



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
DOUTORADO EM AGRONOMIA**

ANGELO CLEITON DA COSTA PEREIRA

Bactérias endofíticas *Pseudomonas* de *Piper tuberculatum* promovem o crescimento e desenvolvimento em plantas de *Piper nigrum*

BELÉM

2019



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
DOUTORADO EM AGRONOMIA**



ANGELO CLEITON DA COSTA PEREIRA

Bactérias endofíticas *Pseudomonas* de *Piper tuberculatum* promovem o crescimento e desenvolvimento em plantas de *Piper nigrum*

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia: área de concentração manejo e conservação de recursos ambientais, para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Cláudia Regina Batista de Souza.

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Gisele Barata da Silva

BELÉM

2019

ANGELO CLEITON DA COSTA PEREIRA

**BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS *Pseudomonas* DE *Piper tuberculatum* PROMOVEM O
CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO EM PLANTAS DE *Piper nigrum***

Tese apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agronomia, para obtenção do título de **Doutor**.

Aprovado em _____ de _____ de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Cláudia Regina Batista de Souza – Orientador
Universidade Federal do Pará-UFPA-Belém-PA

Dr. Marcelo Murad Magalhaes
Embrapa Amazônia Oriental-Belém-PA

Dr. Roberto Lisboa Cunha
Embrapa Amazônia Oriental -Belém-PA

Prof.^a Dra. Aline Medeiros Lima
Universidade Federal Rural da Amazônia-Tomé Açu-PA

Dr. Walter Vellasco Duarte Silvestre– 1º Examinador
Universidade Federal Rural da Amazônia -UFRA- Belém-PA

*Aos alicerces da minha vida, meus pais,
Raimundo Luscas Tavares Pereira e Ana da Costa Pereira, a minha
esposa Gleycilene Barros Pereira e ao meu filho Antônio Barros da
Costa Pereira.*

*E aos meus inspiradores de como viver bem a vida, meus avós Antonio
Pereira (In memoriam) e Ana da Teixeira da Costa.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) e a Universidade Federal do Pará (UFPA) pela oportunidade de realização do estudo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq / Brasil), Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa (FAPESPA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

A Senhor meu Deus por me fornecer tudo eu que preciso principalmente forças e determinação para encarar essa jornada da vida;

A Nossa Senhora de Nazaré, que faz eu me sentir mais próximo de Cristo, me dando esperança, paz e renovando minha Fé a cada ano;

A minha esposa, companheira e amiga Gleycilene Pereira que não mede esforços para me apoiar, sendo compreensiva e conselheira nos momentos mais difíceis da minha vida, dando me força e ensinamento para ser um ser humano melhor todos os dias;

Ao meu filho Antônio, que veio junto com o Doutorado, e se tornou a luz mais importante da minha vida e, que apesar de ser criança, foi muito compreensivo em entender as minhas ausências nos momentos que precisei executar esse trabalho. Amor infinito!!!

Aos meus pais, Raimundo Lucas Tavares pereira e Ana da Costa da Pereira, por me mostrarem o caminho do estudo e da busca pelo conhecimento dando a vida para ajudar a mim e meus irmãos;

Aos meus irmãos Anderson, Andrey e Franklin, pelo eterno carinho e por todas as batalhas que já passamos juntos;

A minha orientadora, Prof. Dr^a. Cláudia Regina Batista de Souza, pelas suas orientações e críticas pertinentes para a elaboração da Tese;

A minha Co-orientadora Gisele Barata da Silva por suas colaborações;

Aos meus amigos (as) construídos no curso de Doutorado, que me proporcionaram grandes trocas de conhecimento e bem estar ao estarmos juntos;

Irmão, você não percebeu que você é o único representante do seu sonho na face da Terra?

Se isso não fizer você correr, chapa, eu não sei o que vai. Então levanta e anda, vai, levanta e anda!!!

