre os mecanismos associados às BPCV, destacam-se a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fósforo e potássio, a produção de sideróforos e exopolissacarídeos e, especialmente, a síntese de fitormônios, como o ácido indolacético (AIA), principal auxina de origem microbiana envolvida no crescimento vegetal (Pérez-Pérez et al., 2016; Liu et al., 2023).

Bactérias do gênero *Bacillus* e gêneros correlatos ocupam posição de destaque entre as BPCV de interesse agronômico, pela capacidade de formar endósporos, tolerar estresses abióticos e produzir compostos bioativos multifuncionais (Sun et al., 2020; Pandey et al., 2021).

Diante disso, a avaliação de estirpes endofíticas de *Bacillus* associadas ao algodoeiro representa uma oportunidade para aprofundar o entendimento sobre o papel do ácido indolacético (AIA) de origem bacteriana na promoção de crescimento vegetal. Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de estirpes endofíticas de bacilos esporulantes isolados de raízes de algodoeiro na promoção de crescimento *in vitro* de plântulas cultivadas em meio com concentração reduzida de nitrogênio.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das estirpes e caracterização morfológica: As estirpes utilizadas neste estudo foram obtidas a partir de raízes de plantas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) cultivadas no município de Sapezal, Mato Grosso, sob sistema de sucessão soja–algodão, provenientes de três cultivares comerciais (TMG47B2RF, TMG44B2RF e FM985GLTP). O isolamento seguiu o método de Döbereiner, Baldani, Baldani (1995) adaptado, com lavagens, desinfecção inicial e maceração das raízes em solução salina

estéril (NaCl 0,85 %). O extrato foi inoculado em meio nutrient-ágar (NA) após choque térmico (80 °C por 12 min, 4 °C por 5 min). As colônias obtidas foram descritas visualmente considerando forma, elevação, borda, superfície e pigmentação pelo método de Hofling & Gonçalves (2011) e a coloração de Gram foi realizada para confirmação do grupo taxonômico. Foram selecionadas 66 estirpes Gram-positivas, de morfologia compatível com bacilos esporulantes para as análises funcionais.

Fixação biológica de nitrogênio (N) em vida livre: As estirpes bacterianas foram cultivadas em duplicata no meio semi-sólido NFb e mantidas a 27 °C por dez dias. A presença de atividade diazotrófica em vida livre foi identificada pela formação de película superficial e pela mudança de coloração associada à variação do pH do meio (DÖBEREINER; BALDANI; BALDANI, 1995).

Solubilização de fosfato tricálcico e Solubilização de silicato de potássio: A solubilização de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) foi avaliada em meio contendo 1 g L^{-1} do composto, conforme Verma et al. (2001). A solubilização de silicato de potássio (K_2SiO_4) foi conduzida em meio Aleksandrov suplementado com 2 g L^{-1} do sal, de acordo com Aleksandrov (1967). O índice de solubilização (IS) foi calculado pela razão entre o diâmetro total do halo e o diâmetro da colônia (Berraquero et al., 1976).

Produção de ácido indolacético: A produção de ácido indolacético (AIA) foi determinada conforme Asghar et al. (2002). As estirpes foram cultivadas em caldo LB suplementado com L-triptofano (100 mg L^{-1}) sob agitação (150 rpm) à 28 °C por 72 h. Após centrifugação, 2 mL do sobrenadante foram misturados a 2 mL do reagente de Salkowski ($FeCl_3$ 0,5 mol L^{-1} em H_2SO_4 35 %) e incubados no escuro por 30 min. A leitura foi realizada a 530 nm, e as concentrações foram expressas em µg mL^{-1} com base em curva

padrão (0–120 µg mL^{-1}). Os valores foram classificados em quartis (Q1–Q3) considerando a produção em: baixa, moderada, alta ou muito alta (Bisquerra et al., 2009).

Ensaio de promoção de crescimento in vitro: O bioensaio foi conduzido com sementes da cultivar TMG47B2RF, desinfestadas e germinadas em tubos de ensaio contendo meio de Hoagland & Arnold (1950) modificado com 50 % da concentração de nitrogênio, solidificado com 0,75 % de ágar. Após a emergência, as plântulas foram inoculadas com 100 µL de suspensão bacteriana (10^6 UFC mL^{-1}) definidos por OD_{600}. Foram incluídos três controles: (i) tubos com 100 % de N (N100), (ii) tubos com 50 % de N (N50) e (iii) inoculação com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 (AZOS) em tubos com N50. As plantas foram mantidas a 27 °C, com fotoperíodo de 12 h por 20 dias. Todas as estirpes isoladas foram testadas nas plântulas, ao final do período, foram avaliados o comprimento da parte aérea (CA), comprimento da raiz (CR), massa seca da parte aérea (MSA) e massa seca da raiz (MSR).

Caracterização molecular e análise de diversidade genética: O DNA genômico foi extraído pelo método do kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega), adaptado para Gram-positivos (tratamento com lisozima 10 mg mL^{-1}, 37 °C, 30 min). A diversidade genética foi avaliada por BOX-PCR com o primer BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') segundo Versalovic et al. (1994), utilizando FIREPol® Master Mix conforme o fabricante. As reações foram realizadas em termociclador com gradiente (KASVI K33 20 TG), com 35 ciclos de 94 °C (1 min), 53 °C (1 min) e 65 °C (8 min). Os produtos foram separados em gel de agarose 2 % e visualizados com corante *Safer Dye* em transiluminador LED azul/branco (KASVI).

Análise estatística: Os dados foram submetidos aos testes de normalidade (Shapiro–

Wilk) e homogeneidade (Levene), seguidos de ANOVA e teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). As correlações de Pearson entre AIA e variáveis de crescimento (CA, CR, MSA e MSR) e a análise de componentes principais (PCA) foram realizadas no RStudio. O dendrograma foi obtido pelo coeficiente de Jaccard e método UPGMA no *software* PAST 4.03, adotando 80 % de similaridade para definição dos grupos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estirpes endofíticas Gram-positivas de bacilos esporulantes isoladas do algodoeiro apresentaram ampla variação na produção de ácido indolacético (AIA), evidenciando diferenças metabólicas expressivas quanto à utilização de triptofano.

As concentrações de AIA variaram entre 0,41 e 19,17 µg mL^{-1}, com predominância de estirpes de baixa a moderada produção. Pela classificação de Bisquerra et al. (2009), 24 % das estirpes foram enquadradas como de produção muito alta (> 10,00 µg mL^{-1}), 33,3 % como alta (4,39-10,00 µg mL^{-1}), 30,3 % como produção moderada (2,28-4,30 µg mL^{-1}) e 12,1 % como baixa (< 2,28 µg mL^{-1}). Das estirpes testadas, as AL318 (19,17 µg mL^{-1}), AL124 (15,19 µg mL^{-1}), AL313 (14,19 µg mL^{-1}) e AL189 (13,55 µg mL^{-1}) destacaram-se no quartil superior (Figura 1).

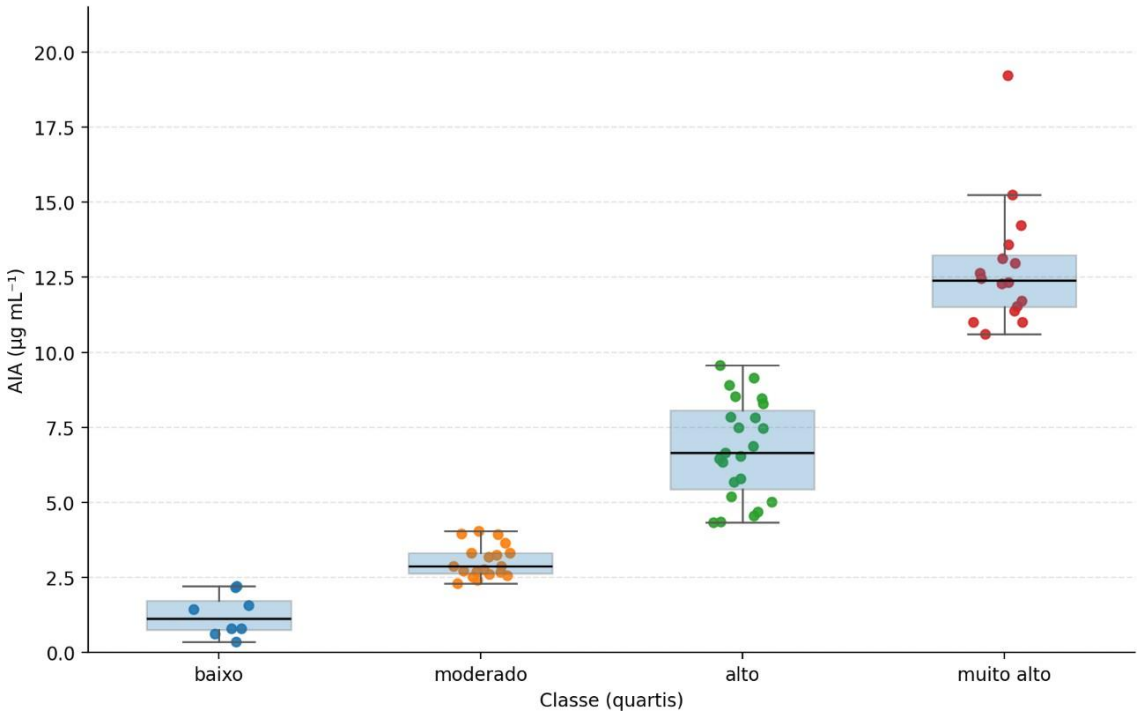


Figura 1. Produção de ácido indolacético (AIA) por estirpes Gram-positivas endofíticas de bacilos esporulantes isoladas de raiz de algodoeiro.

A amplitude de resposta observada é consistente com o descrito para *Bacillus* endofíticos associados ao algodoeiro, nos quais a produção de AIA apresenta elevada variabilidade mesmo sob condições experimentais controladas (Sun et al., 2020; Pan et al., 2023). Produções superiores a 3,8 µg mL^{-1} já são consideradas fisiologicamente ativas em tecidos vegetais, podendo influenciar diretamente o alongamento radicular e a diferenciação de pelos absorventes (Pérez-Pérez et al, 2021; Kandasamy; Kathirvel, 2022).

Embora as estirpes avaliadas não tenham apresentado atividade detectável de fixação biológica de nitrogênio, nem solubilização de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) ou de silicato de potássio (K_2SiO_4), aquelas com produção elevada de AIA acima de 10 µg mL^{-1} demonstraram capacidade de promover crescimento vegetal, indicando possível efeito deste fitohormônio (Bharucha et al., 2013; Fouda et al., 2021).

A análise de variância com o teste de Scott-Knott evidenciou diferenças significativas entre as estirpes avaliadas e os controles nitrogenados (N50 e N100) para as variáveis de crescimento analisadas (Tabela 1).

Tabela 1: Crescimento inicial de plântulas de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) inoculadas com as estirpes endofíticas de bacilos Gram-positivos esporulados selecionados com base no incremento significativo da massa seca da parte aérea (MSA).

Estirpes	Massa Seca Aérea (MSA)		Massa Seca Raíz (MSR)		Comprimento Aérea (CA)		Comprimento Raíz (CR)	
	Média (mg)	p<0,05	Média (mg)	p<0,05	Média (cm)	p<0,05	Média (cm)	p<0,05
AL129	173,2	a	16,9	a	10,6	e	7,4	d
AL328	163,4	a	14,0	c	8,1	f	7,6	d
AL174	160,0	a	12,9	c	10,0	e	7,5	d
AL082	147,5	b	9,9	e	16,8	a	7,2	d
AL086	139,1	b	15,6	b	12,2	d	7,9	d
AL098	141,1	b	18,3	a	13,0	c	5,9	e
AL122	139,9	b	16,2	b	17,6	a	7,0	d
AL208	121,2	c	12,0	d	16,4	a	6,5	d
AL091	111,7	d	10,3	e	16,4	a	8,4	c
AL127	111,6	d	9,6	e	16,4	a	10,6	a
N100	110,6	d	13,2	c	13,6	c	7,4	d
AZOS	110,4	d	11,7	d	15,4	b	7,2	d
AL329	102,0	d	6,1	g	16,9	a	6,0	e
AL135	94,5	d	10,3	e	16,3	a	5,0	f
N50	88,5	e	9,0	f	11,4	d	6,6	d
CV	9,73 %		9,42 %		7,75 %		10,01 %	

* Médias seguidas das mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p<0,05$).
Onde: CA = comprimento parte aérea (cm), CR = comprimento da raiz (cm), MSA = massa seca da parte aérea (mg), MSR = massa seca de raiz (mg).
Controles N100 (concentração de N completa da solução de Hoagland & Arnold, 1950), N50 (metade da concentração de N da solução de Hoagland e Arnold, 1950), AZOS (inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 + N50 em solução com metade da concentração de N).

Entre as estirpes avaliadas, AL129 apresentou um dos maiores incrementos simultâneos em massa seca da parte aérea (MSA) e massa seca radicular (MSR), indicando elevada capacidade de estímulo da produção de biomassa vegetal. Esse padrão sugere efeito positivo sobre o acúmulo de matéria seca total da planta, compatível com efeitos descritos para AIA bacteriano (Sun et al., 2020; Qin et al., 2024).

Por outro lado, AL127 destacou-se principalmente nas variáveis de comprimento da parte aérea (CA) e comprimento de raiz (CR), apresentando os maiores valores de crescimento estrutural entre as estirpes avaliadas. Esse resultado indica forte estímulo no desenvolvimento morfológico das plântulas, especialmente na arquitetura radicular, fator associado ao aumento da capacidade de exploração do solo e absorção de nutrientes (Pérez-Pérez et al., 2021; Fouda et al., 2021).

Outras estirpes como AL082, AL098 e AL122, apresentaram respostas intermediárias quando comparadas ao controle com redução de nitrogênio (N50), sugerindo que a inoculação foi capaz de atenuar parcialmente os efeitos da limitação nutricional de N nas plântulas de algodoeiro (Hungria et al., 2010; Cassán et al., 2015).

Entre os controles, *A. brasilense* Ab-V5 (AZOS) apresentou desempenho intermediário entre N100 e N50, resultado consistente com seu amplo uso como bactéria promotora de crescimento vegetal em sistemas agrícolas, especialmente em associação

com gramíneas e culturas de importância econômica (Hungria et al., 2010; Khoso et al., 2024). A comparação direta indicou que a estirpe Gram-positiva AL127 apresentou crescimento comparável ou superior ao observado para o inoculante comercial.

A análise de componentes principais (PCA) explicou 73,9 % da variação total dos dados, sendo 51,1 % atribuídos ao primeiro componente (PC1) e 22,8 % ao segundo (PC2) (Figura 2). As variáveis de crescimento apresentaram correlação positiva entre si, indicando que os incrementos observados nas diferentes variáveis refletem respostas fisiológicas integradas ao processo de promoção de crescimento, padrão frequentemente observado em interações planta-microrganismo mediadas por fitohormônios (Pérez-Pérez et al., 2021; Kandasamy; Kathirvel, 2022).

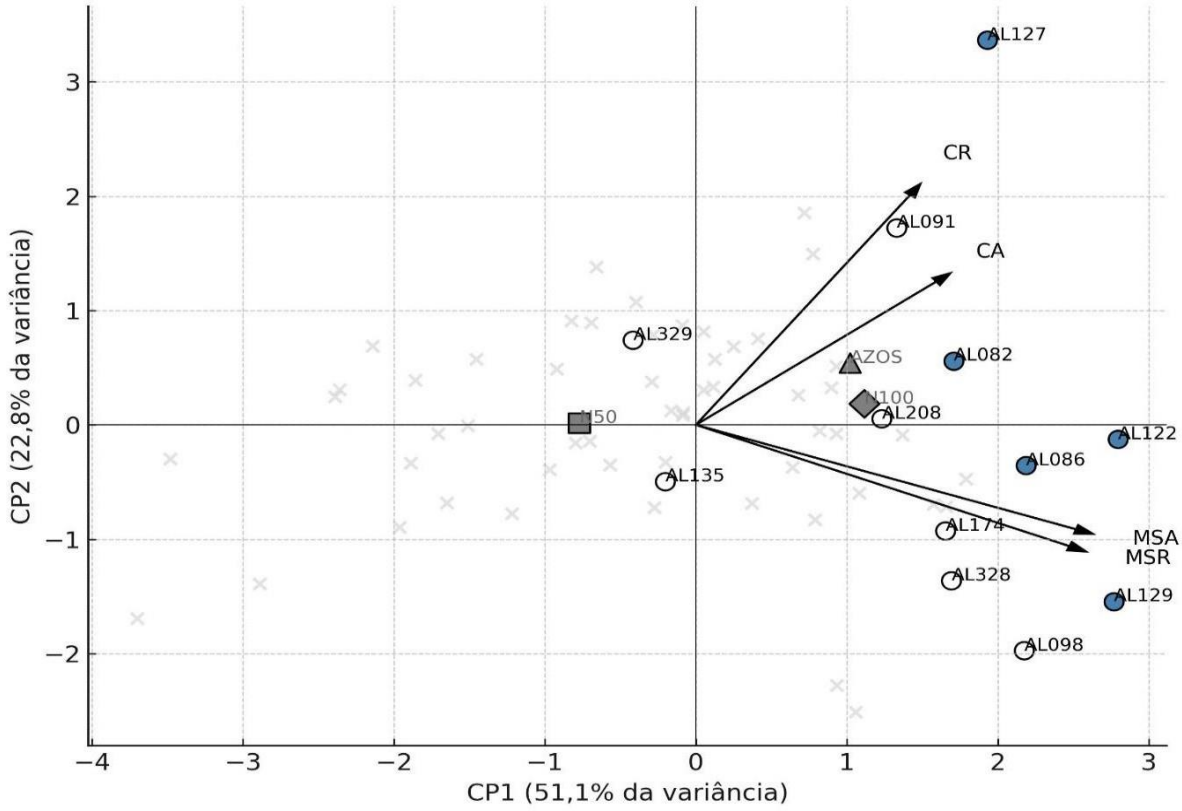


Figura 2. Análise de componentes principais (PCA) baseada nas variáveis de promoção de crescimento na variedade de algodoeiro TMG47B2RF.

* Em que CA = comprimento da parte aérea; CR = comprimento de raiz; MSA = massa

seca da parte aérea e MSR = massa seca de raiz.

A PCA permitiu discriminar estirpes com diferentes estratégias de promoção de crescimento. A estirpe AL127 associou-se às variáveis de comprimento da parte aérea (CA) e comprimento de raiz (CR), evidenciando maior contribuição para o crescimento estrutural das plântulas. Por outro lado, AL129 apresentou forte associação com as variáveis de biomassa (MSA e MSR), indicando maior capacidade de promover acúmulo de matéria seca. Esse padrão indica que a promoção de crescimento vegetal está mais associada à expressão funcional das estirpes do que à sua proximidade genética (Tsotetsi et al., 2022; Qin et al., 2024).

Os resultados evidenciam dois padrões funcionais, enquanto AL129 apresentou maior eficiência na promoção de biomassa vegetal, AL127 destacou-se na indução do crescimento estrutural, especialmente no desenvolvimento radicular. Esses achados indicam que diferentes estirpes podem modular o crescimento vegetal por vias fisiológicas distintas (Qin et al., 2024).

Algumas estirpes apresentaram associação secundária com as variáveis de crescimento, enquanto outras, posicionadas próximas ao centro da PCA, apresentaram contribuição reduzida, indicando menor efeito na promoção de crescimento vegetal.

Esse padrão de distribuição reforça que a promoção de crescimento pelas estirpes ocorre por diferentes estratégias fisiológicas, podendo atuar predominantemente na expansão estrutural ou no acúmulo de biomassa. Essa resposta funcional diferenciada é consistente com a variabilidade metabólica descrita para *Bacillus* spp. endofíticos, especialmente quanto à produção de AIA e modulação do sistema radicular (Sun et al., 2020; Tsotetsi et al., 2022).

A correlação positiva entre a produção de AIA e as variáveis de crescimento, especialmente no sistema radicular, sugere que este fitohormônio desempenha papel

central na modulação do desenvolvimento vegetal, atuando diretamente na expansão celular e na arquitetura radicular. As correlações de Pearson confirmaram essa associação, com r = 0,71 para CR e r = 0,64 para MSR, reforçando o papel do AIA no estímulo ao desenvolvimento radicular e no incremento da biomassa vegetal (Pérez-Pérez et al., 2021; Fouda et al., 2021).

A análise molecular por BOX-PCR e agrupamento UPGMA revelou sete grupos a 80 % de similaridade, além de 16 isolados com baixa similaridade (Figura 3). Os grupos G1 (17 estirpes) e G2 (8 estirpes) foram os mais representativos, seguidos por G3 (6 estirpes), G4 (5), G5 (3), G6 (2) e G7 (2 estirpes), evidenciando elevada diversidade genética entre as estirpes isoladas (Souza et al., 2017; Rutkowska et al., 2025).

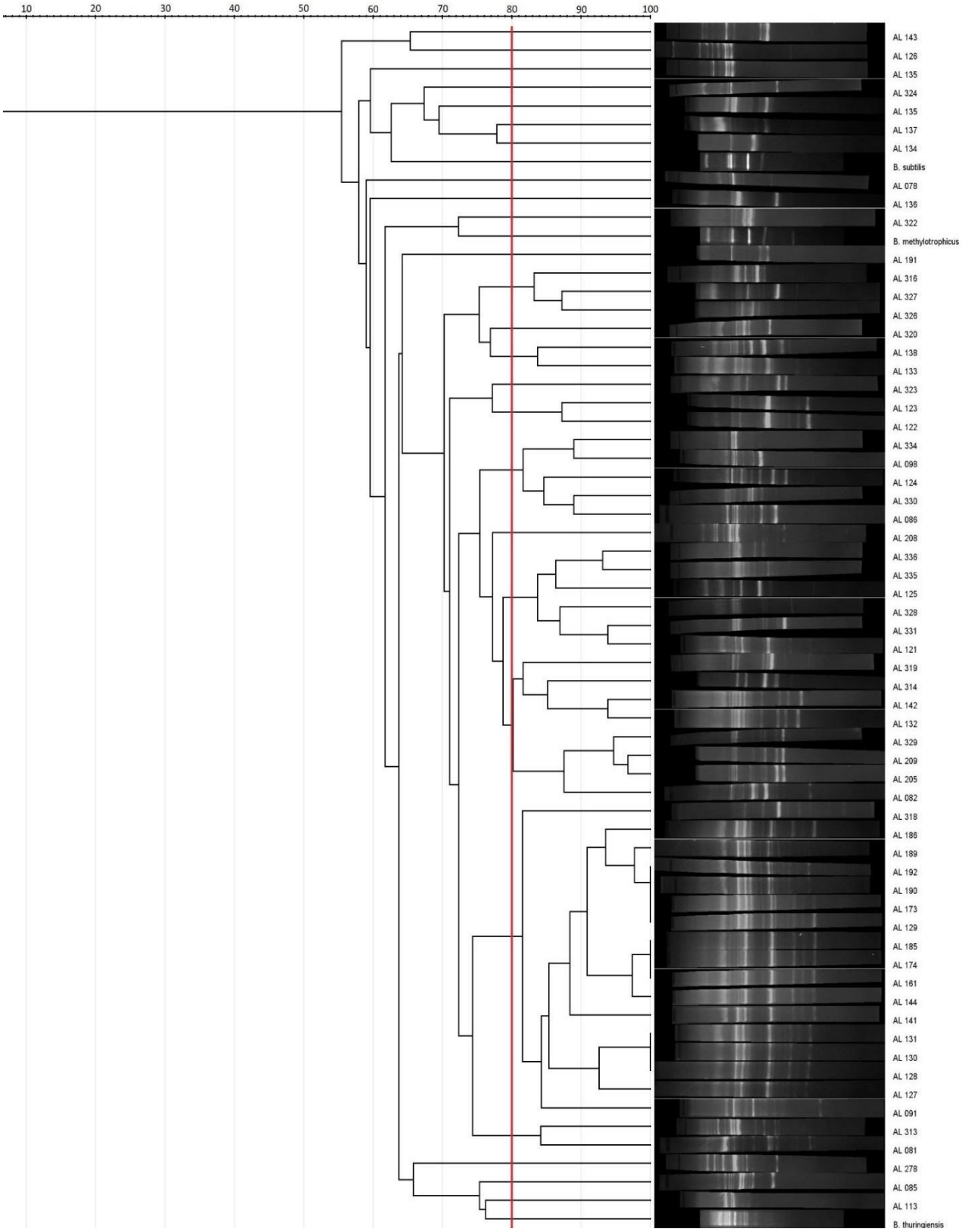


Figura 3. Dendrograma de similaridade genética das estirpes endofíticas de bacilos esporulantes isoladas de raiz de algodoeiro, obtido pelo método UPGMA a partir de perfis BOX-PCR.

As estirpes com melhor crescimento de plântulas (Figura 2), distribuíram-se em diferentes grupos genéticos, indicando que a promoção de crescimento não está necessariamente associada à proximidade genética entre estirpes. Essa dissociação entre variabilidade genética e desempenho funcional é característica de *Bacillus* spp., cuja plasticidade metabólica permite que estirpes geneticamente distintas expressem fenótipos semelhantes na interação com plantas (Souza et al., 2017; Kumar et al., 2022; Tsotetsi et al., 2022).

Conclusão

Estirpes endofíticas de bacilos esporulantes apresentam potencial para promover o crescimento do algodoeiro sob condições de nitrogênio reduzido, atuando por diferentes estratégias fisiológicas. A produção de ácido indolacético destaca-se como mecanismo relevante na modulação do desenvolvimento radicular e no acúmulo de biomassa, indicando a aplicabilidade dessas estirpes em sistemas de cultivo mais sustentáveis.

Referências

Aleksandrov VG, Blagodvr RN, Il'ev IP. 1967. Phosphorus acid isolation from apatite produced by silicate bacteria. Mikrobiol Zhurnal. 29:111–114.

Asghar HN, Zahir ZA, Arshad M. 2002. Screening rhizobacteria for auxin biosynthesis and their effect on the growth and yield of crops. Soil Biology & Biochemistry. 34(8):133–138. https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00176-6

Berraquero FR, Baya AM, Cormenzana AR. 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. Ars Pharm. 17(1):399–406.

Bharucha U, Trivedi U, Pancha I, Choksi A, Mishra S. 2013. Optimization of indole-3-acetic acid production by *Bacillus* spp. and its effect on plant growth. Journal of

Microbiology and Biotechnology Research. 3(5):54–63.

Bisquerra R, Sarriera JC, Martínez F. 2009. Introdução à estatística: enfoque informático com o pacote SPSS. Porto Alegre: Artmed.

Cassán FD, Vanderleyden J, Spaepen S. 2015. *Azospirillum* spp. and plant growth promotion: physiological, genomic and environmental perspectives. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 31(5):757–767. https://doi.org/10.1007/s11274-015-1830-y

Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB.

Fouda A, Hassan SED, Abdel-Halim TS, Mahmoud YAG, El-Din MG, Elgorban AM. 2021. Plant growth-promoting *Bacillus* species with multiple mechanisms improve growth of cotton seedlings. Rhizosphere. 19:100373. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100373

Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Circular 347.

Hofling JF, Gonçalves RB. 2011. Manual de identificação de bactérias com base em características morfológicas e tintoriais. Revista de Odontologia da UNESP. 40(3):127–134.

Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense*: agronomic and environmental perspectives. Plant and Soil. 337:1–16. https://doi.org/10.1007/s11104-010-0416-x

Kandasamy S, Kathirvel B. 2022. Production of indole-3-acetic acid by rice-associated actinobacteria and its effect on plant growth promotion. Rhizosphere. 21:100483. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100483

Khoso MA, Zhang C, Wang Z, Liu M, Zhang H. 2024. Impact of plant growth-promoting rhizobacteria on plant physiology and nutrient uptake: mechanisms and applications. Journal of Agriculture and Food Research. 17:100906.

https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100906

Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK. 2022. Auxin-producing *Bacillus* spp. modulate root growth and nutrient uptake in wheat under nutrient-limited conditions. Microbial Biotechnology. 15:1025–1038. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13967

Liu F, Dai C, Xu Z, Sun X, Yang T, Zhang J, Zhao X. 2023. Indole-3-acetic acid production and plant growth-promoting traits of endophytic *Bacillus* isolated from maize roots. PeerJ. 11:e14985. https://doi.org/10.7717/peerj.14985

Mapa, Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2021. Manual de adubação e calagem para o algodoeiro. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura. Acesso em: 8 out. 2025.

Pan X, Chen L, Zhou L, Zhu H, Lu M, Lin W, Wang Y. 2023. Plant growth-promoting *Bacillus* sp. enhances root architecture and stress tolerance in alfalfa through modulation of auxin pathways. Rhizosphere. 27:100666. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100666

Pandey P, Kumar S, Patel MK, Maurya PK, Kumar M, Singh RP. 2021. Functional diversity of *Bacillus* species in plant growth promotion and stress management: current status and prospects. Journal of Applied Microbiology. 130:1119–1133. https://doi.org/10.1111/jam.14866

Pérez-Pérez ME, Hernández-Rodríguez A, Guerrero-González ML, Sánchez-Rodríguez E, Valenzuela M. 2016. Indole-3-acetic acid production by endophytic bacteria isolated from cotton plants and their effect on seedling growth. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 7:457–466. https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.07.003

Pérez-Pérez ME, Hernández-Rodríguez A, Sánchez-Rodríguez E, García-López J, Valenzuela M. 2021. Indole-3-acetic acid production by rhizobacteria associated with cotton and their role in root development. Applied Soil Ecology. 168:104146. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104146

Qin S, Zhang X, Wang Y, Zhao L, Li J, Yang W. 2024. Auxin-mediated modulation of *Bacillus*–cotton interactions under nitrogen limitation. Applied Microbiology and

Biotechnology. 108:112–125. https://doi.org/10.1007/s00253-024-12854-1

Rutkowska N, Siwik-Ziomek A, Gospodarek-Komkowska E. 2025. Exploring the diversity and genomics of cultivable *Bacillus* endophytes. Frontiers in Microbiology. 16:1612860. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1612860

Souza JT, Cordeiro FA, de Oliveira AG, Oliveira RC, Silva RA, Mendes R. 2017. Genetic diversity and population densities of endophytic *Bacillus* spp. in yam plants. Bragantia. 76(3):263–271. https://doi.org/10.1590/1678-4499.2016.438

Sun Y, Wu Y, Wang C, Li Z, Zhang H, Chen X. 2020. Diversity and plant growth-promoting ability of endophytic *Bacillus* species isolated from cotton roots. Archives of Microbiology. 202:2359–2370. https://doi.org/10.1007/s00203-020-01905-z

Tsotetsi T, Adebola P, Olubukola OB. 2022. *Bacillus* spp. for plant growth promotion and stress resilience: recent advances and future prospects. Plants. 11(19):2482. https://doi.org/10.3390/plants11192482

Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. Journal of Biotechnology. 91:127–141. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00333-9

Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. 1994. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research. 22(25):682–683. https://doi.org/10.1093/nar/22.25.682

Wang Z, Li Q, Lu H, Qin J, Zhao H, Li F. 2022. Recent advances in plant growth-promoting bacteria for sustainable agriculture: molecular insights and field applications. Frontiers in Microbiology. 13:874562. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.874562

Zhao X, Zhang H, Li F, Wang Z, Lu J, Chen Y. 2023. Endophytic *Azospirillum* sp. from cotton roots enhances potassium solubilization and plant growth under nutrient limitation. Frontiers in Plant Science. 14:1128765. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1128765

7. RESULTADOS GERAIS

7.1 Quantificação dos isolados bacterianos de plantas do algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) e caracterização das estirpes selecionadas

Foram obtidos 511 isolados bacterianos endofíticos a partir de raízes de três variedades de algodoeiro (TMG47B2RF, TMG44B2RF e FM985GLTP) utilizando os meios NFb (DÖBEREINER et al., 1995), YMA (VINCENT, 1970), King B (KING et al., 1954) e NA (MONNERATT et al., 2020) para seleção das bactérias (Tabela 1).

Tabela 1: Quantificação de colônias de bactérias endofíticas isoladas de macerado de raízes de algodoeiro, por variedade e meio de cultura.

Variedades/Meio de cultura	King B	NA	NFb	YMA	**Total**
			Fix. N_2 vida livre	Rizóbios	
TMG44B2RF	60	5	23	35	123
FM985GLTP	49	22	23	41	135
TMG47B2RF	111	33	39	70	253
Total	220	60	85	146	511

Legenda: King B: isolamento preferencial de *Pseudomonas,* NA: obtenção de bacilos esporulantes (choque térmico)*,* NFb: fixadores de N_2 de vida livre, YMA: rizóbios.

Considerando-se os resultados por variedade de algodoeiro, observou-se que da variedade TMG47B2RF foi recuperado o maior número de isolados, sendo obtidos 253 isolados bacterianos (49,5 %) coletadas aos 28 dias após emergência (DAE), da variedade FM985GLTP foram obtidos 135 isolados (26,4 %) aos 26 DAE, e da variedade TMG44B2RF foram obtidas 123 estirpes (24,1 %) aos 35 DAE (Figura 2).

No conjunto total de bactérias obtidas, observou-se a predominância de morfotipos compatíveis com *Pseudomonas* (43 %), seguidas de rizóbios (28,6 %), por fim com a menor abundância de bactérias fixadoras de N_2 de vida livre (16,6 %) e menor população de bacilos esporulantes (11,7 %).

A distribuição por variedade está representada na Figura 2, em barras empilhadas, permitindo visualizar a proporção de cada grupo microbiano em função da planta hospedeira.

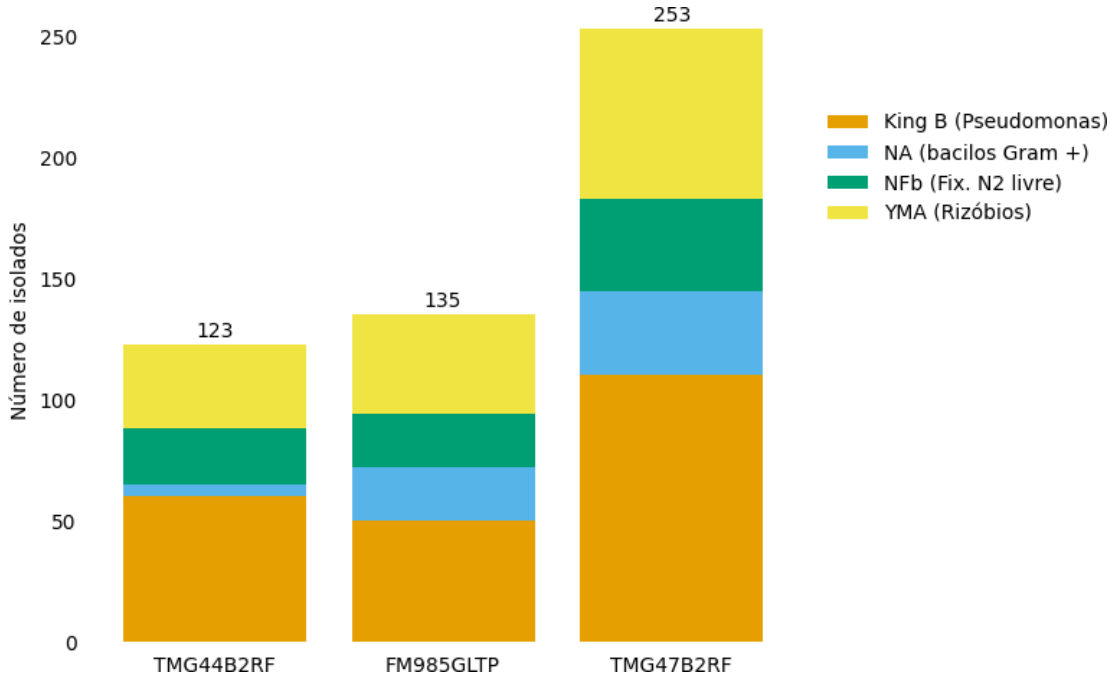


Figura 2: Número de isolados bacterianos endofíticos obtidos a partir de raízes de três variedades de algodoeiro, distribuídos por meio de cultura seletivo. As barras empilhadas representam a contribuição de cada meio: King B (preferencialmente *Pseudomonas)*, NA (bacilos Gram-positivos esporulados), NFb (bactérias fixadoras de N_2 de vida livre) e YMA (rizóbios).

Dos 511 isolados, 221 foram selecionados para ensaios subsequentes de promoção de crescimento e testes bioquímicos, com o critério baseado nas características morfológicas e pontos amostrais (Tabela 2).

Tabela 2: Isolados bacterianos endofíticos de raizes de algodoeiro selecionados para avaliação quanto à morfologia colonial e características promotoras de crescimento de plantas.

ISOLADOS ENDOFÍTICOS OBTIDOS DO ALGODOEIRO						
AL001	AL046	AL093	AL132	AL177	AL248	AL304
AL004	AL048	AL094	AL133	AL178	AL250	AL307
AL005	AL049	AL095	AL134	AL180	AL252	AL308
AL006	AL050	AL096	AL135	AL184	AL255	AL310
AL007	AL052	AL097	AL136	AL185	AL257	AL311
AL008	AL054	AL098	AL137	AL186	AL258	AL312
AL009	AL056	AL099	AL138	AL188	AL263	AL313
AL010	AL058	AL100	AL139	AL189	AL266	AL314
AL011	AL064	AL101	AL142	AL190	AL268	AL315
AL012	AL065	AL102	AL143	AL191	AL269	AL316
AL013	AL066	AL103	AL144	AL192	AL270	AL317
AL014	AL069	AL106	AL145	AL195	AL271	AL318

AL015	AL071	AL107	AL146	AL196	AL272	AL319
AL016	AL072	AL108	AL148	AL198	AL274	AL320
AL019	AL073	AL109	AL150	AL201	AL275	AL322
AL020	AL074	AL110	AL151	AL203	AL276	AL323
AL021	AL075	AL111	AL152	AL204	AL278	AL324
AL022	AL076	AL113	AL153	AL205	AL279	AL325
AL023	AL078	AL117	AL154	AL206	AL283	AL326
AL024	AL079	AL118	AL155	AL207	AL284	AL327
AL028	AL080	AL120	AL156	AL208	AL285	AL328
AL031	AL081	AL121	AL158	AL209	AL287	AL329
AL033	AL082	AL122	AL159	AL210	AL288	AL330
AL035	AL083	AL123	AL160	AL211	AL292	AL331
AL036	AL084	AL124	AL161	AL215	AL294	AL332
AL037	AL085	AL125	AL164	AL216	AL295	AL333
AL038	AL086	AL126	AL169	AL217	AL296	AL334
AL039	AL087	AL127	AL170	AL226	AL297	AL335
AL042	AL089	AL128	AL171	AL232	AL298	AL336
AL043	AL090	AL129	AL173	AL244	AL300	
AL044	AL091	AL130	AL174	AL245	AL301	
AL045	AL092	AL131	AL176	AL246	AL303	

Da totalidade dos isolados selecionados, segundo a avaliação da morfologia celular (Tabela 3), observou-se que 95 % apresentaram formato de bastonetes, destes 69,2 % eram bacilos Gram-negativos e 30,8 % bacilos Gram-positivos. Cerca de 5 % das bactérias apresentaram duas principais características, sendo duas estirpes classificadas como cocos Gram-negativos e 9 bactérias como cocobacilos, sendo sete Gram-negativos e dois Gram-positivos totalizando as 221 estirpes.

Tabela 3: Morfologia celular e coloração de Gram dos isolados bacterianos endofíticos de raiz de algodoeiro estudados.

	Morfologia Celular			
Gram	Bastonetes	Cocos	Cocobacilos	Total (unid.)
Positivo	66	0	2	68
Negativo	144	2	7	153
Total (unid.)	210	2	9	221

Quando observadas as morfologias celulares das estirpes por meios de cultura (Tabela 4), no meio YMA (levedura-manitol) as 38 colônias obtidas foram classificadas como bastonetes Gram-negativos e 1 cocobacilo Gram-

negativo. No meio de cultivo NA após choque térmico, foram obtidos 46 isolados bastonetes Gram-positivos esporulantes e 2 bastonetes Gram-negativos.

No meio de cultura NFb semissólido para fixadores de N_2 de vida livre, do total de 38 estirpes, 34 foram classificadas como bastonetes Gram-negativos (Tabela 4). Enquanto no meio King B, 71 dos isolados apresentaram-se como bastonetes Gram-negativos e 21 bastonetes Gram-positivos, dessa maneira, percebe-se que o meio de cultura apresentou uma grande diversidade microbiana mesmo aplicando o protocolo de seleção por morfologias preferencialmente de estirpes de *Pseudomonas*.

Tabela 4: Morfologia celular dos isolados bacterianos endofíticos de raiz de algodoeiro por meio de cultura.

Meio	Gram	Morfologia celular			Total
		Bastonetes	Cocos	Cocobacilos	
King B	Positivo	21	0	2	98
	Negativo	71	0	4	
NA	Positivo	45	0	0	46
	Negativo	1	0	0	
NFb	Positivo	0	0	0	38
	Negativo	34	2	2	
YMA	Positivo	0	0	0	39
	Negativo	38	0	1	
	Total	210	2	9	221

7.2 Dendrogramas de similaridades das estirpes endofíticas Gram-negativas e Gram-positivas isoladas de raiz de algodeiro

A análise de similaridade genética das estirpes Gram-positivas endofíticas de bacilos esporulantes, obtida por BOX-PCR e agrupamento UPGMA com coeficiente de Jaccard, resultou na formação de sete grupos a 80 % de similaridade, além de 16 isolados com baixa similaridade.

Os grupos apresentaram tamanhos distintos, variando de 2 a 17 estirpes, enquanto 23,5 % das estirpes permaneceram isoladas. A matriz binária

gerada apresentou variação no número e na posição das bandas amplificadas, permitindo diferenciação entre os perfis genômicos avaliados (Figura 3).