Emicida

RESUMO GERAL

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), pertencente à família Piperaceae, é a especiaria mais importante e difundida no mundo. Esta cultura é originária do sul da Índia e hoje é extensivamente produzida nas regiões tropicais. O Brasil é um dos mais importantes produtores de pimenta-do-reino, sendo o Estado do Pará o principal produtor nacional, responsável por aproximadamente 66% dessa produção. No entanto, a produção brasileira de pimenta-do-reino vem declinando drasticamente, 47,28% de 2006 a 2014. Esse fato está ligado principalmente a doença causada pelo fungo *Fusarium solani* f. sp. *Piperis*, além de fatores abióticos. Este patógeno provoca a fusariose, que tem causado sérios prejuízos na produção de pimenta-do-reino na região amazônica. Enquanto as cultivares de pimenteira-do-reino são susceptíveis à fusariose, algumas piperáceas de ocorrência na região amazônica apresentaram resistência à infecção pelo patógeno. Entre estas, na espécie *Piper tuberculatum* Jacq., conhecida com pimenta de macaco, foram identificadas bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* capazes de inibir o crescimento do *F. solani* f. sp. *piperis* em condições *in vitro*, como o isolado Pt12 e Pt13 que inibiram o crescimento do fungo em 38,96% e 55,31%, respectivamente. Sabendo-se que as bactérias endofíticas colonizam os tecidos internos das plantas e podem impactar positivamente no crescimento e no desenvolvimento do seu hospedeiro, o objetivo principal deste trabalho foi estudar a interação da pimenteira-do-reino com bactérias endofíticas *Pseudomonas* sp., isolado Pt13 e *Pseudomonas putida*, isolado Pt12, para verificar se esses endófitos podem atuar sobre a planta por meio de alterações fisiológicas e otimizando a absorção de nutrientes do solo, contribuindo para a promoção do crescimento e desenvolvimento vegetal. Sendo assim, buscou-se avaliar as plantas inoculadas com o isolado Pt12 e Pt13 em termos morfofisiológicos e de biomassa. Nos ensaios para avaliar os parâmetros morfofisiológicos e de crescimento as plantas foram inoculadas apenas com o isolado Pt13, onde foi observada influência positiva e significativa nos parâmetros fisiológicos das plantas inoculadas, como trocas gasosas e clorofila total. O crescimento e a biomassa seca neste ensaio, também, foram influenciados pela interação, onde foi observado incremento da massa seca da raiz, expansão da área foliar e área foliar específica em plantas inoculadas em comparação com as plantas controle. Em outro ensaio, as plantas de pimenteira-do-reino foram submetidas a três níveis de inoculação: plantas inoculadas com Pt12, plantas inoculadas com Pt13 e plantas não inoculadas, associando estes grupos a diferentes fontes de fósforo (Arad, superfosfato simples e superfosfato triplo e um controle

sem adição de fósforo), compondo um fatorial 3x4x5 (3 níveis de inoculação x 4 tratamentos com fósforo x 5 repetições). Foi observado pelo modelo do efeito linear misto uma interação entre os níveis de inoculação das plantas e os tratamentos com fósforo. Os resultados mostraram diferenças significativas entre todos os níveis de inoculação das plantas para todas as variáveis estudadas (altura, diâmetro do caule, número de folhas, área foliar, área foliar específica, massa seca da parte aérea, da raiz e total), com exceção da razão raiz parte aérea (RRPA). Com relação aos tratamentos com fósforo, somente o diâmetro do caule não diferiu. Nossos resultados mostraram que as bactérias endofíticas modularam positivamente o crescimento e o acúmulo de bioma das plantas em estudo, e possivelmente facilitou a absorção e solubilização das fontes de fósforo, em especial do fosfato natural Arad. Diante dos resultados, podemos concluir que endófitos Pt12 e Pt13 são fortes candidatos a serem bactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPB) e bactérias solubilizadoras de fosfato (PSB), melhorando os processos fisiológicos e favorecendo o crescimento e desenvolvimento da planta, facilitando a absorção de nutrientes, podendo, assim, serem utilizadas como biofertilizante em solos pobres em fósforo, bem como potenciais agentes de biocontrole.

Palavras-Chave: Análises morfofisiológicas. Nutrição vegetal. Bactéria endofítica. Pimenteira-do-reino. *Pseudomonas*

ABSTRACT

Black pepper (*Piper nigrum* L.), belonging to the family Piperaceae, is the most important and widespread spice in the world. This crop is native to southern India and is nowadays extensively grown in tropical regions. Brazil is one of the most important pepper producers, with the State of Pará being the main national producer, responsible for approximately 66% of this production. However, the Brazilian production of black pepper has declined dramatically, 47.28% from 2006 to 2014. This fact is mainly related to disease caused by the fungus *Fusarium solani* f. sp. Piperis, as well as abiotic factors. This pathogen causes fusariosis, which has caused serious losses in the production of black pepper in the Amazon region. While black pepper cultivars are susceptible to fusariosis, some Piperaceae occurring in the Amazon region have shown resistance to infection by the pathogen. Among these, in the species *Piper tuberculatum* Jacq., known as monkey pepper, endophytic bacteria of the genus *Pseudomonas* capable of inhibiting the growth of *F. solani* f. sp. piperis under in vitro conditions, such as the Pt12 and Pt13 isolates, which inhibited fungal growth by 38.96% and 55.31%, respectively. The main objective of this study was to study the interaction of black pepper with endophytic bacteria *Pseudomonas* sp., Isolated Pt13 and *Pseudomonas putida*, isolated Pt12, to verify if these endophytes can act on the plant through physiological changes and optimizing the absorption of nutrients from the soil, contributing to the promotion of plant growth and development. Thus, we tried to evaluate the plants inoculated with the isolate Pt12 and Pt13 in morphological and biomass terms. In the assays to evaluate the morphophysiological and growth parameters the plants were inoculated only with the Pt13 isolate, where a positive and significant influence was observed in the physiological parameters of the inoculated plants, such as gas exchange and total chlorophyll. Growth and dry biomass in this experiment were also influenced by the interaction, where root dry mass increase, leaf area expansion and specific leaf area in inoculated plants were observed in comparison with control plants. Black pepper plants were submitted to three inoculation levels: plants inoculated with Pt12, plants inoculated with Pt13 and uninoculated plants, associating these groups with different sources of phosphorus (Arad, single superphosphate and triple superphosphate and a control without phosphorus addition), composing a factorial 3x4x5 (3 levels of inoculation x 4 treatments with phosphorus x 5 replicates). An interaction between plant inoculation levels and phosphorus treatments was observed by the mixed linear effect model. The results showed significant differences among all the inoculation levels of the plants for all studied variables (height, stem diameter, number of leaves, leaf area, specific