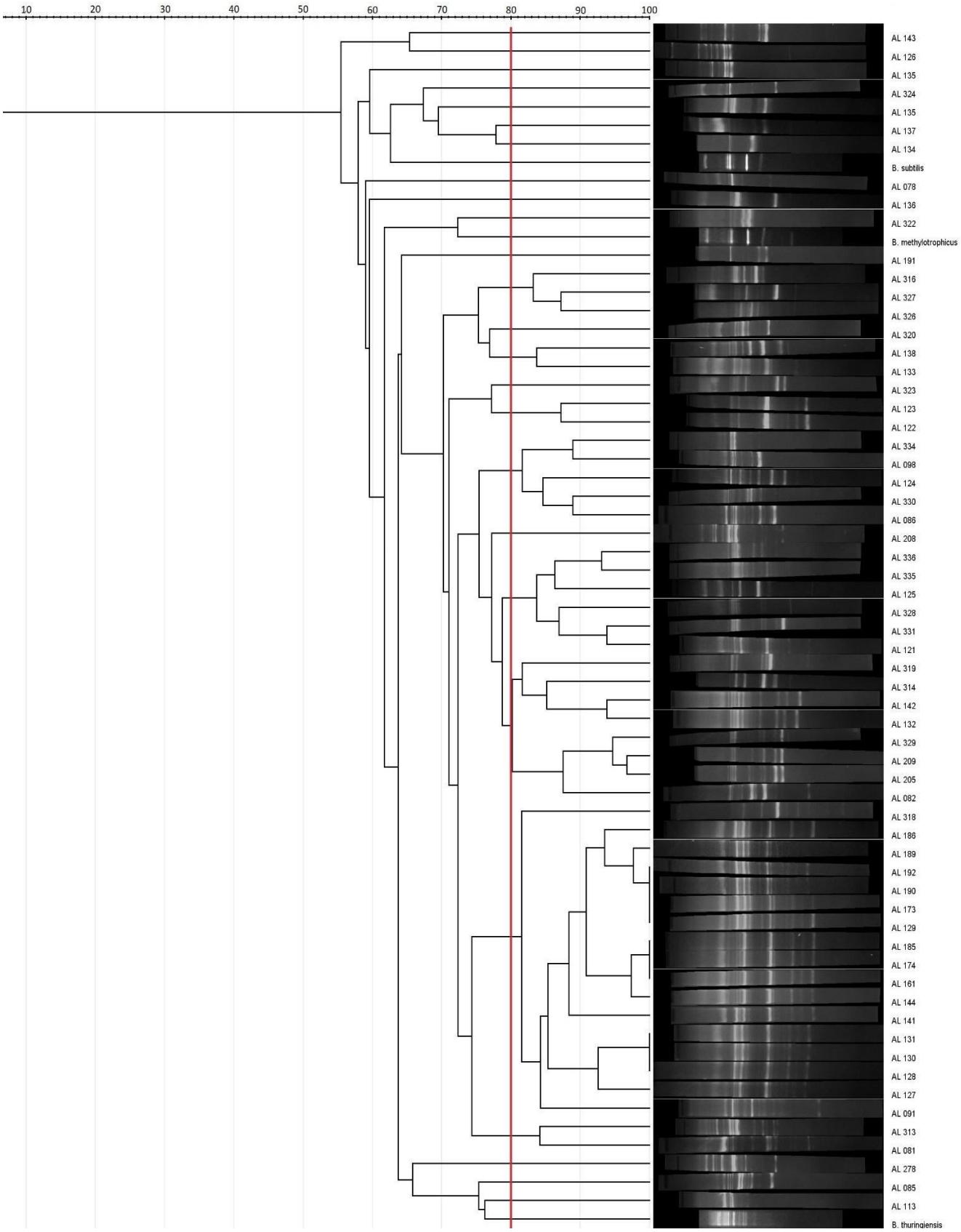
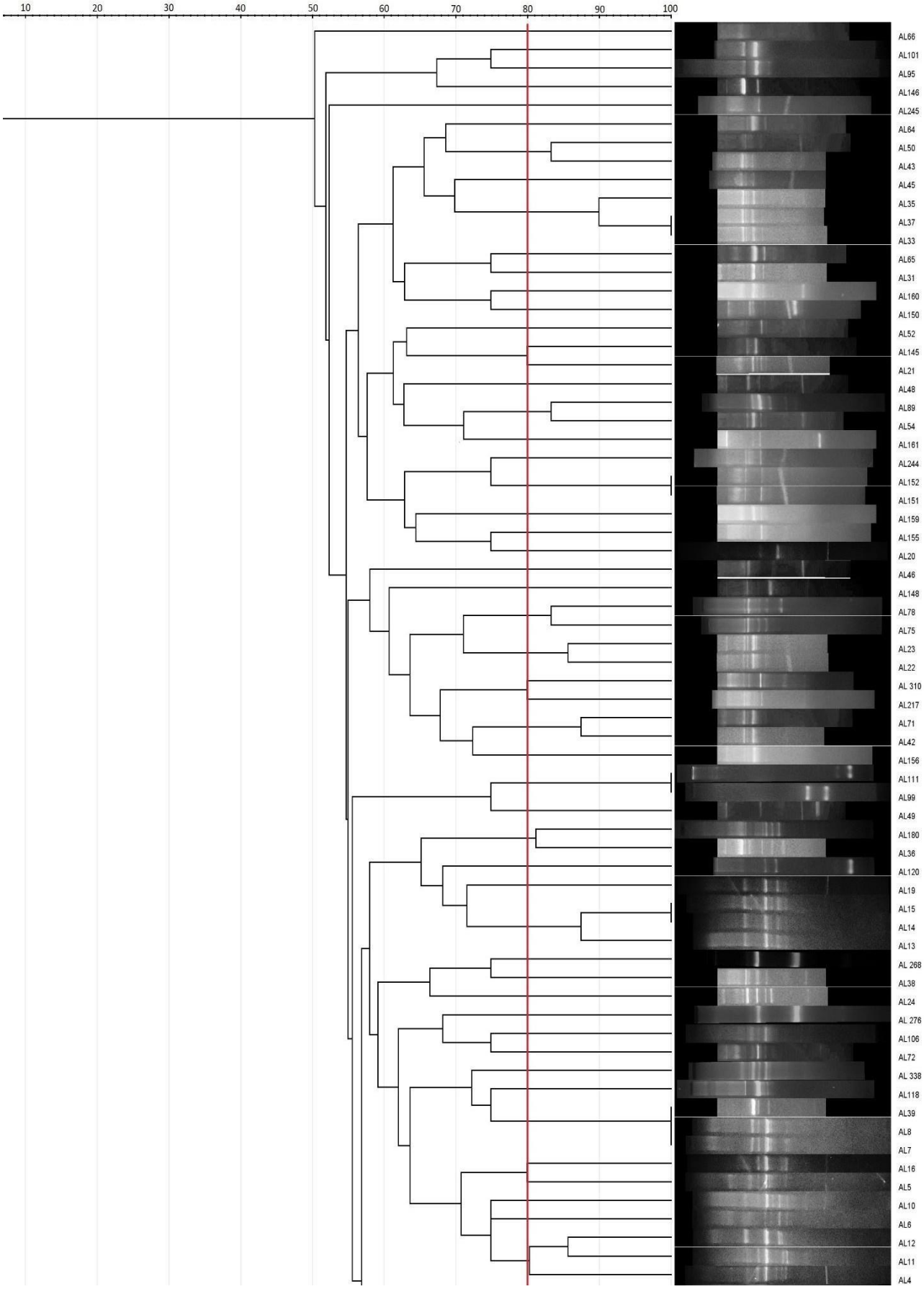


Figura 3: Dendrograma de similaridade genética das estirpes Gram-positivas endofíticas de bacilos esporulados isoladas da raiz de algodoeiro (BOX-PCR; UPGMA; coeficiente de Jaccard; corte 80 %).

Para as estirpes Gram-negativas (Figura 4), a análise por BOX-PCR seguida de agrupamento UPGMA no mesmo ponto de corte (80 %) resultou em 34 grupos, além de 70 isolados com baixa similaridade, representando 45,8 % do total. Os grupos apresentaram entre duas e quatro estirpes cada. A matriz binária apresentou um número maior de perfis únicos quando comparada às Gram-positivas, evidenciando maior diversidade de padrões de bandas.



Continuação...

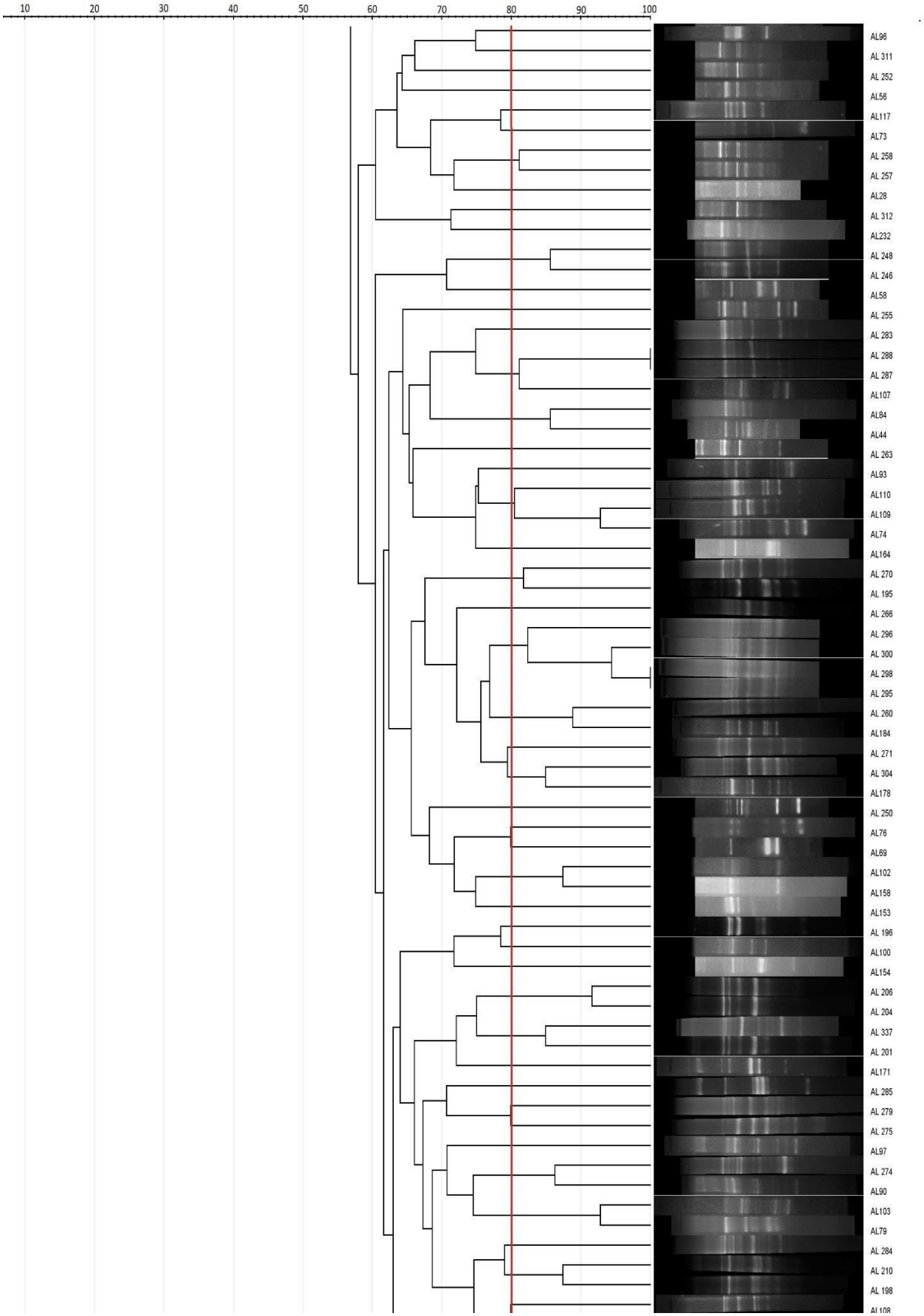

10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
AL96
AL 311
AL 252
AL56
AL117
AL73
AL 258
AL 257
AL28
AL 312
AL232
AL 248
AL 246
AL58
AL 255
AL 283
AL 288
AL 287
AL107
AL84
AL44
AL 263
AL93
AL110
AL109
AL74
AL164
AL 270
AL 195
AL 266
AL 296
AL 300
AL 298
AL 295
AL 260
AL184
AL 271
AL 304
AL178
AL 250
AL76
AL69
AL102
AL158
AL153
AL 196
AL100
AL154
AL 206
AL 204
AL 337
AL 201
AL171
AL 285
AL 279
AL 275
AL97
AL 274
AL90
AL103
AL79
AL 284
AL 210
AL 198

Figura 4: Dendrograma de similaridade genética das estirpes Gram-negativas endofíticas de raiz de algodoeiro (BOX-PCR; UPGMA; coeficiente de Jaccard; corte 80 %).

Em conjunto, os dois dendrogramas demonstraram que as estirpes Gram-positivas se concentraram em um número reduzido de grupos, enquanto as Gram-negativas apresentaram maior diversidade de perfis de bandas e maior variabilidade genética, evidenciada pelo número superior de grupos e isolados singulares no ponto de corte de 80 % de similaridade.

7.3 Mecanismos de promoção de crescimento: fixação de N_2, solubilização de P/K e produção de AIA

Das estirpes avaliadas em meio NFb semissólido, cerca de 79 estirpes (35,3 %) foram consideradas positivas para fixação biológica de nitrogênio (N_2) em vida livre, evidenciada pela formação de película e alteração característica de cor do indicador.

Foram obtidas 38 estirpes em meio de cultivo YMA, 23 foram selecionadas a partir do meio NFb semissólido e 17 foram recuperadas a partir do meio de cultivo King B. Destacaram-se na fixação de N_2 em vida livre as estirpes AL001, AL033, AL037, AL043, AL044, AL045, AL052, AL145, AL161, AL226 e AL258 obtidas a partir dos dois primeiros meios (YMA e NFb).

Entre as estirpes bacterianas endofíticas avaliadas quanto à capacidade para solubilizar fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) (Figura 5), das 221 avaliadas, 48 estirpes (21,7 %) apresentaram halo transparente em meio NBRIP. Os índices de solubilização (IS) foram classificados em três classes: baixo (< 2), médio (entre 2 e 4) e alto (> 4).

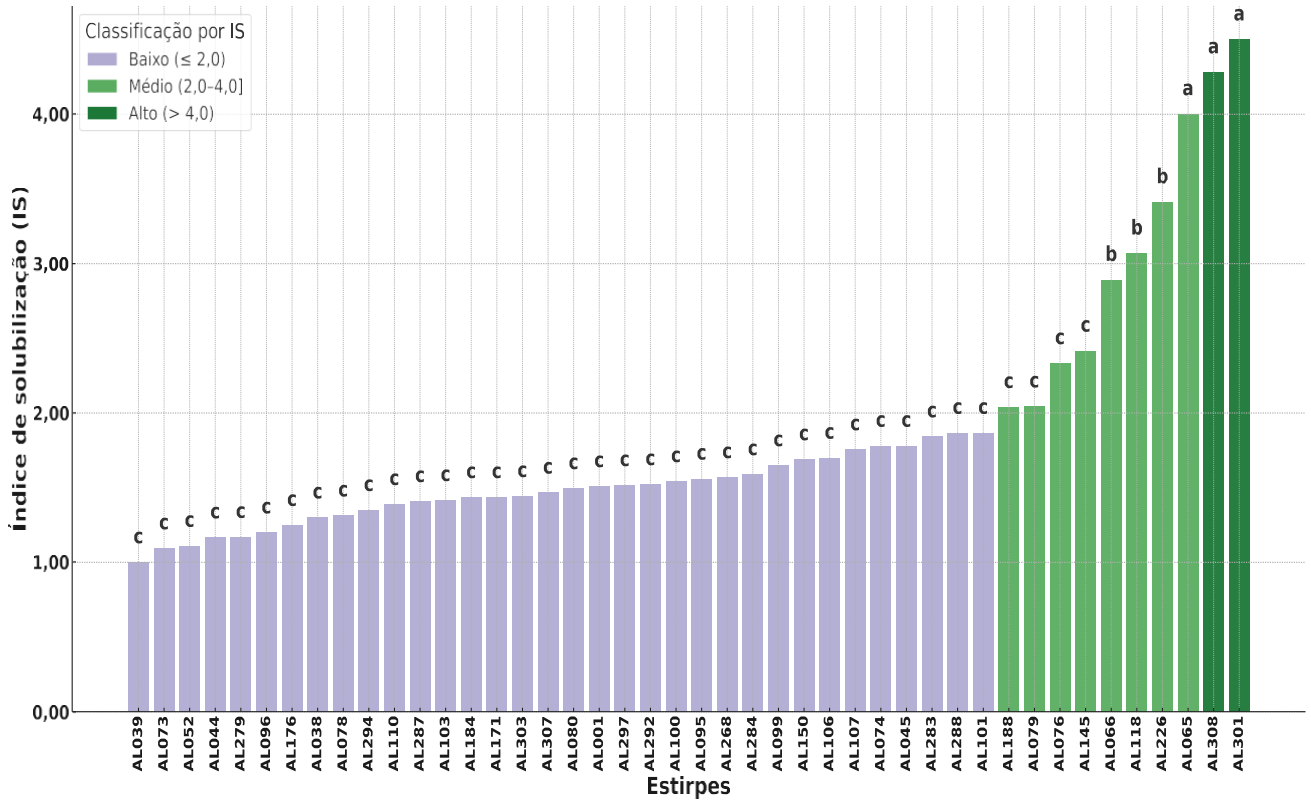


Figura 5: Índice de solubilização (IS) de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) em meio NBRIP dos isolados bacterianos endofíticos de raiz de algodoeiro.
Classes: baixo (IS < 2), médio (IS entre 2 e 4) e alto (IS > 4).
*Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

As estirpes AL301 (IS = 4,50) e AL308 (IS = 4,13) foram inicialmente classificadas na faixa de maior índice de solubilização (IS). No entanto, a análise de Scott-Knott ($p < 0,05$) agrupou ambas juntamente à estirpe AL065 (IS = 3,79), indicando ausência de diferença estatística entre elas e compondo conjuntamente o grupo **a**.

Na sequência, as estirpes AL226, AL118 e AL066 formaram o grupo **b**, com índices intermediários (2,95 a 2,31). Por fim, todas as demais estirpes solubilizadoras foram enquadradas no grupo **c**, apresentando índices significativamente menores (1,0 a 2,0). Esses resultados reforçam que, embora o valor absoluto de AL301 e AL308 seja superior a AL065, a análise demonstra equivalência no desempenho, destacando esse conjunto de estirpes.

No ensaio de solubilização de silicato de potássio (K_2SiO_4) em meio Aleksandrov, 64 estirpes (28,9 %) apresentaram tal capacidade, sendo que 27 apresentaram alto potencial de solubilização (IS > 4), 20 com média capacidade

de solubilização (2 a 4) e 17 com baixa solubilização (IS < 2) (Figura 6).

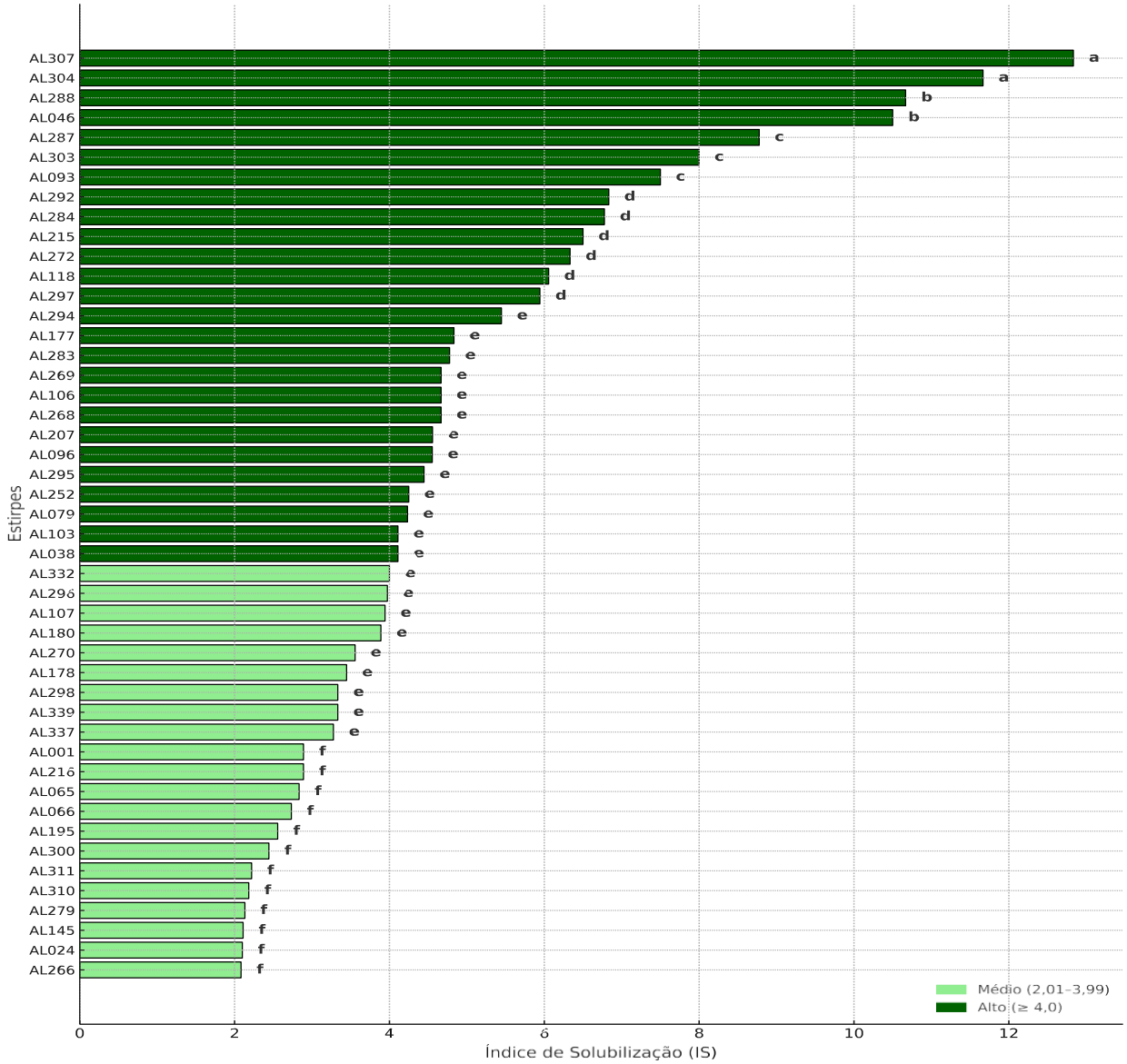


Figura 6: Índice de solubilização de silicato de potássio (K_2SiO_4) dos isolados bacterianos endofíticos de raiz de algodoeiro em meio Aleksandrov.
Classes: baixo (IS < 2), médio (IS entre 2 e 4) e alto (IS > 4).
*Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste de Scott-Knott (p < 0,05).

As estirpes com maior destaque foram AL307 (IS = 12,83), AL304 (IS = 11,67), AL288 (IS = 10,67) e AL046 (IS = 9,75) significativamente superiores às demais pelo teste de Scott-Knott (p < 0,05). O teste estatístico separou as estirpes solubilizadoras em seis grupos distintos, o grupo **a** reuniu as estirpes AL307 e AL304, seguidas pelas estirpes AL288 e AL046 pertencentes ao grupo **b**. O grupo **c** incluiu as estirpes AL287, AL303 e AL093 (IS = 8,78 a 7,50), o grupo **d** composto pelas estirpes AL292, AL284, AL215, AL272, AL118 e AL297

(IS = 6,83 a 5,94).

O grupo **e** foi o mais numeroso abrangendo estirpes com desempenho intermediário (IS = 5,44 a 3,28), por fim, o grupo **f**, reuniu as estirpes com menor IS, porém ainda consideradas positivas, com índices variando de 2,89 a 1,22.

A produção de ácido indolacético (AIA) foi classificada por quartis, permitindo uma categorização semiquantitativa das estirpes em produção de auxinas muito alta, alta, moderada e baixa. Das 221 estirpes testadas (Figura 7), 24 delas (10,9 %) se destacaram como muito altas (acima de 10,00 µg ml^{-1}) na produção de AIA, com valores variando de 17,70 a 10,05 µg ml^{-1}, 31 estirpes (14,0 %) foram consideradas com produção alta (de Q3 = 5,47 até 10,00 µg ml^{-1}), 107 estirpes (48,4 %) enquadradas com produção moderada (entre Q1 = 2,50 e Q3 = 5,47 µg ml^{-1}) e 59 estirpes endofíticas (26,7 %) com baixa produção de AIA.

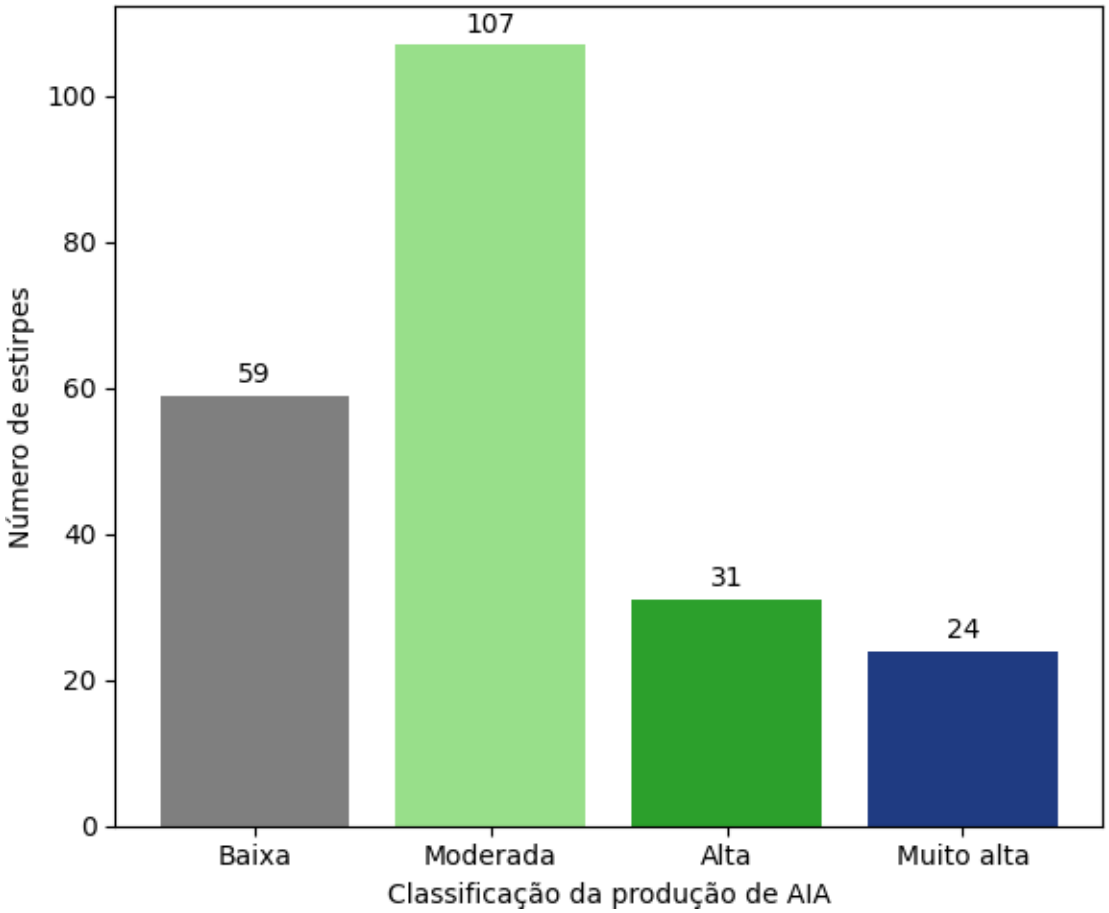


Figura 7: Produção de ácido indolacético (AIA) por estirpes endofíticas de raiz de algodoeiro. Classes definidas com base na distribuição dos valores observados:
Baixa (< 2,5 µg ml^{-1}), Moderado (entre 2,5 e 5,47 µg ml^{-1}), Alto (entre 5,47 e 10,00 µg ml^{-1}), Muito alto (> 10,00 µg ml^{-1}). Q1 e Q3 correspondem ao primeiro e terceiro quartis da distribuição amostral, respectivamente.

Entre as estirpes classificadas previamente como de produção muito alta de AIA (> 10,00 µg ml^{-1}), foi realizada a análise estatística pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$), a qual separou as estirpes em três grupos distintos de desempenho. O grupo **a** reuniu as estirpes com os maiores valores de síntese do fitormônio, com destaque para AL318 (19,17 µg ml^{-1}), seguida por AL124 (15,19 µg ml^{-1}), AL307 (15,07 µg ml^{-1}) e AL313 (14,19 µg ml^{-1}), além de um conjunto de outras estirpes que as mantiveram médias entre 13,63 e 11,38 µg ml^{-1}, essas estirpes se configuram como as mais promissoras visto seu potencial significativamente superior de produção de AIA (Figura 8).

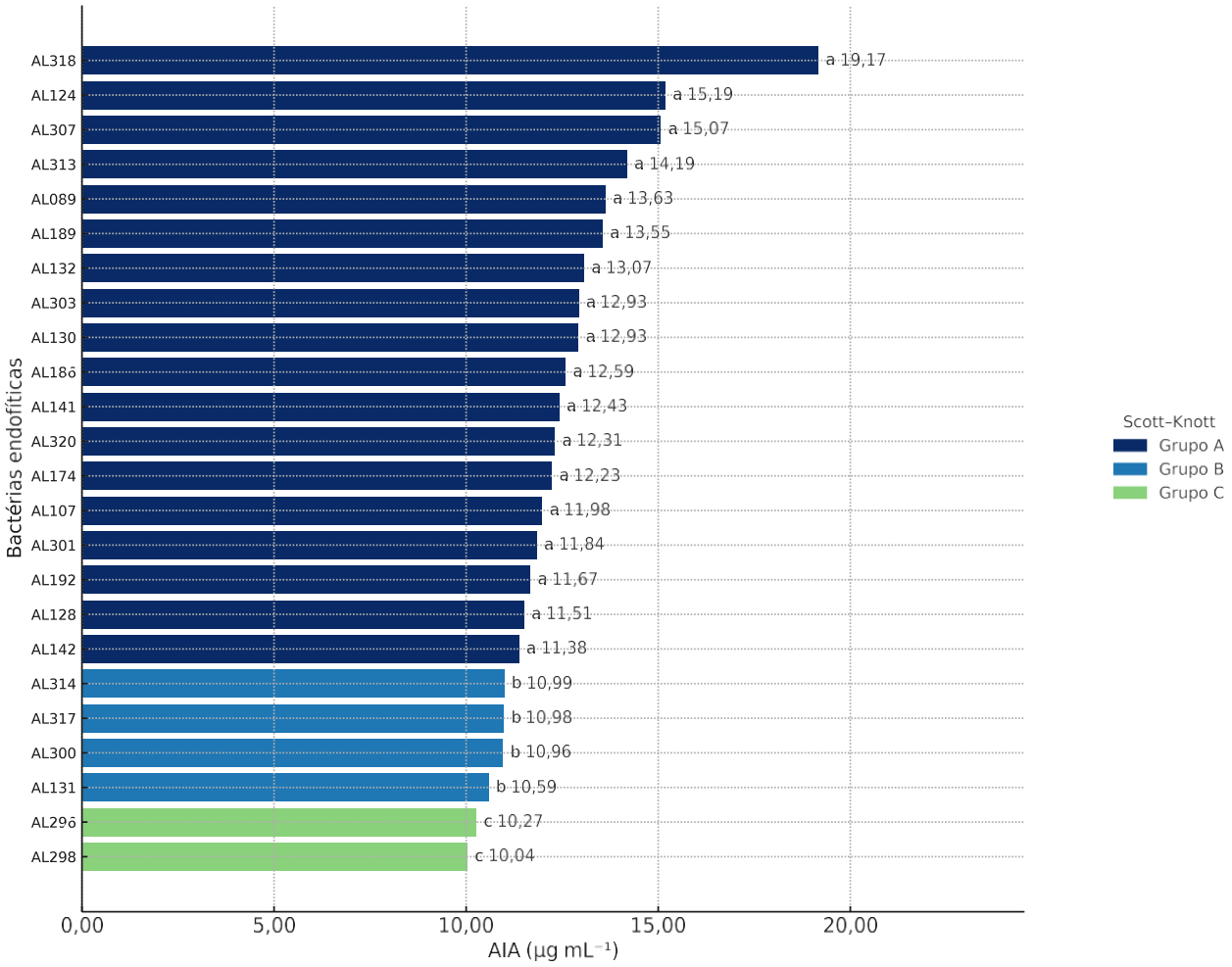


Figura 8: Produção de ácido indolacético (AIA) por estirpes bacterianas endofíticas de raiz de algodoeiro com média acima de 10,00 µg ml^{-1}.
*Médias seguidas das mesmas letras não diferem pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

No grupo **b**, enquadraram-se as estirpes AL314, AL317, AL300 e

AL131 com valores intermediários variando de 10,99 a 10,59 µg ml^{-1}, estatisticamente inferiores ao grupo a, mas ainda dentro da faixa considerada de alta produção. Por fim no grupo **c** agruparam-se as estirpes AL296 (10,27 µg ml^{-1}) e AL298 (10,04 µg ml^{-1}), as quais, embora tenham apresentado valores absolutos acima do limite de 10 µg ml^{-1}, foram inferiores às demais pelo teste aplicado de Scott-Knott ($p < 0,05$).

A integração dos dados das quatro funções avaliadas foi explorada pelo diagrama de Venn (Figura 9) complementado por um quadro resumo das interseções significativas (Tabela 5). O diagrama evidencia a ocorrência de quatro estirpes multifuncionais (P ∩ K ∩ FBN) sendo a AL001, AL065, AL066 e AL145, essas estirpes reúnem funções de mobilização de nutrientes, fixação de N_2 em vida livre e moderada produção de AIA.

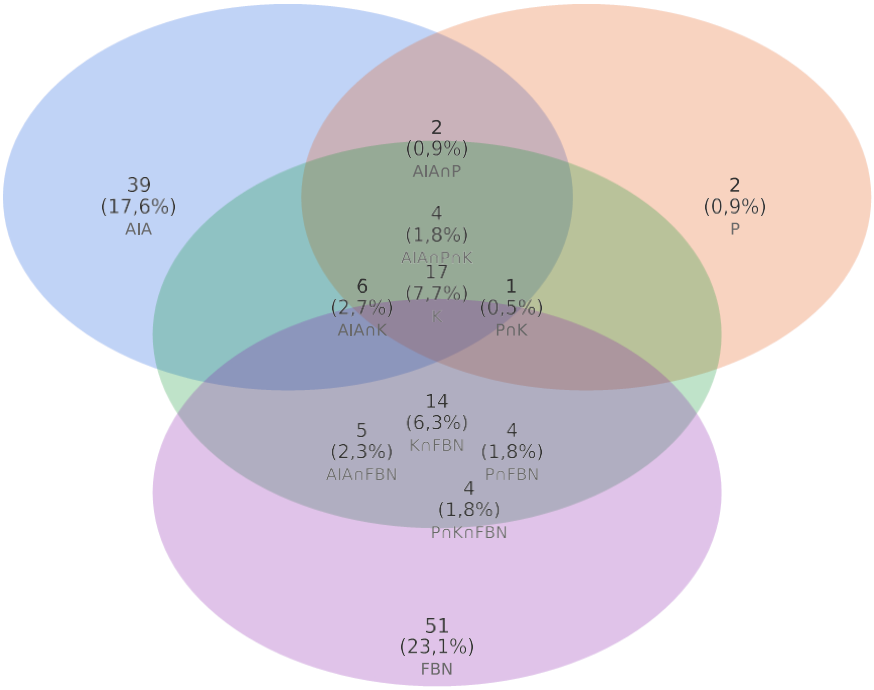


Figura 9: Diagrama de Venn representando as interseções significativas entre as funções bioquímicas em estirpes endofíticas da raiz de algodoeiro.
* (Produção de AIA maior que Q3 = 5,47 µg ml^{-1}, IS de solubilização médio/alto e fixação biológica de N_2 em vida livre).

Entre as combinações envolvendo alta produção de AIA (acima de 5,47 µg ml^{-1}) associada à solubilização simultânea de $Ca_3(PO_4)_2$ e K_2SiO_4 (médio/alto) sem FBN detectável (AIA ∩ P ∩ K), destacaram-se quatro estirpes,

sendo a AL079, AL107, AL303 e AL307. Já com a combinação de AIA alta com FBN positivo (AIA ∩ FBN), obteve-se quatro estirpes sendo AL012, AL158, AL164 e AL263, embora sem desempenho expressivo nos índices de solubilização.

A interseção mais representativa foi K_2SiO_4 (médio/alto) com FBN (K ∩ FBN) reunindo 18 estirpes (Tabela 5). Esse conjunto forma um grupo funcional combinando a fixação de N_2 com a mobilização de K_2SiO_4, funções diretamente relacionadas com o alongamento e proteção da parede celular na planta, respectivamente. Entre essas interseções, chama atenção o fato de que AL001, AL065, AL066 e AL145 apareceram em diferentes interseções funcionais como P ∩ K ∩ FBN e K ∩ FBN, caracterizando-se como estirpes com perfil multifuncional e potencial integrado de promoção de crescimento vegetal.

Tabela 5: Interseções significativas entre funções de promoção de crescimento vegetal em estirpes bacterianas endofíticas do algodoeiro.

Interseção	N° de estirpes	Código	Fósforo	Potássio	AIA	FBN
P ∩ K ∩ FBN	4	AL001	1,50	2,86	4,26	Positivo
		AL065	3,79	2,83	4,51	Positivo
		AL066	2,89	2,73	2,97	Positivo
		AL145	2,40	2,09	3,75	Positivo
AIA > Q3 ∩ P ∩ K	4	AL079	2	3,6	6,06	Negativo
		AL107	1,73	3,9	11,98	Negativo
		AL303	1,44	7,71	12,93	Negativo
		AL307	1,47	12,83	15,07	Negativo
AIA > Q3 ∩ FBN	4	AL012	-	-	6,34	Positivo
		AL158	-	-	6,47	Positivo
		AL164	-	-	5,53	Positivo
		AL263	-	-	7,94	Positivo
K ∩ FBN	18	AL001	1,50	2,86	4,26	Positivo
		AL024	-	2,08	1,15	Positivo
		AL038	1,29	4,11	3,83	Positivo
		AL046	-	9,75	1,42	Positivo

AL065	3,79	2,83	4,51	Positivo
AL066	2,89	2,73	2,97	Positivo
AL093	-	7,50	1,70	Positivo
AL096	1,19	4,50	4,85	Positivo
AL103	1,40	4,11	0,15	Positivo
AL145	2,40	2,09	3,75	Positivo
AL178	-	3,44	2,67	Positivo
AL215	-	6,50	4,82	Positivo
AL252	-	4,23	4,07	Positivo
AL270	-	3,43	4,76	Positivo
AL294	1,36	5,44	4,48	Positivo
AL297	1,50	5,75	4,54	Positivo
AL310	-	2,20	1,98	Positivo
AL311	-	2,11	4,17	Positivo

7.4 Promoção de crescimento *in vitro* em plântulas de algodoeiro (TMG47B2RF)

A triagem inicial considerou 221 estirpes avaliadas na promoção de crescimento vegetal *in vitro* e após a aplicação do critério de corte excluindo as estirpes que apresentaram resultados inferiores ao controle negativo (N50), foram incluídas nas análises univariadas um total de 111 (50,2 %), 95 (42,9 %), 101 (45,7 %) e 109 (49,3 %) estirpes nas análises de CA, CR, MSA e MSR, respectivamente (Apêndice 1). Os controles utilizados foram N100, N50 e AZOS (*A. brasilense* Ab-V5).

No conjunto, 14 estirpes apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$) no teste de Games-Howell para a promoção de crescimento vegetal, sendo 7 estirpes para MSA e 14 estirpes para MSR, para CA e CR, não houve significância (Tabela 6)

Tabela 6: Desempenho univariado (CA, CR, MSA, MSR) de plântulas de algodoeiro TMG47B2RF inoculadas com estirpes endofíticas de raiz de algodoeiro selecionadas em comparação aos controles (N50, N100 e AZOS).

Estirpes	CA (cm)	CR (cm)	MSA (mg)	MSR (mg)

N100	13,6	7,4	110,57	13,20
N50	11,4	6,6	88,47	9,03
AZOS	15,4	7,2	110,37	11,73
AL039	10,3 n/s	7,4 n/s	112,70 n/s	14,63 *
AL081	15,4 n/s	6,6 n/s	124,70 n/s	15,10 *
AL086	12,2 n/s	7,9 n/s	139,13 n/s	15,67 *
AL098	13,0 n/s	5,9 n/s	141,13 n/s	18,30 *
AL122	17,6 n/s	7,0 n/s	139,87 n/s	16,20 *
AL129	10,6 n/s	7,4 n/s	173,20 **	16,87 *
AL133	10,8 n/s	6,8 n/s	149,50 *	10,17 n/s
AL141	8,8 n/s	5,9 n/s	154,40 *	13,47 n/s
AL144	13,0 n/s	6,9 n/s	129,13 n/s	14,83 *
AL174	10,0 n/s	7,5 n/s	160,03 *	12,90 n/s
AL195	18,0 n/s	5,0 n/s	153,47 *	13,93 n/s
AL196	13,5 n/s	6,2 n/s	144,80 n/s	15,33 *
AL270	17,3 n/s	6,4 n/s	123,63 n/s	17,07 *
AL274	16,6 n/s	7,0 n/s	148,17 *	12,27 n/s
AL275	10,8 n/s	6,8 n/s	94,93 n/s	16,10 *
AL276	10,4 n/s	7,2 n/s	124,80 n/s	15,37 *
AL287	9,5 n/s	8,5 n/s	146,67 n/s	16,37 *
AL296	13,0 n/s	8,5 n/s	141,27 n/s	17,83 *
AL328	8,1 n/s	7,6 n/s	163,37 *	14,00 n/s
AL335	10,0 n/s	5,4 n/s	147,53 n/s	14,93 *

** = Diferença significativa vs N50 vs N100 Games-Howell ($p < 0,05$);

* = Diferença significativa vs N50 Games-Howell ($p < 0,05$);

n/s = Não significativo vs N50 vs N100 vs AZOS Games-Howell ($p < 0,05$);

Onde: CA = comprimento parte aérea (cm), CR = comprimento da raiz (cm), MSA = massa seca da parte aérea (mg), MSR = massa seca de raiz (mg).

Controles N100 (adubação nitrogenada completa da solução de Hoagland e Arnold, 1950), N50 (metade da adubação nitrogenada da solução de Hoagland e Arnold, 1950), AZOS (inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 + N50 em solução com metade da adubação nitrogenada).

Para comprimento da parte aérea (CA) e da raiz (CR), as médias variaram de 8,1 a 18,0 cm e de 5,0 a 8,5, respectivamente, sem diferenças estatísticas frente aos controles, indicando ausência de incrementos consistentes por inoculação no alongamento da planta.