leaf area, dry mass of shoot, root and total), with the exception of of the root shoot ratio (RRPA). Regarding the treatments with phosphorus, only the diameter of the stem did not differ. Our results showed that endophytic bacteria positively modulated the growth and biome accumulation of the plants under study, and possibly facilitated the absorption and solubilization of phosphorus sources, especially the natural phosphate Arad. In view of the results, we can conclude that endophytes Pt12 and Pt13 are strong candidates to be plant growth promoting bacteria (PGPB) and phosphate solubilizing bacteria (PSB), improving the physiological processes and favoring the growth and development of the plant, facilitating the absorption of nutrients, and can thus be used as biofertilizer in soils poor in phosphorus, as well as potential biocontrol agents..

Keywords: Morpho-physiological analyzes. Vegetable nutrition. Endophytic bacterium. Differential expression. Black pepper. *Pseudomonas*.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL

ABSTRACT

1 CONTEXTUALIZAÇÃO	11
--------------------------	----

REFERÊNCIAS	19
-------------------	----

2. AN ENDOPHYTIC <i>Pseudomonas</i> sp. OF <i>Piper tuberculatum</i> PROMOTES GROWTH ON <i>Piper nigrum</i> THROUGH INCREASE OF ROOT BIOMASS PRODUCTION	25
---	----

2. 1. Introduction	26
--------------------------	----

2.2 Material and methods	27
--------------------------------	----

2.3 Results.....	30
------------------	----

2.4 Discussion	35
----------------------	----

2.5. Conclusions	39
------------------------	----

REFERENCES	40
------------------	----

3. IMPACTO DE <i>Pseudomonas</i> DE <i>Piper tuberculatum</i> NA DINÂMICA DO FÓSFORO DO SOLO E NO CRESCIMENTO E NA BIOMASSA DE PLANTAS DE <i>Piper nigrum</i>	49
---	----

ABSTRACT	50
----------------	----

3.1 Introdução	51
----------------------	----

3.2. Materiais e métodos.....	54
-------------------------------	----

3.5 Resultados	57
----------------------	----

3.6 Discussão	65
---------------------	----

3.7 Conclusão	67
---------------------	----

REFERÊNCIAS	68
-------------------	----

CONCLUSÕES GERAIS	74
-------------------------	----

ANEXOS

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) (Figura 1), originária da Índia, é a especiaria mais importante e difundida no mundo. É uma planta trepadeira, pertencente à família Piperaceae, amplamente utilizada na culinária de muitos países na forma de grãos secos e moídos. As piperáceas são plantas Magnoliídeas tropicais e subtropicais representadas por espécies herbáceas, arbustos, árvores pequenas e trepadeiras. Essa família inclui uma enorme variedade de pimentas e compreende cinco gêneros: *Piper*, *Peperomia*, *Manekia*, *Zippelia* e *Verhuellia*. A família Piperaceae possui aproximadamente 4.000 espécies, das quais metade pertence ao gênero *Piper* (ALBIERO et al., 2005; REGASINI et al., 2008; SAMAIN et al., 2010).

Figura 1: Planta de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.).



Fonte: O autor.

O gênero *Piper* tem sido alvo de muitos estudos fitoquímicos, sendo relatado o acúmulo de metabólitos secundários com diversas atividades biológicas (REGASINI et al., 2008). As espécies deste gênero possuem grande importância medicinal, comercial e econômica, sendo que a pimenta-do-reino se destaca por sua importância mundial no mercado

de condimentos. Seus frutos maduros são a fonte da pimenta branca, enquanto seus frutos imaturos são a fonte da pimenta preta (PARMAR et al., 1997).

O Brasil está entre os maiores produtores de pimenta-do-reino, sendo o Pará o maior produtor nacional. Em 2016, a produção de pimenta-do-reino foi 54.426 t, destacando-se o Estado Pará como maior produtor nacional, responsável por aproximadamente 66% dessa produção (IBGE, 2017). O cultivo da pimenta-do-reino no Brasil foi introduzido pelos portugueses no século XVII e ficou restrito aos estados do litoral brasileiro. Mas, em 1933 foi estabelecido o cultivo racional com a cultivar Cingapura, conhecida como Kuching na Malásia, trazida por imigrantes japoneses ao município paraense de Tomé-Açú. A partir de material de propagação vegetal de uma única cultivar, ocorreu a expansão comercial do cultivo da pimenta-do-reino no Pará. Na década de 40, o Brasil importava parte do que consumia, tornando-se autossuficiente em 1950. (ALBUQUERQUE; DUARTE, 1991; DUARTE et al., 2002; HOMMA et al., 2005).