Para massa seca da parte aérea (MSA), N50 apresentou 88,47 mg, enquanto N100 e AZOS atingiram 110,57 e 110,37 mg. A estirpe AL129 (173,20 mg; **) destacou-se em todos os controles, com ganho de 95,8 % sobre N50 e 56,6 % sobre N100. Outras seis estirpes diferiram significativamente de N50, sendo a AL328 (167,37 mg, *), AL174 (160,03 mg, *), AL141 (154,40 mg, *), AL195 (153,47 mg, *), AL133 (149,50 mg, *) e AL274 (148,17 mg, *) com ganhos de 67,5-90,9 % frente a N50 e 34,0- 44,7 % frente a N100 (Figura 10).

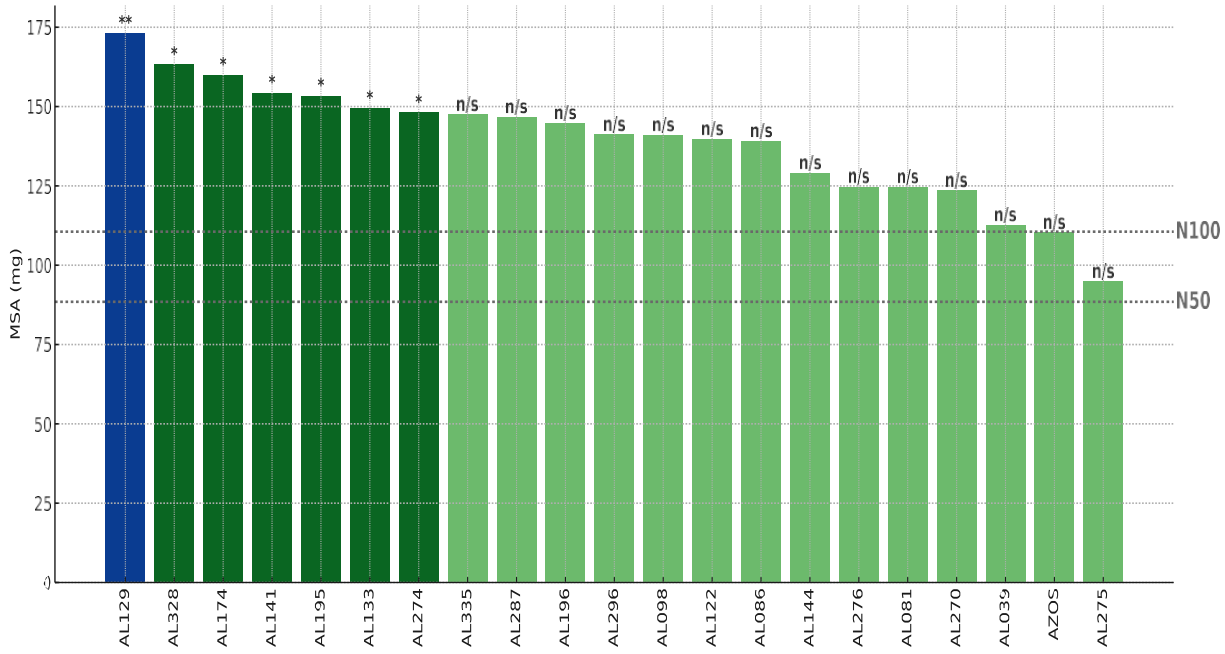


Figura 10: Massa seca da parte aérea (MSA) de plântulas de algodoeiro, variedade TMG47B2RF inoculadas com estirpes bacterianas endofíticas de raiz de algodoeiro selecionadas em comparação aos controles N50, N100 e AZOS.
* Valores médios expressos em mg, com indicação de significância pelo teste de Games-Howell ($p < 0,05$).

Para massa seca da raiz (MSR), N50 apresentou 9,03 mg, enquanto N100 e AZOS registraram 13,20 mg e 11,73, respectivamente. Destacaram-se AL098 (18,30 mg, *), AL296 (17,83 mg, *), AL270 (17,07 mg, *), AL129 (16,87 mg, *), AL287 (16,37 mg, *), AL122 (16,20 mg, *), AL275 (16,10 mg, *), AL086 (15,67 mg, *), AL276 (15,37 mg, *), AL196 (15,33 mg, *), AL081 (15,10 mg, *), AL335 (14,93 mg, *) AL144 (14,83 mg, *) e AL039 (14,63 mg, *), todas significativamente superior a N50, com ganhos de 62,0-89,0 % frente a N50 e 10,8-29,3 % frente a N100 (Figura 11).

Embora algumas estirpes não tenham diferido estatisticamente dos controles, observou-se incremento de 57,9-65,8 % em relação a N50 e de 26,5-

32,7 % em relação a N100 para a variável MSA, e de 42,8-55 % em N50 e 2,0-6,0 % em N100 para MSR. Entre essas, destacaram-se estirpes como AL086, AL081, AL144 e AL196, que apresentaram médias próximas aos controles N100 e AZOS, mantendo desempenho estável e consistente no acúmulo de biomassa, mesmo sem significância estatística.

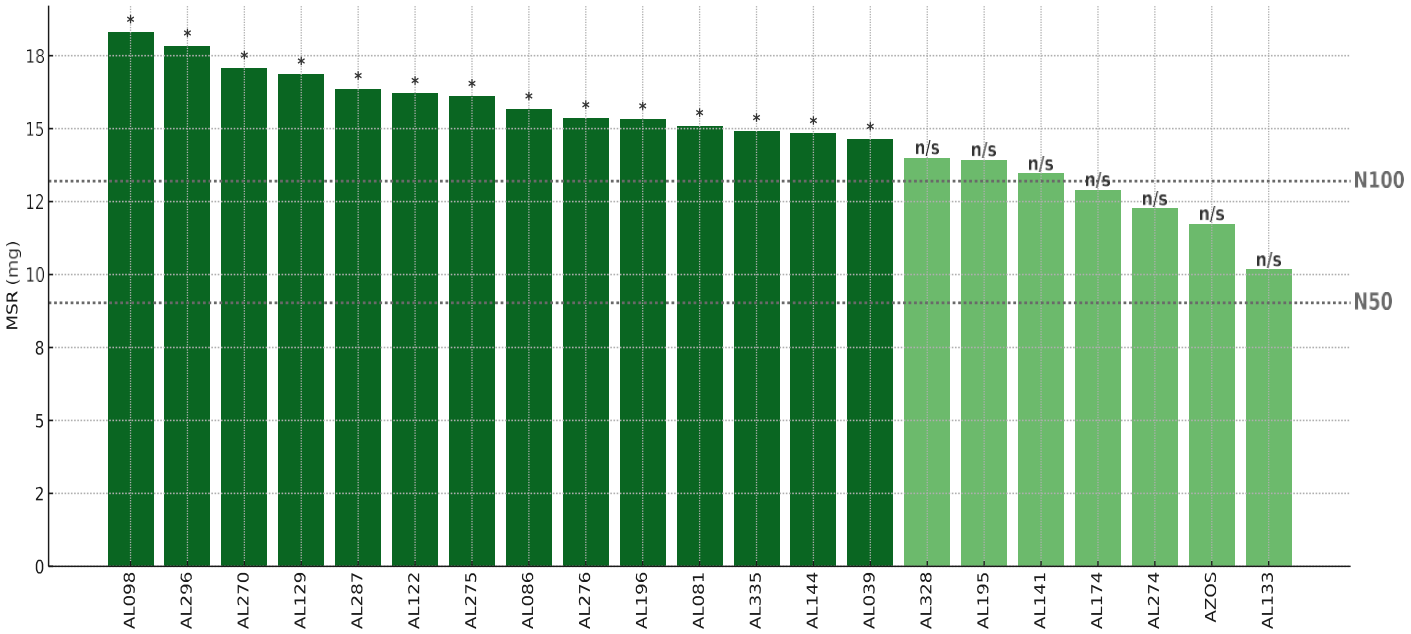


Figura 11: Massa seca da raiz (MSR) de plântulas de algodoeiro, variedade TMG47B2RF inoculadas com estirpes bacterianas endofíticas selecionadas em comparação aos controles N50, N100 e AZOS.
* Valores médios expressos em mg, com indicação de significância pelo teste de Games-Howell ($p < 0,05$).

Na análise multivariada de componentes principais (PCA) de todas as estirpes, os dois primeiros componentes explicaram 77,8 % da variação (PC1 = 57,3 %; PC2 = 20,4 %). O PC1 foi caracterizado principalmente por massa seca da parte aérea (MSA), seguida de massa seca da raiz (MSR) e comprimento da parte aérea (CA), enquanto PC2 foi associado com o comprimento de raiz (CR).

Houve correlação positiva forte entre MSA e MSR (Spearman = 0,67), já os controles se distribuíram de forma coerente, o N50 próximo à origem, N100 à direita e AZOS em posição intermediária (Figura 12).

Na PCA, foram destacadas dez estirpes com desempenho positivo na

promoção de crescimento das plântulas sendo as estirpes AL296, AL122, AL297, AL129, AL270, AL287, AL272, AL098, AL086 e AL274. Essas estirpes se distribuíram à direita da PC1, associadas ao gradiente positivo de biomassa (MSA e MSR), em concordância com os resultados univariados.

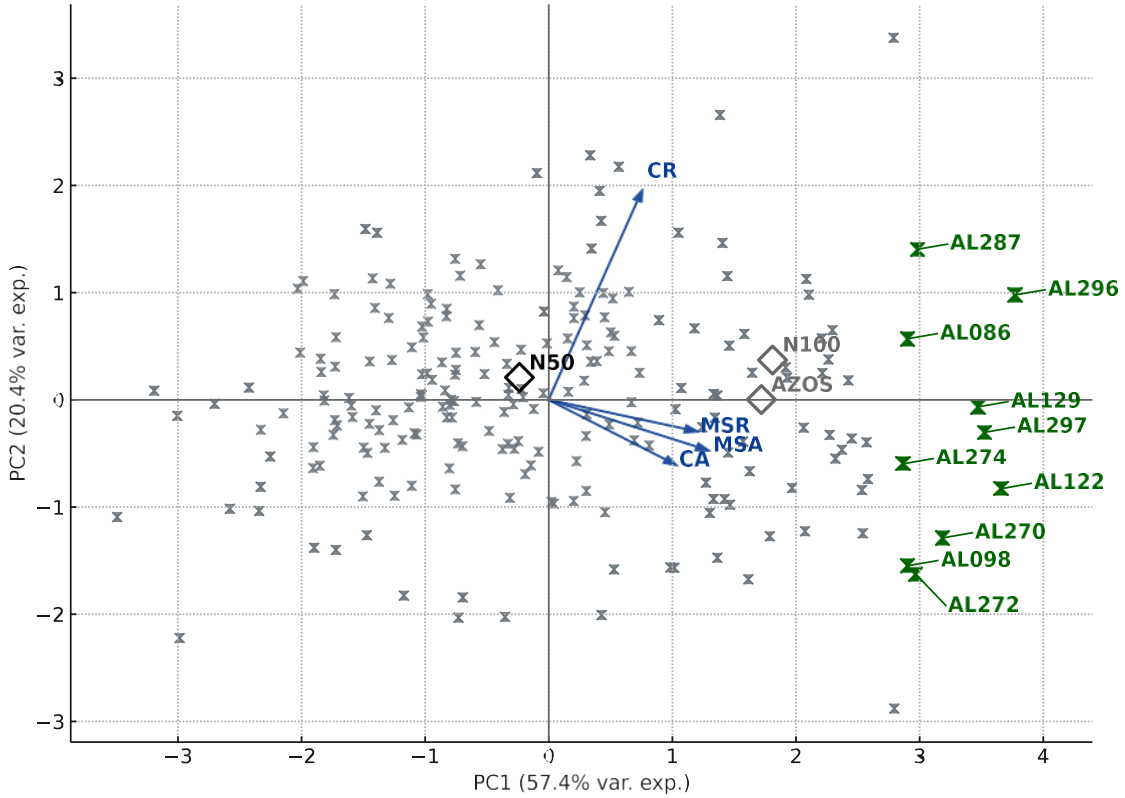


Figura 12: Análise de componentes principais (PCA) com base nas variáveis de promoção de crescimento na variedade de algodoeiro TMG47B2RF.
* Em que CA = comprimento parte aérea, CR = comprimento de raiz, MSA = massa seca da parte aérea e MSR = massa seca de raiz.

A integração dos dados de plantas com os mecanismos de promoção de crescimento (Tabela 7) mostrou que entre as estirpes que mais influenciaram PC1, AL270, AL272, AL287, AL296 e AL297, apresentaram índices de solubilização de silicato de potássio (K_2SiO_4) médios a altos. Observou-se ainda potencial de fixação de N_2 em vida livre nas estirpes AL270 e AL297 e produção de ácido indolacético (AIA) nas estirpes AL296 (10,27 µg ml^{-1}), AL098 (5,80 µg ml^{-1}) e AL129 (7,81 µg ml^{-1}). A solubilização de fosfato tricálcico $Ca_3(PO_4)_2$ apresentou valores baixos em todas as estirpes de destaque.

Tabela 7: Estirpes endofíticas selecionadas com desempenho de promoção de crescimento *in vitro* e em mecanismos de promoção de crescimento avaliados.

Estirpes	$Ca_3(PO_4)_2$ (IS)	K_2SiO_4 (IS)	AIA ($\mu g\ ml^{-1}$)	FBN	Mecanismos de promoção de crescimento
AL086	-	-	2,88	Negativo	AIA moderado
AL098	-	-	5,80	Negativo	Biomassa + AIA alto
AL122	-	-	4,58	Negativo	AIA moderado
AL129	-	-	7,81	Negativo	Biomassa + AIA alto
AL270	-	3,43	4,76	Positivo	Biomassa + K médio/alto + FBN
AL272	-	6,33	4,68	Negativo	Biomassa + K médio/alto
AL274	-	1,50	4,13	Positivo	Biomassa + FBN
AL287	-	8,63	4,69	Negativo	Biomassa + K médio/alto
AL296	-	4,00	10,27	Negativo	Biomassa + AIA muito alto + K médio/alto
AL297	1,50	5,75	4,54	Positivo	Biomassa + K médio/alto + FBN

$Ca_3(PO_4)_2$ (IS) = Índice de solubilização de fosfato tricálcico; K2SiO4 (IS) = Índice de solubilização de silicato de potássio; AIA = produção de ácido indolacético; FBN = fixação biológica de N_2 em vida livre.
* - = não detectado.

De modo geral, os resultados evidenciaram a seleção de estirpes endofíticas com desempenho superior nas variáveis de crescimento e com múltiplos mecanismos associados, as quais constituem o conjunto de interesse para etapas posteriores de validação e aplicação biotecnológica.

8. DISCUSSÃO GERAL

A obtenção de um número expressivo de isolados endofíticos do algodoeiro evidencia a capacidade dessa cultura em estabelecer associações com bactérias pertencentes a diferentes grupos. Esse resultado reflete, simultaneamente, a eficiência do protocolo de isolamento executado e da recuperação da microbiota presente no interior das raízes cultivadas em campo, indicando que o algodoeiro constitui um hospedeiro permissivo à colonização endofítica (WU et al., 2024).

A predominância de morfotipos compatíveis com *Pseudomonas* e rizóbios, seguida por bactérias diazotróficas de vida livre e bacilos esporulantes, sugere que o ambiente endofítico seleciona microrganismos com elevada plasticidade metabólica e de adaptação a diferentes nichos, padrão semelhante ao descrito em outras culturas agrícolas como de pepino, tomate, trigo e chá (*Camellia sinensis)* (LIU et al., 2019; LIN et al., 2022).

A predominância de bastonetes Gram-negativos observada neste estudo está de acordo com o padrão descrito para comunidades endofíticas de raízes que tendem a ser maior devido à eficiência na exploração de exsudatos radiculares (LIN et al., 2022). Ainda em menor frequência, a presença de bacilos Gram-positivos, sugere a ocorrência de gêneros de bacilos esporulantes, microrganismos reconhecidos pela capacidade de resistência a estresses ambientais e versatilidade em mecanismos promotores de crescimento (QIN et al., 2021; ZHAO et al., 2023).

Embora a caracterização inicial tenha sido baseada em morfotipos, é reconhecido que métodos dependentes de cultivos apresentam limitações, uma vez que colônias distintas podem representar variantes de um mesmo grupo bacteriano, essa limitação reforça a importância da caracterização molecular para uma avaliação mais precisa da diversidade endofítica (OLIVEIRA-COSTA et al., 2012; LIU et al., 2019).

A predominância de bastonetes Gram-negativos observada neste estudo é semelhante à relatada em outro trabalho que obteve 70,5 % de isolados endofíticos Gram-negativos de raízes e colmos de algodão e milho (MCINROY; KLOEPPER, 1995). De maneira semelhante, outro estudo aponta *Pseudomonas*

como um dos grupos dominantes na endosfera do algodoeiro, indicando enriquecimento desse gênero no interior dos tecidos vegetais desta planta (ZENG et al., 2022).

Isolados de bacilos Gram-positivos esporulados são recorrentes, este grupo é frequentemente associado à resistência de plantas a patógenos de solo (WU et al., 2024). Em algodoeiro, bacilos endofíticos têm sido recuperados com maior frequência em sementes e tecidos de genótipos resistentes à murcha de *Verticillium*, com relatos de antagonismo direto a esse patógeno (ZHANG et al., 2023; WU et al., 2024).

Entre as espécies endofíticas amplamente descritas na literatura, destacaram-se *B. subtilis* (HASHEM et al., 2019)*, B. velezensis,* (KHAN et al., 2020), *B. megaterium* (DAHMANI et al., 2020)*, B. pumilus* (DOBRZYNSKI et al., 2023) e *Paenibacillus polymyxa* (SINGH; WESEMAEL, 2022), todas associadas a mecanismos de promoção de crescimento e biocontrole em diferentes culturas. A recorrência desse grupo reforça o potencial do algodoeiro como reservatório de bacilos com interesse biotecnológico.

A presença de bactérias diazotróficas endofíticas entre os isolados foi indicada tanto por características morfotípicas quanto pela formação de película e alteração de pH em meio NFb, indicando atividade compatível com fixação biológica de N_2 em vida livre. Esse padrão é coerente com estirpes fixadoras conhecidas como *Herbaspirillum seropedicae* e com *Azoarcus* sp. BH72 (EGENER; HUREK; REINHOLD-HUREK, 1999; RONCATO-MACCARI et al., 2003).

Entre as bactérias diazotróficas mais citadas na literatura, destacaram-se *A. brasilense*, amplamente estudada em gramíneas (FUKAMI et al., 2018; DUARTE et al., 2020), *Gluconacetobacter diazotrophicus*, referência em cana-de-açúcar (JAMES et al., 2001; BERTALAN et al., 2009) e espécies do grupo *Paraburkholderia* reconhecidas pelo potencial em promoção de crescimento e indução de resistência (MIOTTO-VILANOVA et al., 2016; ESMAEEL et al., 2018).

Em algodoeiro, *A. chroococcum* e *A. brasilense* já foram descritos como potenciais biofertilizantes capazes de elevar o conteúdo de nitrogênio e reduzir a necessidade de adubação nitrogenada, embora a diversidade de

estirpes endofíticas associadas a cultivares comerciais permaneça pouco explorada (ROMERO-PERDOMO et al., 2017).

Em espécies não-leguminosas, rizóbios tradicionalmente associados à simbiose nodular, podem apresentar comportamento endofítico, inclusive no algodoeiro (ROMERO-PERDOMO et al., 2021). Diversos gêneros têm sido relatados com esse comportamento incluindo *Rhizobium leguminosarum, Sinorhizobium meliloti, Mesorhizobium ciceri, Bradyrhizobium spp., Azorhizobium spp.* (PIROMYOU et al., 2015; YADAV et al., 2021).

Nesses casos, a contribuição desses microrganismos está frequentemente associada a mecanismos indiretos, como produção de AIA, síntese de sideróforos e solubilização de fosfatos, uma vez que a fixação de N_2 pode ser variável e dependente da interação planta-microrganismo (SANTI et al., 2013; GOPALAKRISHNAN et al., 2015; ROMERO-PERDOMO et al., 2021).

As técnicas de isolamento empregadas foram direcionadas a grupos bacterianos com histórico de promoção de crescimento vegetal (BPCV) e presença em bioinsumos comerciais. Entre eles, *A. brasilense* (Ab-V5 e Ab-V6), amplamente utilizando em inoculantes agrícolas (EMBRAPA, 2018), além de espécies de bacilos como *B. subtilis* (CCT 7993, CBMAI 1680 e CNPSo 2657), *B. amyloliquefaciens* (CN-307) e *B. aryabhattai* (CBMAI 1120), já registradas em produtos nacionais (BRASIL, 2022; ADAPAR, 2023; MAPA, 2023). Mais recentemente, formulações com *Pseudomonas*, especialmente *P. fluorescens* (ATCC 13525), tem sido incorporada como inoculantes multifuncionais para braquiárias (EMBRAPA, 2024).

A análise dos perfis genéticos revelou elevada diversidade entre as estirpes endofíticas, indicando que o algodoeiro abriga microrganismos com ampla variabilidade evolutiva. No entanto, a formação de grupos com múltiplos isolados indica que essa diversidade ocorre de maneira estruturada, com organização em perfis genéticos relacionados sugerindo redundância funcional. Esse padrão, é consistente com relatos de diversidade ampliada em comunidades endofíticas associadas ao algodoeiro e a outras culturas, nos quais perfis moleculares distintos refletem adaptação a diferentes micro-habitats radiculares e elevada plasticidade metabólica (LIU et al. 2019; ZHANG et al., 2023; WU et al., 2024).