Em 1957, começaram a surgir os primeiros relatos de casos de podridão das raízes, conhecida também como fusariose. Essa doença ataca principalmente o sistema radicular, onde causa o apodrecimento da raiz causando a morte da planta e pode infectar também a parte nodal, provocando lesões nas hastes e secamentos dos ramos (ALBUQUERQUE; FERRAZ, 1976) (Figura 2). Nos tecidos infectados, o patógeno produz conidióforos, sobre os quais se originam os microconídios, macroconídios e peritécios vermelhos, contendo no interior, os ascósporos. Qualquer um desses tipos de esporos pode ser responsável por novas infecções no campo.

Figura 2: Planta de pimenteira-do-reino apresentando sintomas da doença fusariose.



Fonte: O autor.

A dispersão dos ascósporos tem um papel importante na incidência da doença, pois, ao serem liberados, são disseminados pelo vento e facilmente infectam a pimenteira pela parte nodal. Os ascósporos são resistentes podendo sobreviver à dissecação e, na estação chuvosa, a umidade do ar favorece-os, prolongando sua sobrevivência durante a dispersão. A fusariose causou grandes perdas na produção, redução da vida útil dos pimentais de 15 anos para 4 a 6 anos, e diversos problemas socioeconômicos para a região produtora. Somente em 1959 foi determinada a natureza do agente causal: um fungo biotrófico de solo, *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (ALBUQUERQUE; FERRAZ, 1976; HAMADA et al., 1988).

Este fungo apresenta uma fase assexual ou anamórfica de ocorrência mais comum pertencente à espécie *F. solani* f. sp. *piperis*, secção Martiella, família Tuberculariaceae. A fase sexual ou teleomórfica é constituída de peritécios globosos vermelhos, isolados ou gregários, que se desenvolvem no tecido morto da planta hospedeira pertence à espécie *Nectria haematococca*, ordem Hypocreales, família Nectriaceae. No campo, o fungo sobrevive em pimenteiras mortas e em hospedeiros nativos, entre eles a espécie *Piper aduncum* (ALBUQUERQUE; FERRAZ, 1976; DUARTE et al., 2002; TREMACOLDI, 2010)

Devido ao método utilizado de propagação vegetativa para disseminar o cultivo da pimenteira-do-reino, os plantios tornaram-se geneticamente uniformes, o que deixa o cultivo vulnerável a epidemias severas. Esta homogeneidade genética do cultivo no Brasil diminui a chance de existir fontes de resistência à fusariose. O fungo *F. solani* f. sp. *piperis* não ocorre

no Hemisfério Oriental, mesmo em países situados no centro de origem da pimenta-do-reino, como a Índia. A falta de interação entre genes da planta hospedeira e genes do patógeno, no ambiente nativo deste cultivo onde sua propagação é feita através de sementes, constitui-se na maior dificuldade na seleção de plantas resistentes. Na ausência de fontes de resistência, foram desenvolvidos cultivares com maior produtividade, o que tem permitido ao pipericultor conviver com a doença em bases econômicas, mesmo explorando comercialmente genótipos susceptíveis (ALBUQUERQUE; DUARTE, 1991; DUARTE et al., 2002, TREMACOLDI, 2010).

Atualmente, a fusariose é uma das principais doenças que compromete o cultivo da pimenta-do-reino, de ocorrência restrita ao Brasil. Desde a identificação do agente causador dessa doença em 1959, muitas medidas têm sido adotadas para seu controle, mas se mostraram onerosas ou pouco eficientes. O controle cultural com o uso de adubação química balanceada, drenagem em solos muito argilosos e irrigação durante o período seco deixa a planta menos predisposta à doença. No controle químico, pode-se destacar o uso de fungicidas para tratamento preventivo das estacas e pulverizações preventivas. A aplicação do fungicida na pimenteira teria que ser feita a cada 15 dias, o que tornou este controle inviável, pois o uso elevado de fungicidas para controle da doença aumenta o custo da produção e acarreta danos ambientais (POLTRONIERI et al., 2000; TREMACOLDI, 2010).

Outras medidas tomadas para controlar esta enfermidade envolveram a tentativa de identificar indivíduos resistentes no germoplasma de *P. nigrum* disponível no Brasil, contudo estes esforços não foram bem-sucedidos, pois a base genética dos materiais disponíveis no país é estreita, ademais a fusariose não ocorre na Ásia, continente no qual esta espécie é originada (POLTRONIERI et al., 2000). Outra tentativa para controlar a fusariose da pimenteira-do-reino envolveu a identificação de piperáceas de ocorrência na Amazônia brasileira que apresentassem resistência ao patógeno. Neste sentido, Albuquerque et al. (2001) em seus estudos clássicos de inoculações observaram que algumas espécies de piperáceas não apresentavam sintomas da fusariose em comparação com a espécie suscetível, *P. nigrum*, quando expostas a isolados de *Nectria haematococca* Berk & Br. f. sp. *piperis* (fase teleomorfa de *F. solani*). Dentre as pimenteiras resistentes à fusariose, destaca-se a espécie *Piper tuberculatum* Jacq.

Figura 3: Planta de *Piper tuberculatum* Jacq. var. *tuberculatum*



Fonte: O autor.

A espécie *Piper tuberculatum* Jacq. var. *tuberculatum* (Figura 3) é conhecida como pimenta d'ardo, pimenta de macaco ou pimenta longa (PEREIRA; SILVA, 2002; GUIMARÃES; GIORDANO, 2004), e ainda como jamburana (PEREIRA; SILVA, 2002).

Apresenta distribuição geográfica no Continente Americano e Antilhas. No Brasil é encontrada nos Estados do Pará, Amazonas, Maranhão, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Rio de Janeiro e Mato Grosso (GUIMARÃES; GIORDANO, 2004). Em relação à doença fusariose da pimenteira-do-reino, estudos realizados por Albuquerque et al. (2001) identificaram a espécie *P. tuberculatum* entre algumas piperáceas amazônicas com resistência a infecção pelo *F. solani* f. sp. *piperis*. Contudo, a estratégia de usar espécies resistentes como porta-enxerto em programas de melhoramento da pimenteira-do-reino não foi bem-sucedida, em função dos problemas de incompatibilidade tardia que resultaram na morte das plantas enxertadas (POLTRONIERI et al., 2000). Além disso, experimentos visando o cruzamento entre espécies nativas e *P. nigrum*, também não obtiveram sucesso (POLTRONIERI et al., 2000), o que pode ser explicado por análises filogenéticas que mostraram a separação das espécies asiáticas das neotropicais em clados bem distintos (JAMARILLO; MANOS, 2001).

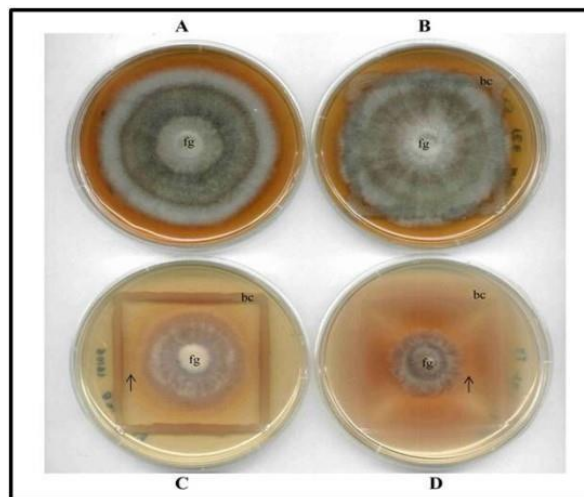
Os mecanismos de resistência a patógenos têm sido bastante estudados em diferentes espécies de plantas. As alterações que constituem o sistema de resistência desses organismos podem ser agrupadas em constitutivas e indutíveis, e os mecanismos de defesa variam de morfológicos a estruturais e químicos. A primeira linha de defesa da planta contra a infecção consiste na barreira física constituída pela cutícula e parede celular protegendo contra a penetração do patógeno. O ataque químico se constitui na segunda linha de defesa, onde a planta responde ao ataque do patógeno, evitando sua proliferação a partir do local da infecção.

A resistência é determinada por uma combinação de mecanismos de defesa constitutivos e induzíveis que envolvem um grande número de proteínas e outras moléculas orgânicas produzidas pela planta antes da infecção ou durante o ataque pelo patógeno (FERREIRA et al., 2007). Os mecanismos de resistência a doenças envolvem a expressão de genes de defesa da planta em resposta à infecção pelo patógeno, tais como aqueles que codificam proteínas relacionadas à patogênese (PRs), culminando na resistência sistêmica adquirida (SAR) que confere uma imunidade a um amplo espectro de patógenos (VAN LOON; VAN STRIEN, 1999; CORDEIRO; SÁ, 1999; MEDEIROS et al., 2003; ELVIRA et al., 2008).