A maior variabilidade observada entre estirpes Gram-negativas é compatível com o comportamento descrito para grupos como *Pseudomonas* e *Burkholderia*, enquanto para bacilos Gram-positivos detectou-se padrões mais conservados de organização genômica refletindo características semelhantes as já relatadas para bacilos endofíticos associados as plantas (MARTÍNEZ-HIDALGO et al., 2021; PANDEY et al., 2021; KUMAR et al., 2022).

A distribuição dos mecanismos de promoção de crescimento entre diferentes grupos genéticos reforça que a capacidade funcional não está necessariamente associada à proximidade molecular. Resultados semelhantes tem sido relatado para *Bacillus, Pseudomonas* e *Paraburkholderia*, nos quais a produção de AIA, a solubilização de nutrientes e a capacidade de fixação de N_2, aparecem distribuídas entre grupos distintos (ESMAEEL et al., 2018; QIN et al., 2021). Esse padrão sustenta a hipótese de redundância funcional na comunidade endofítica do algodoeiro.

A caracterização funcional das estirpes endofíticas revelou a ocorrência de diferentes mecanismos de promoção de crescimento vegetal, incluindo fixação biológica de N_2 em vida livre, solubilização de nutrientes e produção de ácido indolacético (AIA). A expressão desses mecanismos em proporções distintas indica que a comunidade endofítica associada ao algodoeiro apresenta elevada diversidade funcional, característica compatível com sistemas agrícolas submetidos a variações ambientais e nutricionais (FUKAMI et al., 2018).

As variações morfológicas e os padrões de coloração de Gram observados entre as estirpes positivas para fixação de N_2 são compatíveis com diferentes grupos de bactérias diazotróficas descritas na literatura, incluindo *Azospirillum, Herbaspirillum* e *Azotobacter*. Esses grupos apresentam características como bastonetes Gram-negativos curvos ou vibrioides, formação de película superficial e células de maior porte (GERK et al., 2000; TROVERO et al., 2018; AASFAR et al., 2021).

No ensaio de solubilização de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) em meio NBRIP, os índices de solubilização observados situaram-se majoritariamente dentro das faixas consideradas moderadas a altas em estudos com bactérias endofíticas e rizosférica, refletindo padrões comuns a gêneros como

Pseudomonas, Burkholderia e *Bacillus* (ALIYAT et al., 2020; YAHYA et al., 2021; KAUR et al., 2022).

Em rizóbios, valores semelhantes têm sido descritos em meios tamponados, reforçando que a solubilização de fósforo é um traço funcional amplamente distribuído e dependente das condições experimentais (KUMAR et al., 2014; SARMIENTO et al., 2024). Assim, embora a solubilização de fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) não tenha sido o mecanismo mais expressivo entre as estirpes de maior desempenho global, sua ocorrência contribui para o entendimento do perfil funcional da comunidade endofítica.

Em contraste, a solubilização de silicato de potássio (K_2SiO_4) destacou-se como um dos mecanismos mais expressivos, com estirpes apresentando índices superiores aos usualmente relatados para bactérias avaliadas em meio Aleksandrov (XIA et al., 2018; PÉREZ-PÉREZ et al., 2021; SAHEEWALA et al., 2023).

Esse desempenho sugere elevada capacidade de mobilização de fontes insolúveis de potássio, característica particularmente relevante para culturas exigentes em K, como o algodoeiro (SAHEEWALA et al., 2023). A ocorrência desse mecanismo em estirpes com outros atributos promotores de crescimento indica potencial para respostas agronômicas mais consistentes, justificando etapas subsequentes de validação sob condições padronizadas e com diferentes fontes minerais como mica e feldspato (XIA et al., 2018).

A produção de AIA apresentou ampla variação entre as estirpes avaliadas, com predominância de níveis moderados e um subconjunto de estirpes com produção elevada. Valores observados situaram-se dentro das faixas descritas para bactérias promotoras de crescimento cultivadas em meios suplementados com triptofano, nas quais produções entre 10 e 40 μg mL^{-1} são comuns em condições otimizadas (BHARUCHA et al., 2013; CHEN et al., 2017; FOUDA et al., 2021; KARNWAL et al., 2022).

Do ponto de vista biológico, a produção de AIA tende a favorecer o desenvolvimento de raízes laterais e o acúmulo de biomassa radicular, enquanto concentrações excessivas podem resultar em efeitos inibitórios sobre o alongamento das raízes (SHOCKLEY et al., 2014; GANESH et al., 2024). Dessa forma, estirpes com produção moderada a alta, mas não extrema, apresentam

maior probabilidade de resposta positiva em plantas, especialmente quando associadas a mecanismos nutricionais complementares.

A integração dos mecanismos avaliados evidenciou a presença de estirpes com perfil multifuncional, combinando fixação de N_2, solubilização de potássio (K_2SiO_4) e produção de AIA como nas estirpes AL270, AL296 e AL297, estas foram capazes de apresentar desempenho consistente nos ensaios com plântulas de algodoeiro sob condição de adubação de N reduzida. Esses resultados indicam que a combinação entre FBN ∩ K ∩ AIA favorece acúmulo de biomassa aérea e radicular, em detrimento do simples alongamento, padrão associado à melhoria da eficiência no uso de nutrientes (FOUDA et al., 2021).

Também foi possível verificar um núcleo multifuncional composto pela combinação P ∩ K ∩ FBN no qual se destacaram as estirpes AL001, AL065, AL066 e AL145. Microrganismos com capacidades semelhantes como *Paenibacillus* spp., podem estimular ganhos de biomassa na massa seca em plantas de trigo, pepino e tomate (LIU et al., 2019). Embora essas estirpes não tenham apresentado incremento de biomassa nos ensaios iniciais, o seu perfil funcional sugere potencial uso em condições de solo real em áreas com menor fertilidade (ZULUAGA et al., 2020).

Outras estirpes apresentaram destaque por mecanismos específicos, sendo a estirpe AL307, por exemplo, capaz de combinar elevada K ∩ AIA, sugerindo forte atuação na modulação hormonal e na mobilização de nutrientes, perfil semelhante ao descrito para *Bacillus velezensis* (Y-20) em alfafa (WANG et al., 2024).

De forma distinta, AL129 destacou-se pelo aumento expressivo de biomassa aérea, associado predominantemente à produção de AIA, indicando um efeito majoritariamente hormonal, ainda que menos multifuncional. Esse perfil sugere que AL129 pode atuar de forma eficiente em sistemas nos quais o suprimento nutricional já esteja parcialmente atendido, potencializando a redistribuição de assimilados e o crescimento da parte aérea utilizado isoladamente ou consorciado com bactérias fixadoras de N_2 ampliando o espectro de aplicação (GOPALAKRISHNAN et al., 2015; FOUDA et al., 2021).

Nos ensaios com plântulas de algodoeiro, o ganho concentrado em biomassa aérea e radicular, observado principalmente para as estirpes AL129,

AL270, AL296, AL297 e AL098, reforça que a resposta fisiológica está mais relacionada à eficiência metabólica e à redistribuição de assimilados do que o alongamento dos órgãos vegetais (FOUDA et al., 2021; ZHAO et al., 2024).

Esse comportamento é coerente com estudos que relatam efeitos semelhantes em algodoeiro e outras culturas inoculadas com bactérias promotoras de crescimento (BPCV), incluindo *Azospirillum, Bacillus* e bactérias solubilizadoras de potássio (FUKAMI et al., 2018; FOUDA et al., 2021; QIN et al., 2021; ZHAO et al., 2024).

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo demonstram que o desempenho das estirpes endofíticas associadas ao algodoeiro não está condicionado à proximidade genômica, mas à combinação funcional de mecanismos promotores de crescimento vegetal. A integração entre fixação de N_2 em vida livre, solubilização de potássio e produção de ácido indolacético (AIA) mostrou-se determinante para os ganhos observados em biomassa aérea e radicular, especialmente sob condição de N reduzido, padrão já descrito para BPCV em diferentes culturas agrícolas (FUKAMI et al., 2018; FOUDA et al., 2021).

Nesse contexto, estirpes como AL270, AL296 e AL297 destacam-se como as candidatas mais completas do ponto de vista multifuncional, ao aliarem mecanismos nutricionais e hormonais com desempenho consistente em plântulas de algodoeiro. Esse perfil é compatível com a literatura, que aponta que microrganismos capazes de combinar fixação de N_2, solubilização de nutrientes e produção de AIA tendem a apresentar respostas mais estáveis e eficientes em condições de redução de fertilizantes minerais (ZULUAGA et al., 2020; SARMIENTO et al., 2024).

Em paralelo, estirpes como AL307, AL129 e AL098 evidenciam que mecanismos específicos, particularmente relacionados à produção de AIA e à modulação do crescimento radicular ou da biomassa aérea, também podem resultar em respostas fisiológicas expressivas. Estirpes com esse perfil predominantemente hormonal têm sido associadas a incrementos significativos de biomassa e reorganização do sistema radicular, mesmo na ausência de múltiplos mecanismos nutricionais, ampliando as possibilidades de uso isolado ou em consórcios microbianos (GOPALAKRISHNAN et al., 2015; FOUDA et al.,

2021).

A elevada diversidade genética e funcional observada sustenta a plasticidade da comunidade endofítica do algodoeiro e reforça o potencial dessa cultura como fonte de microrganismos candidatos a bioinsumos, conforme já observado em estudos com comunidades endofíticas diversas e funcionalmente redundantes (ESMAEEL et al., 2018; ZHANG et al., 2023).

Assim, a abordagem adotada neste trabalho, baseada na integração de dados funcionais, fisiológicos e multivariados, constitui uma base robusta para a seleção racional de estirpes promissoras e para o direcionamento de etapas futuras de validação em condições de vaso e campo, visando o desenvolvimento de inoculantes com maior estabilidade e eficiência agronômica.

9. CONCLUSÕES

- O algodoeiro abriga uma comunidade bacteriana endofítica diversa e funcionalmente ativa, com potencial para promoção de crescimento vegetal;
- As estirpes isoladas apresentaram diferentes mecanismos de ação, incluindo produção de ácido indolacético, fixação biológica de nitrogênio e solubilização de nutrientes.
- Destacam-se as estirpes AL270, AL297, AL296, AL098 e AL129, que promoveram incremento de biomassa em plântulas sob condição de nitrogênio reduzido.
- Esses resultados evidenciam o potencial dessas estirpes como candidatas para o desenvolvimento de bioinoculantes voltados ao cultivo do algodoeiro em sistemas com menor uso de fertilizantes nitrogenados.

REFERÊNCIAS

Aasfar A, Bargaz A, Yaakoubi K, Hilali A, Bennis I, Zeroual Y, Meftah Kadmiri I. 2021. Azotobacter spp.: a comprehensive review on morphology and plant growth promotion. Front Microbiol. 12:628379. DOI: 10.3389/fmicb.2021.628379.

Abrapa – Associação Brasileira dos Produtores de Algodão. 2023. Algodão brasileiro certifica mais de 83 % da produção nacional com práticas sustentáveis. Abrapa Notícias. Disponível em: https://abrapa.com.br. Acesso em: 03 set. 2025.

Adapar – Agência de Defesa Agropecuária do Paraná. 2023. Bula – RESTRICT: produto microbiológico à base de *Bacillus amyloliquefaciens*. Curitiba: ADAPAR. Disponível em: https://www.adapar.pr.gov.br. Acesso em: 02 out. 2025.

Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S, Shahzad S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. Microbiol Res. 221:36–49. DOI: 10.1016/j.micres.2019.02.001.

Alane P, Pandolfi M. 2019. Modernização tecnológica e competitividade na cadeia do algodão. Rev Econ Agronegócio. 17(3):88–105. DOI: 10.1590/rev.agro.2019.0003.

Alayafi AAM, Alharbi BM, Abdulmajeed AM, Alnusaire TS, Alrashidi AA, Al-Balawi SM, Khalaf Anazi H, Alghanem SMS, Al Zoubi OM, Soliman MH. 2025. Arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis enhances growth, nutrient uptake, and oil quality in sunflower–pumpkin intercropping systems. Front Plant Sci. 16:1598272. DOI: 10.3389/fpls.2025.1598272.

Aleksandrov VG, Blagodyr RN, Il'ev IP. 1967. Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. Mikrobiol Zh. 29(1):111–114.

Aliyat FZ, Taha M, Alami A, Benbrahim KF, Zeroual Y, Ibnsouda SK. 2020. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from phosphate sludge. Open Agric J. 14:16–24.

Almeida MR, Aumond M, Da Costa CT, Schwambach J, Ruedell CM, Correa LR, Fett-Neto AG. 2017. Environmental control of adventitious rooting in Eucalyptus and Populus cuttings. Trees. 31(1):1377–1390. DOI: 10.1007/s00468-017-1551-7.

Alvares CA, Stape JL, Sentelhas PC, Gonçalves JLM, Sparovek G. 2013. Köppen's climate classification map for Brazil. Meteorol Z. 22(6):711–728. DOI: 10.1127/0941-2948/2013/0507.

Aquino AJS, Silva IR, Novais RF, Lima JM, Oliveira JA, Curi N. 2012. Disponibilidade de fósforo em solos do Cerrado e sua relação com atributos químicos e mineralogia. Rev Bras Ciênc Solo. 36(4):1087–1098. DOI:

10.1590/S0100-06832012000400012.

Asghar HN, Zahir ZA, Arshad M, Khaliq A. 2002. Relationship between *in vitro* production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. Biol Fertil Soils. 35:231–237. DOI: 10.1007/s00374-002-0462-8.

Aslam S, Baber M, Naqqash T, Javed M, Bredenbruch S, Grundler FMW, Schleker ASS. 2025. Rhizospheric *Bacillus* isolates control *Fusarium* wilt on cotton and enhance plant biomass and root development. Front Microbiol. 16:1580937. DOI: 10.3389/fmicb.2025.1580937.

Baldani VL, Baldani JI, Döbereiner J. 1987. Fixação biológica de nitrogênio em plantas não-leguminosas. Pesq Agropec Bras. 22(9):1023–1034.

Beltrão NEM, Azevedo DMP. 2008. O agronegócio do algodão no Brasil. 2 ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

Berraquero FR, Baya AM, Cormenzana AR. 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. Ars Pharm. 17(1):399–406.

Bertalan M, Albano R, de Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, Teixeira K, Schwab S, Araujo J, Oliveira A, França M, Magalhães J, Alquéres S, Cardoso A, Almeida W, Loureiro M, Nogueira E, Câmara F, Almeida L, Silva R, Baldani J, Ferreira B, Huergo L, Pedrosa F, Drummond R, Souza E, Freitas F, Oliveira D, Ayub R, Donato M, Figueiredo D, Brígido M, Menna P, Hungria M, Betancourt A, Quisen R, Nápoles M, Martínez-Drets G, De Souza Filho G, Elmerich C, Kitajima J, Oliveira A, Setubal J. 2009. Complete genome sequence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. BMC Genomics. 10:450. DOI: 10.1186/1471-2164-10-450.

Bharucha U, Patel K, Trivedi UB. 2013. Production of indole acetic acid by *Pseudomonas* spp. and its effect on plant growth promotion. Indian J Exp Biol. 51(6):472–476.

Bhattacharyya PN, Jha DK. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World J Microbiol Biotechnol. 28(1):1327–1350. DOI: 10.1007/s11274-011-0979-9.

Bisquerra R, Sarriera JC, Martínez F. 2009. Introdução à Estatística: enfoque informático com o pacote SPSS. Porto Alegre: Bookman.

Brasil – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). 2022. Agrofit: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Produtos registrados à base de *Bacillus subtilis* no Brasil. Brasília: MAPA. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br. Acesso em: 02 out. 2025.

Brito MTS, Vieira MMR, Campos JMF. 2015. Resposta do feijoeiro à inoculação

com rizóbio e fertilização nitrogenada. Rev Bras Ciênc Solo. 39(5):1325–1335. DOI: 10.1590/0100-0683rbcs20150477.

Brum MS, Cunha VS, Martin TN, Alessio PG, Almeida GA. 2021. Black oat and ryegrass inoculated with *Azospirillum brasilense* in crop-livestock system. Rev Caatinga. 34(2):276–286. DOI: 10.1590/1983-21252021v34n205rc.

Caixeta NMF, Reis JMR. 2023. Eficiência da co-inoculação na soja. Rev Cerrado Agrociências. 14(1):9–17. DOI: 10.46551/rca.v14n1a2.

Chaves DP, Zucareli C, Oliveira-Júnior A. 2013. Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no milho. Semina Ciênc Agrár. 34(1):57–72. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n1p57.

Chen B, Zhang Y, Guo H, Chen L, Dai H, Liu L, Gao X. 2017. Endophytic *Pseudomonas fluorescens* produces indole-3-acetic acid and promotes plant growth. Sci Rep. 7:7947. DOI: 10.1038/s41598-017-08479-5.

Chowdhary R, Srivastava D, Sharma S, Kaur H, Yadav A. 2025. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis and chlorophyll under stress. Sci Total Environ. 918:171112. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2025.171112.

Conab – Companhia Nacional de Abastecimento. 2025. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2024/25 – 11º levantamento. Brasília: Conab. Disponível em: https://www.gov.br/conab. Acesso em: 03 set. 2025.

Conover WJ. 1999. Practical nonparametric statistics. 3 ed. New York: John Wiley & Sons. 584 p.

Cubillos-Hinojosa JG, Araújo AS, Saccol-de-Sá EL, Dick DP. 2021. Seleção de rizóbios eficientes em *Leucaena leucocephala*. Rev Bras Ciênc Solo. 45:e0210124. DOI: 10.1590/0100-0683rbcs20210124.

Cubillos-Hinojosa JG, Muniz FW, Saccol-de-Sá EL, Dick DP. 2024. Co-inoculação com rizóbios e *Azospirillum* aumenta biomassa e fixação de nitrogênio. Appl Soil Ecol. 200:105678. DOI: 10.1016/j.apsoil.2024.105678.

Dahmani MA, Desrut A, Moumen B, Verdon J, Mermouri L, Kacem M, Coutos-Thévenot P, Kaid-Harche M, Bergès T, Vacheron J, Prigent-Combaret C, Messaoudi K. 2020. Unearthing the plant growth-promoting traits of *Bacillus megaterium* RmBm31. Front Plant Sci. 11:124. DOI: 10.3389/fpls.2020.00124.

Döbereiner J. 1978. Nitrogen-fixing bacteria associated with grasses. Nature. 274:241–243.

Döbereiner J, Baldani VLD, Baldani JI. 1995. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: Embrapa. 60 p.

Dobrzynski J, Kurek E, Dobrzyńska M, Górska A, Skarzyńska M, Struszczyk-Świta K, Lejman A, Grybel M, Lojkowska E, Narajczyk M, Czaplewska P. 2023. Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. Front Microbiol. 14:1194606. DOI: 10.3389/fmicb.2023.1194606.

Duarte CFD, Cecato U, Trento Biserra T, Mamédio D, Galbeiro S. 2020. *Azospirillum* spp. in grasses and forages. Rev Mex Cienc Pecuarias. 11(1):223–240. DOI: 10.22319/rmcp.v11i1.4951.

Durán D, Rey L, Mayo J, Zúñiga-Dávila D, Imperial J, Ruiz-Argüeso T, Martínez-Romero E, Ormeño-Orrillo E. 2014. *Bradyrhizobium* spp. in *Phaseolus lunatus*. Int J Syst Evol Microbiol. 64:2072–2078. DOI: 10.1099/ijs.0.059238-0.

Egner T, Hurek T, Reinhold-Hurek B. 1999. Endophytic expression of nif genes in rice roots. Mol Plant Microbe Interact. 12:813–819. DOI: 10.1094/MPMI.1999.12.9.813.

Embrapa. 2018. Draft genome sequences of *Azospirillum brasilense* Ab-V5 and Ab-V6. Brasília: Embrapa. Acesso em: 02 out. 2025.

Embrapa. 2024. Inoculante multifuncional para pastagens. Brasília: Embrapa. Acesso em: 02 out. 2025.

Esmaeel Q, Pupin M, Kieu NP, Chataigné G, Béchet M, Deravel J, Krier F, Höfte M, Jacques P, Leclère V. 2018. *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN interaction with plants. Front Microbiol. 9:2093. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02093.

Ferreira BN, Montebello AES, Santos JA, Marjotta-Maistro MC. 2022. Cadeia produtiva do algodão no Brasil. Res Soc Dev. 11(10):1–25. DOI: 10.33448/rsd-v11i10.31520.

Ferreira DF, Cavalcanti PP, Nogueira DA. 2013. ExpDes: Experimental Designs package. Disponível em: https://cran.r-project.org/package=ExpDes. Acesso em: 10 jan. 2025.

Ferro HM, Souza RM, Lelis FMV, Silva JCP, Medeiros FHV. 2020. Bacteria for cotton plant protection. Rev Caatinga. 33(1):43–53. DOI: 10.1590/1983-21252020v33n105rc.

Fisher RA. 1925. Statistical methods for research workers. Edinburgh: Oliver & Boyd.

Fouda A, Hassan SE, Abdo AM, Alwakeel SS, El-Sadany MA. 2021. Plant growth-promoting endophytic bacterial community and their role in plant growth and stress tolerance. J Microbiol Biotechnol. 31(6):823–838. DOI: 10.4014/jmb.2009.09012.

Fukami J, Cerezini P, Hungria M. 2018. *Azospirillum*: benefits beyond nitrogen

fixation. AMB Express. 8:73. DOI: 10.1186/s13568-018-0608-1.