O controle biológico de fitopatógenos através de microrganismos benéficos parece promissor e já amplamente estudado em várias culturas pelo mundo. E em pimenteira-do-reino já existem estudos em andamentos (AGISHA et al., 2017). Considerando essa abordagem, Nascimento (2009) e Nascimento et al. (2015), aprofundou os estudos da resistência de piperáceas à fusariose e identificou bactérias endofíticas em *P. tuberculatum* com potencial para o controle biológico do *F. solani* f. sp. *Piperis*, visto que é bem conhecido na literatura que estes microrganismos que habitam o interior das plantas podem atuar na proteção contra fitopatógenos (GLICK, 2012). As bactérias endofíticas habitam um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados pelos fitopatógenos, podendo assim controlá-los por meio da competição de nutrientes, produção de substâncias antibióticas, parasitando o patógeno ou mesmo induzindo a planta a desenvolver resistência às doenças (HALLMANN et al., 1997). Dentre as bactérias endofíticas com potencial no controle biológico de patógenos, as pertencentes ao gênero *Pseudomonas* são encontradas na maioria das espécies de plantas, sendo efetivas no controle de doenças de diversas culturas (CHEN et al., 1995; TRAN et al., 2008; ARAVIND et al., 2009; HASSAN et al., 2011; VANITHA & RAMJEGATHESH, 2014). Bactérias *Pseudomonas* são consideradas PGPB, de *Plant Growth-Promoting Bacteria*, pois além de controlarem patógenos, contribuem também para o crescimento e desenvolvimento da planta, seja por meio da produção de fitormônios e/ou sideróforos (GLICK, 2012). Outra característica destas bactérias é que uma mesma *Pseudomonas* é capaz de inibir o crescimento de diferentes espécies de fungos (CIUCA et al., 2007), o que evidencia o potencial destas bactérias no controle biológico de patógenos que causam doenças em diferentes espécies de plantas agronomicamente importantes. Interessantemente, Nascimento et al. (2015) isolaram 23 bactérias endofíticas associadas com as raízes de *P. tuberculatum*, dentre estas, os isolados Pt12 e Pt13, identificados como bactérias *Pseudomonas*, foram capazes de inibir o crescimento do fungo *F. solani* f. sp. *piperis* (Figura 4) em 38.96% and 55.31%, respectivamente. Estes resultados estão de acordo com a

literatura, como as *Pseudomonas* de coleus que inibiram o crescimento do fungo *Macrophomina phaseolina* na faixa de 30 a 60% (VANITHA; RAMJEGATHESH, 2014).

Figura 4: Ensaio de inibição do crescimento do *F. solani* f. sp. *piperis* por bactérias endofíticas associadas com raízes de *P. tuberculatum* em meio BDA (batata-dextrose-ágar). A: *F. solani* f. sp. *piperis* (controle, sem bactéria endofítica), B: *F. solani* f. sp. *piperis* + isolado Pt3 (*Bacillus cereus*), C: *F. solani* f. sp. *piperis* + isolado Pt12 (*Pseudomonas putida*) e D: *F. solani* f. sp. *piperis* + isolado Pt13 (*Pseudomonas* sp.). bc: bactéria, fg: fungo. As setas indicam as zonas de inibição.



Fonte: Nascimento et al. (2015).

Apesar de ainda não se conhecer os mecanismos pelos quais os isolados Pt12 e Pt13 foram capazes de inibir o crescimento *in vitro* do *F. solani* f. sp. *piperis*, dados da literatura mostram que bactérias *Pseudomonas* podem controlar doenças por meio da produção de compostos bio-sulfactantes (TRAN et al., 2008), antibióticos e antimicrobianos, tais como: pioluterina, fenazina, pirrolnitrina e pirazina (ALAIRE, 2005; CIUCA et al., 2007; KILANI-FEKI et al., 2010; HASSAN et al., 2011; SHEORAN et al. 2015). Além disto, bactérias *Pseudomonas* podem induzir a planta a desenvolver resistência às doenças por meio da indução da resistência sistêmica (ISR) (KANG et al., 2007; VERHAGEN et al., 2010; GÓMEZ-LAMA CABANÁS et al., 2014), na qual a penetração ativa do endófito induz à planta a sintetizar compostos como as fitoalexinas, dificultando a entrada do patógeno, como também, seu desenvolvimento na planta hospedeira (BAKKER et al., 2007). Alterações frequentemente observadas nas plantas durante a ISR incluem: aumento na atividade de enzimas relacionadas à defesa e na produção de fitoalexinas, e alterações estruturais na parede celular (VAN LOON et al., 1998; LIU et al., 2007; VERHAGEN et al., 2010).

Os endófitos bacterianos, em geral, têm capacidade de promover o crescimento e desenvolvimento de plantas por meio de diversos mecanismos tanto direto quanto indireto. A promoção direta do crescimento das plantas ocorre quando uma bactéria facilita a aquisição de nutrientes essenciais ou modificações do nível de hormônios dentro de uma planta. A aquisição de nutrientes facilitada pela PGPB geralmente inclui nitrogênio, fósforo e ferro. As PGPB podem também modular os níveis de fitormônios na planta, a qual pode sintetizar uma ou mais dos fitormônios, como auxina, citocinina e giberelina. Bem como reduzir sua síntese de outros, como o etileno, através da síntese de uma enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase, que cliva o composto ACC, o precursor imediato de etileno em todas as plantas superiores. A promoção indireta do crescimento da planta ocorre quando uma PGPB diminui o dano às plantas após a infecção com um fitopatógeno, incluindo alguns fungos e bactérias do solo. Isso geralmente ocorre pela inibição do patógeno pela PGPB (DOTY et al., 2009; KHAN; DOTY, 2009; RASHID et al., 2012; GLICK, 2012, 2015; LUO et al., 2012; MITTER et al., 2013; NARULA et al., 2013; COUTINHO et al., 2015; PANDYA et al., 2015; SAINI et al., 2015; SANTORO, 2015; SANTOYO et al., 2016).