Games PA, Howell JF. 1976. Pairwise multiple comparison procedures with unequal n's and/or variances: a Monte Carlo study. J Educ Stat. 1(2):113–125. DOI: 10.3102/10769986001002113.

Ganesh PS, Suresh A, Choudhury SR, Thangaraj A, Rajendran V. 2024. Plant growth-promoting endophytic bacteria improve physiological traits of rice under salinity stress. Front Plant Sci. 15:1374877. DOI: 10.3389/fpls.2024.1374877.

Geib SM, Wright MS, Guo J, David MR, Ketterings QM. 2015. Nitrogen management strategies in cotton cultivation. J Plant Nutr. 38(7):1040–1052. DOI: 10.1080/01904167.2014.983126.

Gerk LP, Pereg-Gerk TM, Reinhold-Hurek B, Hurek T. 2000. Mutants with enhanced nitrogenase activity in *Azospirillum*–rice associations. Mol Plant Microbe Interact. 13(4):387–394. DOI: 10.1094/MPMI.2000.13.4.387.

Gerum AFAA, Santana MA, Baldas MAS, Santos GS. 2023. Bioinsumos: tendência de crescimento no Brasil. Embrapa. Disponível em: https://www.embrapa.br. Acesso em: 02 set. 2024.

Gírio LAS, Dias FLF, Reis VM, Urquiaga S, Schultz N, Bolonhezi D, Mutton MA. 2015. Bactérias promotoras de crescimento e adubação nitrogenada na cana-de-açúcar. Pesq Agropec Bras. 50(1):33–43. DOI: 10.1590/S0100-204X2015000100005.

Glick BR. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica. 2012:963401. DOI: 10.6064/2012/963401.

Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabharathi R, Varshney RK, Gowda CLL, Krishnamurthy L. 2015. Plant growth-promoting rhizobia: challenges and opportunities. 3 Biotech. 5:355–377. DOI: 10.1007/s13205-014-0241-x.

Guimarães VF, Klein J. 2023. *Pseudomonas fluorescens* promove crescimento e aumenta fósforo no milho. Res Soc Dev. 12(6):1–27. DOI: 10.33448/rsd-v12i6.38903.

Guzmán A, Obando M, Rivera D, Bonilla R. 2012. Rizobacterias promotoras de crescimento no algodão. Rev Colomb Biotecnol. 14(1):182–190.

Hahn L, Sá ELS, Osório Filho BD, Machado RG, Damasceno RG, Giongo A. 2016. Inoculação com *Azospirillum* promove crescimento de arroz. Rev Bras Ciênc Solo. 40:1–15. DOI: 10.1590/18069657rbcs20160008.

Hashem A, Tabassum B, Abd_Allah EF. 2019. *Bacillus subtilis* como promotora de crescimento vegetal. Saudi J Biol Sci. 26(6):1291–1297. DOI: 10.1016/j.sjbs.2019.05.004.

Heras J, Domínguez C, Mata E, Pascual V, Lozano C, Torres C, Zarazaga M. 2015. GelJ: tool for analyzing DNA fingerprint gels. BMC Bioinformatics. 16:270. DOI: 10.1186/s12859-015-0703-0.

Hiremani NS, Verma P, Gawande SP, Sain SK, Nagrale DT, Salunkhe VN, Shah V, Narkhedkar NG, Waghmare VN. 2020. Endophytic fungi in cotton. S Afr J Bot. 134:329–335. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.03.008.

Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station. Circular 347. Disponível em: https://escholarship.org/uc/item/6r9668p2. Acesso em: 10 jan. 2025.

Hofling JF, Gonçalves RB. 2008. Microscopia de luz em microbiologia. Porto Alegre: Artmed. 244 p.

Hungria M. 1994. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. In: Hungria M, Araújo RS (eds.). Manual de métodos em microbiologia agrícola. Brasília: Embrapa. p. 45–61.

Hungria M, Mendes IC. 2015. Nitrogen fixation with soybean. In: De Bruijn FJ (ed.). Biological nitrogen fixation. Hoboken: Wiley. p. 1009–1023. DOI: 10.1002/9781119053095.ch99.

Jackson DA. 1993. Stopping rules in principal components analysis. Ecology. 74(8):2204–2214.

James EK, Olivares FL, de Oliveira ALM, dos Reis FB, da Silva LG, Reis VM. 2001. Interaction between sugarcane and *Gluconacetobacter diazotrophicus*. J Exp Bot. 52(357):747–760. DOI: 10.1093/jxb/52.357.747.

Kaneko FH, Carvalho MCS, Andrade DS, Lima FS, Moraes FL. 2014. Relação entre fósforo, potássio e rendimento do algodoeiro. Rev Bras Ciênc Solo. 38(5):1444–1453. DOI: 10.1590/S0100-06832014000500018.

Kappes C, Arf O, Arf MV, Ferreira JP, Dal Bem EA, Portugal JR, Vilela RG. 2013. Inoculação com bactérias diazotróficas em milho. Semina Ciênc Agrár. 34(2):527–538. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n2p527.

Kapulnik Y, Okon Y, Hems Y. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum*. Can J Microbiol. 31(10):881–887. DOI: 10.1139/m85-165.

Karnwal A, Singh S, Bhatia R. 2022. Halotolerant plant growth-promoting rhizobacteria for plant growth under salinity stress: mechanisms and applications. Front Microbiol. 13:938377. DOI: 10.3389/fmicb.2022.938377.

Kassambara A, Mundt F. 2020. factoextra: multivariate data analysis package. Disponível em: https://CRAN.R-project.org/package=factoextra. Acesso em: 10 jan. 2025.

Kaur R, Arora N, Bansal R, Kaur H, Bhatti R, Kaur S. 2022. Phytate-mineralizing bacteria with plant growth traits. Front Microbiol. 13:930020. DOI: 10.3389/fmicb.2022.930020.

Khan A, Tan DKY, Munsif F, Afridi MZ, Shah F, Wei F, Fahad S, Zhou R. 2017. Nitrogen nutrition in cotton and control strategies for greenhouse gas emissions: a review. Environ Sci Pollut Res. 24(30):23471–23487. DOI: 10.1007/s11356-017-8920-x.

Khan MS, Gao J, Chen X, Zhang M, Yang F, Du Y, Feng Y, Xie J. 2020. *Bacillus velezensis* with antifungal activity. J Microbiol Biotechnol. 30(5):668–680. DOI: 10.4014/jmb.1910.10021.

King ED, Ward MK, Raney DE. 1954. Media for pyocyanin and fluorescin. J Lab Clin Med. 44(2):301–307.

Kumar GK, Ram MR. 2014. Phosphate solubilizing rhizobia isolated from Vigna trilobata. Am J Microbiol Res. 2(3):105–109. DOI: 10.12691/ajmr-2-3-4.

Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK. 2022. Auxin-producing *Bacillus* spp. modulate root growth and nutrient uptake in wheat under nutrient-limited conditions. Microbial Biotechnology. 15:1025–1038. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13967

Lê S, Josse J, Husson F. 2008. FactoMineR: multivariate analysis package. J Stat Softw. 25(1):1–18. DOI: 10.18637/jss.v025.i01.

Legendre P, Legendre L. 2012. Numerical ecology. 3 ed. Amsterdam: Elsevier. 1006 p.

Lin H, Chen Y, Li J, Hu X, Duan Y, Zhang Y, Liu J. 2022. Endophytic bacteria and fungi in tea plants. Front Microbiol. DOI: 10.3389/fmicb.2022.872034.

Liu F, Xing S, Ma H, Du Z, Ma B. 2013. Cytokinin-producing rhizobacteria confer drought resistance. Appl Microbiol Biotechnol. 97:9155–9164. DOI: 10.1007/s00253-013-4795-3.

Liu F, Chen Q, Wang Y, Zhang J, Wu Z. 2019. Endophytic bacteria from maize roots. PeerJ. 7:e7445. DOI: 10.7717/peerj.7445.

Lutz E, Maciá-Vicente JG, Lehmann J, Rillig MC. 2023. Mycorrhizal fungi increase maize yield. Nat Microbiol. 8(5):800–810. DOI: 10.1038/s41564-023-01520-w.

Mapa – Ministério da Agricultura e Pecuária. 2023. Inovações tecnológicas para o controle de pragas na agricultura. Brasília. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura. Acesso em: 02 out. 2025.

Martínez-Hidalgo P, Flores-Félix JD, Sánchez-Juanes F, Rivas-Díaz M, Mateos PF, Regina IS, Peix A, Martínez-Molina E, Igual JM, Velázquez E. 2021. Endophytic bacteria from canola roots and their potential as biofertilizers. Agronomy. 11(9):1796. DOI: 10.3390/agronomy11091796.

McInroy JA, Kloepper JW. 1995. Indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant Soil. 173:337–342. DOI: 10.1007/BF00011472.

Mei C, Flinn BS. 2010. Beneficial microbial endophytes for biomass and stress tolerance. Recent Pat Biotechnol. 4(1):81–95. DOI: 10.2174/187220810791820388.

Mesele HT, Abera B, Gashaw T, Yigzaw E. 2025. Symbiotic effectiveness of native rhizobia in *Vicia faba*. Arch Microbiol. 207(1):1–12. DOI: 10.1007/s00203-024-03809-9.

Miotto-Vilanova L, Lavire C, O'Connor-Dunlap MJ, Moënne-Loccoz Y, Prigent-Combaret C. 2016. *Burkholderia phytofirmans* confers grapevine resistance. Front Plant Sci. 7:1236. DOI: 10.3389/fpls.2016.01236.

Monnerat R, Santos RC, Barros PC, Batista AC, Berry C. 2003. Isolamento de *Bacillus thuringiensis* endofítico de algodão. Brasília: Embrapa. 4 p.

Monnerat R, Montalvão SCL, Martins ES, Queiroz PRM, Silva EYYD, Garcia ARM, Castro MT, Rocha GT, Ferreira ADCL, Gomes ACMM. 2020. Produção e controle de qualidade de produtos biológicos à base de *Bacillus*. Brasília: Embrapa. 47 p.

Moura JB, Souza RF, Ventura MVA, Furquim LC, Vieira-Junior WG, Braga APM, Lima IR, Caixeta JGA, Milk DC, Silva JC, Rocha ECV, Lopes HPB. 2019. Nitrogen-fixing bacteria in sugarcane establishment. Asian J Microbiol Biotechnol Environ Sci. 21(1):22–26.

Mrojinski F, Andrade ACG, Almeida MR, Gonçalves JF, Pereira FS. 2020. Evolução da cotonicultura no Brasil. Rev Econ Sociol Rural. 58(4):1–19. DOI: 10.1590/1806-9479.2020.235122.

Oliveira-Costa LE, Queiroz MV, Borges AC, Moraes CA, Araújo EF. 2012. Isolation and characterization of endophytic bacteria from common bean. Braz J Microbiol. 43(4):1562–1575. DOI: 10.1590/S1517-83822012000400041.

Pandey P, Kumar S, Patel MK, Maurya PK, Kumar M, Singh RP. 2021. Functional diversity of *Bacillus* species in plant growth promotion and stress management: current status and prospects. Journal of Applied Microbiology. 130:1119–1133. https://doi.org/10.1111/jam.14866

Parra JRP. 2019. Controle biológico na agricultura brasileira. Entomol Commun. 1:ec01002. DOI: 10.37486/2675-1305.ec01002.

Pérez-Pérez R, Silva-Trujillo M, Cely M, Uribe-Vélez D. 2021. Potassium solubilizing bacteria from corn rhizoplane. Agron Colomb. 39(3):415–427. DOI: 10.15446/agron.colomb.v39n3.98522.

Pindi PK, Sultana T, Vootla PK. 2014. Plant growth regulation of Bt-cotton through Bacillus spp. 3 Biotech. 4(3):305–315. DOI: 10.1007/s13205-013-0154-0.

Piromyou P, Buranabanyat B, Tittabutr P, Boonkerd N, Teaumroong N. 2015. Endophytic *Bradyrhizobium* in rice. Appl Environ Microbiol. 81:7063–7077. DOI: 10.1128/AEM.04253-14.

Qin Y, Han Y, Liu Y, Li Z, Zhang X, Wang Y. 2021. *Bacillus circulans* GN03 promotes cotton seedling growth and modulates phytohormone levels. Appl Soil Ecol. 167:104065. DOI: 10.1016/j.apsoil.2021.104065.

Ramos RL, Silveira JAG, Maia CDG. 2022. Novas cultivares e desafios para a cotonicultura. Pesq Agropec Trop. 52:e71855. DOI: 10.1590/1983-40632022v5271855.

Ren P, Zhou B, Bi Y, Chen X, Yao S. 2025. *Bacillus subtilis* in drought tolerance and cotton yield. Agronomy. 15(8):1932. DOI: 10.3390/agronomy15081932.

Ribeiro BBA, Tegli C, Pinto ATS, Costa NFS, Barbosa MH, Fernandes MF, Lima LM, Santos RS, Silva NAR, Oliveira RP, Fernandes BL, Monteiro FA. 2024. Reinoculation of *Rhizobium tropici* co-inoculated with *Azospirillum brasilense* improves nodulation and yield of common bean. Agronomy. 14(7):1368. DOI: 10.3390/agronomy14071368.

Rodrigues AA, Oliveira BFR, Soares RS, Reis LGV, Vieira JDG. 2017. Potencial biotecnológico de bactérias endofíticas em algodão. Encicl Biosfera. 14(26):1077–1090.

Rodríguez M, Torres M, Blanco L, Béjar V, Sampedro I, Llamas I. 2020. Plant growth-promoting activity and quorum quenching by *Pseudomonas segetis*. Sci Rep. 10:1–12. DOI: 10.1038/s41598-020-64197-5.

Romeiro RS. 2001. Métodos em bacteriologia de plantas. Viçosa: UFV. 279 p.

Romero-Perdomo F, Abril J, Camelo M, Moreno-Galván A, Pastrana I, Rojas-Tapias D, Bonilla R. 2017. Azotobacter chroococcum as a potentially useful bacterial biofertilizer for cotton. Argentinean Journal of Microbiology. 49(4):340–350. https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.006

Romero-Perdomo F, Falcão D, López M, Romero-Tabarez M, Montealegre A, Bonilla R. 2021. Phosphorus nutrition and growth of cotton enhanced by *Rhizobium*. Front Sustain Food Syst. 5:618425. DOI: 10.3389/fsufs.2020.618425.

Roncato-Maccari LDB, Ramos HJO, Pedrosa FO, Alquini Y, Chubatsu LS, Yates MG, Rigo LU, Steffens MBR, Souza EM. 2003. Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses nif genes. FEMS Microbiol Ecol. 45(1):39–47. DOI: 10.1016/S0168-6496(03)00108-9.

Rosolem CA. 2001. Manejo da adubação nitrogenada no algodoeiro. Rev Bras Ciênc Solo. 25(4):955–964. DOI: 10.1590/S0100-06832001000400023.

Rossi RM, Nogueira MT, Silva LCM, Moreira CH, Santos FAS. 2020. Histórico e perspectivas do algodão no Brasil. Rev Bras Eng Agríc Ambient. 24(9):648–655. DOI: 10.1590/1807-1929/agriamb24v9n648.

RStudio Team. 2022. RStudio: Integrated Development for R. Disponível em: https://www.rstudio.com/. Acesso em: 10 jan. 2025.

Saboya RCC, Tavares AJF, Silva AAR, Saboya LMF, Nascimento R, Costa MMMN. 2023. Crescimento de algodoeiro sob estresse salino com *Azospirillum*. Irriga. 28(1):124–133. DOI: 10.15809/irriga.2023v28n1p124.

Saheewala H, Patel D, Bhatt N, Chaudhary S, Bhatt A. 2023. Potassium-solubilizing bacteria and maize growth. Agronomy. 13(7):1919. DOI: 10.3390/agronomy13071919.

Santi C, Bogusz D, Franche C. 2013. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. Ann Bot. 111:743–767. DOI: 10.1093/aob/mct048.

Santos HG, Jacomine PKT, Anjos LHC, Oliveira VA, Lumbreras JF, Coelho MR, Almeida JA, Araújo Filho JC, Oliveira JB, Cunha TJF. 2018. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 5 ed. Brasília: Embrapa. 356 p.

Santos FL, Silva FB, Sá ELS, Vian AL, Muniz W, Santos RN. 2019. Inoculation of growth-promoting bacteria in rice. Rev Bras Ciênc Agrár. 14(3):1–5. DOI: 10.5039/agraria.v14i3a6541.

Santos FL, Mendes CR, Barros JR, Oliveira RPS, Costa BAA. 2020. Demanda nutricional do algodoeiro. Rev Agric Trop. 14(2):150–167. DOI: 10.1590/RAT.2020.142150.

Santos MS, Nogueira MA, Hungria M. 2021. Impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. Rev Bras Ciênc Solo. 45:e0200128. DOI: 10.36783/18069657rbcs20200128.

Sarmiento LH, Da Silva FB, Treichel B, Beneduzi A, De Sá ELS. 2024. Selection of multi-purpose native rhizobia from red clover. Rhizosphere. 29:100847. https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2023.100847

Scott AJ, Knott M. 1974. Cluster analysis method for grouping means. Biometrics. 30:507–512.

Sessitsch A, Hardoim P, Doring J, Weilharter A, Krause A, Woyke T, Mitter B, Hauberg-Lotte L, Friedrich F, Rahalkar MH, Hurek T, Sarkar A, Bodrossy L, Overbeek L, Brar D, Elsas JD, Reinhold-Hurek B. 2012. Endophyte community in rice roots. Mol Plant Microbe Interact. 25(1):1–29. DOI: 10.1094/MPMI-08-11-0204.

Shockley KR, Wang T, McGuire AM, Lee KH. 2014. Gene expression analysis for microbial systems. Appl Environ Microbiol. 80(6):1762–1772.

Silva JS, Ramalho FS. 2013. Impacto do bicudo-do-algodoeiro na produção brasileira. Rev Bras Entomol. 57(3):381–389. DOI: 10.1590/S0085-56262013005000003.

Singh RR, Wesemael W. 2022. Endophytic *Paenibacillus polymyxa* inhibits *Meloidogyne incognita* and promotes tomato growth. Front Plant Sci. 13:961085. DOI: 10.3389/fpls.2022.961085.

Sneath PHA, Sokal RR. 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: W. H. Freeman. 573 p.

Soares EB, Silva LF, Santos AL. 2016. Desempenho produtivo do feijão em resposta à fixação biológica de nitrogênio. Rev Bras Ciênc Solo. 40(3):900–910. DOI: 10.1590/0100-0683rbcs20160077.

Teheran-Sierra LG, Funnicelli MIG, Carvalho LAL, Ferro MIT, Soares MA, Pinheiro DG. 2021. Bacterial communities associated with sugarcane exhibit plant growth-promoting traits. Microbiol Res. 247:126735. DOI: 10.1016/j.micres.2021.126735.

Torsvik V, Ovreas L. 2002. Microbial diversity and function in soil. Curr Opin Microbiol. 5(3):240–245. DOI: 10.1016/S1369-5274(02)00324-7.

Trovero MF, Dourado MN, Müller GC, Kupper KC, Azevedo JL, Andreote FD. 2018. *Herbaspirillum seropedicae* transcriptomic analysis. Front Microbiol. 9:1679. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01679.

Turatto MF, Dourado FS, Zilli JE, Botelho GR. 2018. Control of *Meloidogyne* and *Ditylenchus* using *Pseudomonas* and *Bacillus.* Braz J Microbiol. 49(1):54–58. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.01.004.

USDA – United States Department of Agriculture. 2025. Cotton and Products Annual: Brazil 2025/26. Brasília: USDA. Disponível em: https://apps.fas.usda.gov. Acesso em: 03 set. 2025.

Verma SC, Ladha JK, Tripathi AK. 2001. Plant growth-promoting ability of endophytic diazotrophs in rice. J Biotechnol. 91(2–3):127–141. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00353-3.

Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. 1994. Genomic fingerprinting using repetitive sequence-based PCR. Methods Mol Cell Biol. 5(1):25–40.

Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook 15. Oxford: Blackwell Scientific. 164 p.

Vinuesa P, Rademaker JLW, de Bruijn FJ, Werner D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating woody legumes by PCR-RFLP and sequencing. Appl Environ Microbiol. 64(6):2096–2104. DOI: 10.1128/AEM.64.6.2096-2104.1998.

Wang Z, Xu X, Zhang Q, Li Y, Zhou W, Chen G, Fang Y, Yang S, Liu W. 2024. *Bacillus velezensis* improves cotton growth and drought tolerance. Appl Environ Microbiol. 90(8):e01538-24. DOI: 10.1128/aem.01538-24.

Watanabe AYM, Silva MT, Silva Junior OL, Paccola EAS, Schmidt Filho E, Bergamasco R. 2023. Crescimento de mudas de cana-de-açúcar com *Azospirillum brasilense*. Contrib Cienc Sociais. 16(7):5696–5708.

Welch BL. 1951. Comparison of several mean values: an alternative approach. Biometrika. 38(3–4):330–336. DOI: 10.1093/biomet/38.3-4.330.

Wratten SD, Shields MW, González-Chang M. 2019. Regenerative agriculture in Chile. Agro Sur. 47(2):1–6. DOI: 10.4206/agrosur.2019.v47n2-01.

Wu CD, Fan YB, Chen X, Cao JW, Ye JY, Feng ML, Liu XX, Sun WJ, Liu RN, Wang AY. 2024. Endophytic bacterial diversity in cotton seeds and suppression of *Verticillium* wilt. BMC Plant Biol. 24:263. DOI: 10.1186/s12870-024-04910-2.