Com relação à absorção de nutrientes pela planta, o fósforo é um dos nutrientes mais importantes, ficando atrás apenas para o nitrogênio (N). Ele está envolvido em diversos processos metabólicos dos vegetais como divisão e desenvolvimento celular, transporte de energia, transdução de sinal, biossíntese macromolecular, fotossíntese, respiração, absorção de nutrientes e fixação de nitrogênio, além de compor estruturas moleculares-chaves como ácidos nucleicos, fosfolipídios e ATP, sendo um nutriente limitante para crescimento e desenvolvimento das plantas. (KHAN et al., 2014). Entretanto, na solução do solo, a concentração de P é geralmente baixa ($> 0,06$ ppm), devido à rápida adsorção desse elemento nas superfícies dos colóides do solo ou então na precipitação como fosfatos de cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe) e alumínio (Al). Devido a maior parte do P no solo se mover até as raízes da planta mais por difusão que por fluxo de massa, o desenvolvimento radicular é essencial para absorção desse nutriente, visto que por difusão o P se mova, em média, somente 1-2 mm; desta forma, apenas o P que se encontra a esta distância das raízes fica disponível para absorção (EPSTEIN; BLONNM, 2006; COSTA, 2014).

Neste sentido, PGPB podem atuar de forma efetiva na absorção de fósforo estimulando a extensão do sistema radicular por meio do incremento da área superficial das raízes ou pela promoção do crescimento de raízes laterais e pelos radiculares (promoção de crescimento por meio de fitohormônios) (COUTINHO 2012; KHAN et al., 2014). Dentre os microrganismos o gênero *Pseudomonas*, já relatado na literatura, possui a capacidade de

alterar formas insolúveis de P para forma solúvel, através de secreção de ácidos orgânicos como ácido fórmico, ácidos, propiônicos, lácticos, glicólicos, ácido fumárico e succínico (SUNDARAM; MURALI, 2018). Assim, a interação entre microrganismos e fontes de P torna-se uma alternativa sustentável para o aumento da disponibilidade deste nutriente para as plantas, por meio da solubilização e mineralização do P de fontes inorgânicas e orgânicas, reduzindo os custos na produção agrícola, sendo significativa sua atuação como biofertilizante (CHAVES et al., 2013).

Visto que as bactérias *Pseudomonas* possuem grande potencial para serem promotoras de crescimento em plantas, bem como agentes no biocontrole de fitopatógenos e biofertilizantes, este trabalho buscou avaliar as respostas morfofisiológicas e de crescimento que possam elucidar a interação da pimenteira-do-reino com os isolados Pt 12 e Pt13 de *P. tuberculatum*. Para melhor entendimento dos efeitos das respostas à esta interação, o trabalho foi dividido em dois capítulos: o primeiro trata das respostas fisiológicas e de crescimento utilizando somente o isolado Pt13 para inoculação das plantas e; o segundo está relacionado as respostas de crescimento e de biomassa das plantas inoculadas tanto pelo isolado Pt12 quanto pelo isolado Pt13, separadamente, porém associados à diferentes fontes de fósforo.

REFERÊNCIAS

- AGISHA, V. N.; EAPEN, S. J.; BHAI, R. S.; KUMAR, A. Detecting and monitoring endophytic colonization by *Pseudomonas putida* BP25 in black pepper (*Piper nigrum* L.) using quantitative real-time PCR. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, 26 (1), 1-7. 2017.
- ALBIERO, A.L.M.; SOUZA, L.A.; MOURÃO, K.S.M.; ALMEIDA, O.J.G.; LOPES, W.A.L. Morfoanatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, 24, 550-554. 2005.
- ALBUQUERQUE, F.C.; DUARTE, M.L.R. Comportamento de cultivares de pimenta-doreino, em área de ocorrência de fusariose no Estado do Pará. Belém: **EMBRAPA-CPATU**, Documentos 59. 1991.
- ALBUQUERQUE, F.C.; DUARTE, M.L.R.; BENCHIMOL, R.L.; ENDO, T. Resistência de piperáceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amazônica**, 31, 341-348. 2001.
- ALBUQUERQUE, F.C.; FERRAZ, S. Características morfológicas e fisiológicas de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* e sua patogenicidade à pimenta-do-reino. **Experientiae**, 22, 133-151. 1976.

ALLAIRE, M. Diversite fonctionnelle des *Pseudomonas* producteurs d'antibiotiques dans les rhizospheres de coniferes en pepinieres et en milieu naturel. **Master Dissertation**. Laval Universitz.France. 2005.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZANGH, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped Blast and PSI-Blast a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, 25, 3389-3402. 1997.