Xia M, Zhang Z, Li J, Li J, Liu H. 2018. Potassium-releasing bacteria in sugar beet rhizosphere. Eur J Soil Sci. DOI: 10.1111/ejss.12659.

Yadav A, Verma P, Singh DP, Yadav K, Dhiman AK. 2021. Genes for phosphorus solubilization and drought tolerance in *Mesorhizobium ciceri.* Arch Microbiol. 203:1167–1174. DOI: 10.1007/s00203-020-02109-1.

Yahya M, Yasin M, Muneer S, Farooq MA, Alwahibi MS, Alkahtani J, Alghamdi HA, Li Y, Hu Y. 2021. Root exudation and architecture in wheat mediated by bacteria. Front Microbiol. 12:744094. DOI: 10.3389/fmicb.2021.744094.

Yao AV, Bochow H, Karimov S, Boturov U, Sanginboy S, Sharipov AK. 2006. *Bacillus subtilis* as biofertilizer in cotton. Arch Phytopathol Plant Prot. 39(4):323–328. DOI: 10.1080/03235400600655347.

Zar JH. 2010. Biostatistical analysis. 5 ed. Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall. 944 p.

Zeng Q, Man X, Dai Y, Liu H. 2022. *Pseudomonas* spp. inhibit cotton *Verticillium*

wilt. Front Microbiol. 13:906732. DOI: 10.3389/fmicb.2022.906732.

Zhang C, Chen H, Dai Y, Chen Y, Tian Y, Huo Z. 2023. Phosphorus-solubilizing bacteria from saline soil and Pb remediation potential. Front Bioeng Biotechnol. 11:1134310. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1134310.

Zhao H, Sun N, Huang L, Qian R, Lin X, Sun C, Zhu Y. 2023. *Azospirillum brasilense* and cell wall modification. iScience. 26:107144. DOI: 10.1016/j.isci.2023.107144.

Zhao Y, Liang H, Zhang J, Chen Y, Dhital YP, Zhao T, Wang Z. 2024. Potassium-solubilizing rhizobacteria promoting cotton growth. Plants. 13(14):1945. DOI: 10.3390/plants13141945.

Zuluaga MYA, Milani KM, Gonçalves LSA, Oliveira ALM. 2020. Diversity and plant growth-promoting functions of diazotrophic bacteria in *Solanum* spp. Arch Microbiol. 202(1):1–10. DOI: 10.1007/s00709-020-01468-2.

10. APÊNDICES

APÊNDICE 1: Agrupamento de médias obtidas pelo teste de comparações múltiplas (Games-Howell, p < 0,05) para as variáveis de promoção de crescimento vegetal *in vitro* (CA, CR, MS e MSR) em plântulas de algodoeiro.
* NA = Não se aplica, n/s = Não significativo, * = Superior a N50, e ** = Superior a N50 e N100

Estirpes	Comprimento Aérea (CA)		Comprimento Raiz (CR)		Massa Seca Aérea (MSA)		Massa Seca Raiz (MSR)	
	Média (cm)	p<0,05	Média (cm)	p<0,05	Média (mg)	p<0,05	Média (mg)	p<0,05
N100	13,6	NA	7,4	NA	110,57	NA	13,20	NA
N50	11,4	NA	6,6	NA	88,47	NA	9,03	NA
AZOS	15,4	NA	7,2	NA	110,37	NA	11,73	NA
AL001	9,6	NA	7,5	n/s	69,00	NA	5,03	NA
AL004	9,6	NA	6,9	n/s	76,03	NA	8,57	NA
AL005	10,6	NA	6,7	n/s	89,67	n/s	7,63	NA
AL006	11,6	n/s	6,6	NA	96,80	n/s	9,83	n/s
AL007	11,7	n/s	6,7	n/s	84,40	NA	11,57	n/s
AL008	14,1	n/s	5,8	NA	90,07	n/s	9,37	n/s
AL009	8,5	NA	5,6	NA	89,23	n/s	5,87	NA
AL010	13,6	n/s	8,3	n/s	95,20	n/s	9,57	n/s
AL011	10,0	NA	8,6	n/s	82,27	NA	11,30	n/s
AL012	10,9	NA	4,9	NA	65,20	NA	4,90	NA
AL013	12,1	n/s	6,3	NA	74,27	NA	6,80	NA
AL014	12,6	n/s	6,5	NA	91,57	n/s	11,50	n/s
AL015	6,8	NA	6,7	n/s	59,80	NA	7,33	NA
AL016	13,3	n/s	7,6	n/s	90,77	n/s	8,63	NA

AL019	8,9	NA	3,5	NA	53,67	NA	7,33	NA
AL020	12,7	n/s	5,7	NA	97,60	n/s	8,27	NA
AL021	11,3	NA	7,9	n/s	92,20	n/s	9,20	n/s
AL022	10,6	NA	6,2	NA	76,27	NA	7,87	NA
AL023	7,3	NA	6,2	NA	79,47	NA	10,37	n/s
AL024	7,6	NA	6,7	n/s	75,97	NA	8,43	NA
AL028	10,1	NA	6,2	NA	88,20	NA	8,33	NA
AL031	11,0	NA	4,7	NA	72,10	NA	6,63	NA
AL033	10,9	NA	6,8	n/s	74,00	NA	9,67	n/s
AL035	12,7	n/s	6,3	NA	71,80	NA	7,43	NA
AL036	10,4	NA	5,8	NA	77,13	NA	7,07	NA
AL037	13,1	n/s	5,9	NA	102,10	n/s	10,03	n/s
AL038	12,1	n/s	7,4	n/s	94,00	n/s	9,83	n/s
AL039	10,3	NA	7,4	n/s	112,70	n/s	14,63	*
AL042	9,6	NA	7,1	n/s	72,03	NA	6,53	NA
AL043	8,7	NA	5,8	NA	87,43	NA	5,77	NA
AL044	13,4	n/s	7,1	n/s	80,77	NA	9,87	NA
AL045	9,5	NA	6,9	n/s	84,77	NA	8,97	NA
AL046	9,5	NA	6,6	NA	62,27	NA	9,77	n/s
AL048	10,3	NA	5,9	NA	94,53	NA	9,90	NA
AL049	11,5	n/s	5,9	NA	79,43	NA	7,13	NA
AL050	11,2	NA	7,5	n/s	84,27	NA	10,47	n/s
AL052	11,8	n/s	7,1	n/s	94,67	NA	10,70	n/s
AL054	9,5	NA	5,5	NA	71,90	NA	6,43	NA
AL056	12,2	NA	5,6	NA	79,33	NA	8,73	NA
AL058	11,7	n/s	6,6	NA	73,70	NA	7,43	NA
AL064	13,9	n/s	7,6	n/s	104,53	n/s	10,30	n/s
AL065	10,9	NA	6,1	NA	78,40	NA	8,67	NA
AL066	14,0	n/s	6,7	n/s	81,40	NA	7,57	NA
AL069	15,3	n/s	8,4	n/s	100,07	n/s	9,10	n/s
AL071	10,8	NA	7,2	n/s	79,00	NA	10,50	n/s
AL072	11,4	n/s	6,5	NA	79,10	NA	9,90	NA
AL073	11,6	n/s	6,1	NA	70,17	NA	7,47	NA
AL074	11,4	n/s	5,3	NA	72,23	NA	8,30	NA
AL075	12,1	n/s	5,8	NA	54,90	NA	6,47	NA
AL076	16,5	n/s	6,3	NA	113,37	n/s	10,53	n/s
AL078	9,2	NA	5,3	NA	71,40	NA	7,30	NA
AL079	14,2	n/s	7,7	n/s	69,37	NA	8,69	NA
AL080	11,6	n/s	6,5	NA	80,72	NA	7,32	NA
AL081	15,4	n/s	6,6	NA	124,70	n/s	15,10	*
AL082	16,8	n/s	7,2	n/s	147,53	n/s	9,93	NA
AL083	10,2	NA	6,6	NA	76,45	NA	8,90	NA
AL084	9,8	NA	5,6	NA	68,63	NA	9,13	n/s
AL085	10,7	NA	8,7	n/s	87,93	NA	8,77	NA
AL086	12,2	NA	7,9	n/s	139,13	n/s	15,67	*

AL087	12,4	n/s	6,1	NA	89,90	n/s	8,80	NA
AL089	10,9	NA	6,3	NA	80,54	NA	8,30	NA
AL090	12,1	NA	5,5	NA	74,50	NA	7,77	NA
AL091	16,4	n/s	8,4	n/s	111,67	n/s	10,27	n/s
AL092	11,5	n/s	8,4	n/s	92,92	n/s	8,27	NA
AL093	9,8	NA	4,7	NA	76,63	NA	8,07	NA
AL094	10,1	NA	5,4	NA	75,67	NA	8,30	NA
AL095	16,2	n/s	6,7	n/s	128,40	n/s	8,50	NA
AL096	10,3	NA	5,7	NA	93,97	n/s	8,37	NA
AL097	10,2	NA	7,6	n/s	87,70	NA	9,97	n/s
AL098	13,0	n/s	5,9	NA	141,13	n/s	18,30	*
AL099	11,6	n/s	7,6	n/s	56,67	NA	5,07	NA
AL100	10,3	NA	5,3	NA	61,13	NA	7,27	NA
AL101	5,3	NA	5,2	NA	50,90	NA	7,43	NA
AL102	8,6	NA	5,3	NA	64,27	NA	6,73	NA
AL103	10,4	NA	6,0	NA	66,27	NA	6,93	NA
AL106	11,5	n/s	6,7	n/s	73,57	NA	9,93	NA
AL107	6,9	NA	4,9	NA	55,80	NA	9,50	n/s
AL108	11,8	NA	6,7	n/s	68,13	NA	6,67	NA
AL109	11,8	n/s	6,3	NA	78,53	NA	7,67	NA
AL110	9,5	NA	6,3	NA	66,63	NA	5,93	NA
AL111	11,4	n/s	4,9	NA	72,83	NA	7,83	NA
AL113	14,4	n/s	7,0	n/s	131,30	n/s	12,17	n/s
AL117	11,2	NA	6,4	NA	80,17	NA	10,00	n/s
AL118	9,7	NA	6,5	NA	55,90	NA	7,20	NA
AL120	11,4	n/s	6,9	n/s	69,20	NA	7,10	NA
AL121	13,5	n/s	7,4	n/s	87,20	NA	8,13	NA
AL122	17,6							
AL123	13,6	n/s	7,0	n/s	139,87	n/s	16,20	*
AL124	13,1	n/s	6,8	NA	107,97	n/s	9,03	NA
AL125	15,2	n/s	7,5	n/s	105,33	n/s	9,50	n/s
AL126	11,8	n/s	5,5	NA	101,20	n/s	12,53	n/s
AL127	16,4	n/s	7,0	n/s	98,63	n/s	10,00	n/s
AL128	14,3	n/s	10,6	n/s	111,63	n/s	9,63	n/s
		n/s	4,6	NA	82,70	NA	8,57	NA
AL129	10,6	NA	7,4	n/s	173,20	**	16,87	*
AL130	14,8	n/s	7,3	n/s	101,87	n/s	12,47	n/s
AL131	13,3	n/s	6,8	n/s	147,83	n/s	12,97	n/s
AL132	14,2	n/s	6,7	n/s	108,33	n/s	9,00	NA
AL133	10,8	NA	6,8	n/s	149,50	*	10,17	n/s
AL134	12,0	n/s	7,4	n/s	113,23	n/s	12,57	n/s
AL135	16,3	n/s	5,0	NA	94,50	NA	10,33	n/s
AL136	11,3	NA	7,2	n/s	92,17	n/s	11,23	n/s
AL137	15,4	n/s	6,0	NA	113,97	n/s	13,73	n/s
AL138	10,4	NA	6,9	n/s	95,70	n/s	11,43	n/s
AL139	12,5	n/s	7,7	n/s	97,40	n/s	9,47	n/s

AL141	8,8	NA	5,9	NA	154,40	*	13,47	n/s
AL142	10,4	NA	7,3	n/s	89,10	n/s	7,70	NA
AL143	15,0	n/s	6,7	n/s	99,70	n/s	7,30	NA
AL144	13,0	n/s	6,9	n/s	129,13	n/s	14,83	*
AL145	13,4	n/s	5,8	NA	102,00	n/s	10,77	n/s
AL146	16,4	n/s	5,4	NA	83,80	NA	11,20	n/s
AL148	9,9	NA	7,0	n/s	105,77	n/s	12,00	n/s
AL150	12,4	n/s	5,9	NA	90,63	n/s	9,53	n/s
AL151	9,8	NA	5,9	NA	89,63	NA	7,53	NA
AL152	9,1	NA	6,2	NA	64,03	NA	7,20	NA
AL153	14,1	n/s	7,1	n/s	74,80	NA	8,43	NA
AL154	10,9	NA	6,0	NA	85,43	NA	10,50	n/s
AL155	9,7	NA	6,4	NA	74,13	NA	8,93	NA
AL156	11,4	n/s	5,9	NA	74,80	NA	9,60	n/s
AL158	10,4	NA	7,3	n/s	68,17	NA	8,60	NA
AL159	9,3	NA	6,9	n/s	70,10	NA	9,43	n/s
AL160	11,7	n/s	6,3	NA	77,43	NA	8,80	NA
AL161	11,6	n/s	6,4	NA	75,37	NA	10,57	n/s
AL164	5,8	NA	5,3	NA	66,07	NA	8,47	NA
AL169	11,1	NA	6,1	NA	143,63	n/s	6,30	NA
AL170	10,6	NA	5,7	NA	79,50	NA	6,37	NA
AL171	5,2	NA	5,8	NA	89,70	n/s	8,97	NA
AL173	10,6	NA	8,4	n/s	83,87	NA	7,63	NA
AL174	10,0	NA	7,5	n/s	160,03	*	12,90	n/s
AL176	11,3	NA	6,6	NA	78,27	NA	9,00	NA
AL177	15,3	n/s	6,5	NA	95,13	NA	9,67	n/s
AL178	11,1	NA	6,8	n/s	76,17	NA	10,30	n/s
AL180	9,8	NA	5,8	NA	79,93	NA	8,27	NA
AL184	7,9	NA	5,8	NA	70,60	NA	7,77	NA
AL185	8,2	NA	6,8	n/s	65,37	NA	5,47	NA
AL186	11,0	NA	6,1	NA	104,37	n/s	7,27	NA
AL188	13,4	n/s	6,8	NA	104,93	n/s	11,30	n/s
AL189	7,8	NA	4,7	NA	68,07	NA	6,43	NA
AL190	11,0	NA	6,2	NA	78,50	NA	7,33	NA
AL191	11,3	NA	6,5	NA	90,27	n/s	9,37	n/s
AL192	6,2	NA	4,3	NA	57,69	NA	5,30	NA
AL195	18,0	n/s	5,0	NA	153,47	*	13,93	n/s
AL196	13,5	n/s	6,2	NA	144,80	n/s	15,33	*
AL198	8,2	NA	6,3	NA	68,47	NA	8,77	NA
AL201	9,8	NA	6,0	NA	64,97	NA	6,53	NA
AL203	8,7	NA	5,8	NA	76,43	NA	11,83	n/s
AL204	9,8	NA	5,7	NA	63,30	NA	5,53	NA
AL205	15,2	n/s	6,5	NA	120,83	n/s	11,43	n/s
AL206	14,8	n/s	6,5	NA	111,51	n/s	8,80	NA
AL207	12,4	NA	6,6	NA	73,93	NA	7,37	NA

AL208	16,4	n/s	6,5	NA	121,23	n/s	12,03	n/s
AL209	13,8	n/s	7,1	n/s	101,97	n/s	9,37	n/s
AL210	13,7	n/s	6,0	NA	81,10	NA	9,50	n/s
AL211	11,2	NA	7,4	n/s	98,23	n/s	8,87	NA
AL215	11,0	NA	6,5	NA	64,80	NA	7,30	NA
AL216	9,6	NA	7,0	n/s	70,74	NA	8,43	NA
AL217	7,4	NA	5,5	NA	55,33	NA	6,10	NA
AL226	14,1	n/s	6,4	NA	80,07	NA	7,43	NA
AL232	17,1	n/s	7,9	n/s	120,60	n/s	10,13	n/s
AL244	8,2	NA	6,2	NA	71,67	NA	10,90	n/s
AL245	10,0	NA	5,9	NA	82,13	NA	12,90	n/s
AL246	11,5	n/s	4,6	NA	95,97	n/s	9,47	n/s
AL248	11,1	NA	7,0	n/s	83,03	NA	11,03	n/s
AL250	8,6	NA	5,5	NA	84,20	NA	7,87	NA
AL252	12,8	n/s	5,7	NA	96,03	n/s	10,03	n/s
AL255	8,9	NA	6,2	NA	83,73	NA	9,47	n/s
AL257	10,8	NA	5,3	NA	83,27	NA	6,40	NA
AL258	9,5	NA	7,4	n/s	71,47	NA	9,57	n/s
AL258	9,5	NA	7,4	NA	71,47	NA	8,57	NA
AL263	10,3	NA	6,0	NA	65,63	NA	8,03	NA
AL266	8,0	NA	6,7	n/s	68,20	NA	8,27	NA
AL268	11,3	NA	5,4	NA	147,83	n/s	10,63	n/s
AL269	14,4	n/s	7,5	n/s	122,30	n/s	11,67	n/s
AL270	17,3	n/s	6,4	NA	123,63	n/s	17,07	*
AL271	17,1	n/s	5,8	NA	125,17	n/s	9,33	n/s
AL272	17,4	n/s	6,1	NA	146,20	n/s	13,93	n/s
AL274	16,6	n/s	7,0	n/s	148,17	*	12,27	n/s
AL275	10,8	NA	6,8	NA	94,93	NA	16,10	*
AL276	10,4	NA	7,2	n/s	124,80	n/s	15,37	*
AL278	12,1	n/s	9,4	n/s	99,37	n/s	10,13	n/s
AL279	15,3	n/s	6,2	NA	120,97	n/s	10,40	n/s
AL283	15,8	n/s	6,1	NA	123,07	n/s	9,83	n/s
AL284	16,6	n/s	7,1	n/s	140,20	n/s	11,53	n/s
AL285	9,3	NA	6,1	NA	62,83	NA	6,77	NA
AL287	9,5	NA	8,5	n/s	146,67	n/s	16,37	*
AL288	17,1	n/s	6,8	NA	137,80	n/s	12,03	n/s
AL292	12,4	NA	6,7	n/s	117,03	n/s	12,10	n/s
AL294	14,9	n/s	6,9	n/s	128,87	n/s	13,70	n/s
AL295	12,7	n/s	7,4	n/s	143,73	n/s	13,20	n/s
AL296	13,0	n/s	8,5	n/s	141,27	n/s	17,83	*
AL297	18,5	n/s	7,5	n/s	136,73	n/s	14,23	n/s
AL298	11,5	n/s	8,0	n/s	140,80	n/s	11,93	n/s
AL300	14,8	n/s	7,5	n/s	118,23	n/s	13,13	n/s
AL301	18,2	n/s	6,3	NA	129,63	n/s	10,50	n/s
AL303	11,4	n/s	6,9	n/s	76,63	NA	6,07	NA

AL304	9,7	NA	5,8	NA	64,87	NA	8,70	NA
AL307	12,5	n/s	6,2	NA	78,70	NA	7,27	NA
AL308	10,9	NA	6,5	NA	83,47	NA	11,20	n/s
AL310	12,7	n/s	6,3	NA	92,97	n/s	10,57	n/s
AL311	11,5	n/s	8,2	n/s	89,77	n/s	9,17	n/s
AL312	5,2	NA	5,6	NA	61,17	NA	8,47	NA
AL313	14,9	n/s	6,6	NA	83,40	NA	7,30	NA
AL314	14,3	n/s	7,0	n/s	99,20	n/s	12,40	n/s
AL315	15,6	n/s	6,8	NA	119,77	n/s	10,47	n/s
AL316	11,5	n/s	7,3	n/s	86,90	NA	10,43	n/s
AL317	15,1	n/s	7,1	n/s	108,00	n/s	9,17	n/s
AL318	10,6	NA	7,4	n/s	80,73	NA	12,73	n/s
AL319	9,7	NA	6,3	NA	55,53	NA	6,17	NA
AL320	10,9	NA	6,0	NA	87,20	NA	5,73	NA
AL322	13,6	n/s	4,6	NA	86,90	NA	6,37	NA
AL323	14,2	n/s	6,3	NA	108,70	n/s	12,40	n/s
AL324	13,7	n/s	7,3	n/s	101,17	n/s	8,10	NA
AL325	14,9	n/s	8,2	n/s	115,17	n/s	8,47	NA
AL326	7,9	NA	5,5	NA	44,17	NA	4,57	NA
AL327	15,7	n/s	6,3	NA	81,90	NA	6,67	NA
AL328	8,1	NA	7,6	n/s	163,37	*	14,00	n/s
AL329	16,9	n/s	6,0	NA	101,97	n/s	6,13	NA
AL330	8,0	NA	5,8	NA	77,30	NA	8,13	NA
AL331	9,8	NA	6,9	n/s	64,83	NA	5,30	NA
AL332	10,2	NA	7,1	n/s	79,83	NA	6,53	NA
AL334	14,5	n/s	4,7	NA	92,83	n/s	8,80	NA
AL335	10,0	NA	5,4	NA	147,53	n/s	14,93	*
AL336	9,0	NA	7,0	n/s	66,70	NA	7,00	NA