ARAVIND, R.; KUMAR, A.; EAPEN, S.J.; RAMANA, K.V. Endophytic bacterial flora in root and stem tissues of black pepper (*Piper nigrum* L.) Genotype: isolation, identification and evaluation against *Phytophthora capsici*. **Letter of Applied Microbiology**, 48, 58-64. 2009.

ASLAM, M.; SINHA, V.B.; SINGH, R.K.; ANANDHAN, S.; PANDE, V.; AHMED, Z. Isolation of cold stress-responsive genes from *Lepidium latifolium* by suppressive subtraction hybridization. **Acta Physiologiae Plantarum**, 32, 205–210. 2010

BAKKER, P.A.; PIETERSE, C.M.; VAN LOON, L.C. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. **Phytopathology** 97, 239-242. 2007.

BENCHIMOL, R.L.; CHU, E.Y.; YUITIMUTO, R.; DIAS-FILHO, M.B. Controle da fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 35, 1343-1348. 2000.

CHAVES, D. P.; ZUCARELI, C.; OLIVEIRA JUNIOR, A. Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 57-72. 2013.

CHEN, C.; BAUSKE, E.M.; MUSSON, G.; RODRIGUEZKABANA, R.; KLOEPPER, J.W. Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. **Biological Control**, 5, 83-91. 1995.

CHENG, H.; LIU, H.; DENG, Y.; XIAO, J.; LI, X.; WANG, S. The WRKY45-2 WRKY13 WRKY4 Transcriptional regulatory cascade is required for rice resistance to fungal pathogen. **Plant Physiology**, 167, 1087–1099. 2015.

CHITTOOR, J.M.; LEACH, J.E.; WHITE, F.F. In induction of Peroxidase during defense against pathogens, **CRC Press**: Boca Raton, FL, 171-193. 1999.

CIUCĂ, C.C.P.M.; VOAIDES, C.; POPA, G.; BĂBEANU, N.; POP, A. Molecular detection of the genes involved in the antifungal properties of some *Pseudomonas* spp. strains. **Bulletin USAMV-CN**. 63 – 64. 2007.

CORDEIRO, M.C.R.; SÁ, M.F.G. Biotecnologia e resistência a patógenos. **Revista Biotecnologia**, 10, 34-39. 1999.

COUTINHO, F. P. **Fungos solubilizadores de fosfato na rizosfera de videira (*Vitis vinifera* L.): ocorrência e aplicação**. 2012. 89 f. Tese (Doutorado em Biologia de Fungos) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia de fungos, Pernambuco, 2012.

- DE SOUZA, C.R.B.; SANTA BRÍGIDA, A.B.; DOS SANTOS, R.C.; COSTA, C.N.M.; DARNET, S.H.; HARADA, M.L. Identification of sequences expressed during compatible black pepper - *Fusarium solani* f. sp. *piperis* interaction. **Acta Physiologiae Plantarum**, 33, 2553-2560. 2011.
- DEEPAK, S.; SHAILASREE, S.; KINI, R.K.; HAUSE, B.; SHETTY, S.H.; MITHÖFER, A. Role of hydroxyproline-rich glycoproteins in resistance of pearl millet against downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. **Planta**, 226, 323-33. 2007b.
- DEEPAK, S.; SHAILASREE, S.; SUJEETH, N.; KINI, R.K.; SHETTY, S.H.; MITHÖFER, A. Purification and characterization of proline/hydroxyproline- rich glycoprotein from pearl millet coleoptiles infected with downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. **Phytochemistry**, 68, 298-305. 2007a.
- DIATCHENKO, L.; LAU, Y-F.C.; CAMPBELL, A.P.; CHENCHIK, A.; MOQADAM, F.; HUANG, B.; LUKYANOV, S.; LUKYANOV, K.; GURSKAYA, N.; SVERDLOV ED, SIEBERT PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissuespecific cDNA probes and libraries. **PNAS**, 93, 6025-6030. 1996.
- DUARTE MLR, ALBUQUERQUE FC, CHU EY, BENCHIMOL RL, POLTRONIERI LS. Manejo integrado da fusariose e da murcha amarela da pimenteira-do-reino. In: Poltronieri, L.S.; Trindade, D.R. (Ed.). Manejo integrado das principais doenças de cultivos amazônicos. Belém: **Embrapa Amazônia Oriental**, p1-16. 2002
- ELVIRA MI, MOLINA GALDEANO M, GILARDI P, GARCÍA-LUQUE I, SERRA MT. Proteomic analysis of Pathogenesis-Related proteins (PRs) induced by compatible and incompatible interactions of pepper mild mottle virus (PMMoV) in *Capsicum chinense* L3 plants. **Journal of Experimental Botany**, 59, 1253-1265. 2008.
- FAN F, LI X-W, WU Y-M, XIA Z-S, LI J-J, ZHU W, LIU J-X. Differential Expression of expressed sequence tags in alfalfa roots under aluminum stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, 33, 539-546. 2011.
- FERREIRA RB, MONTEIRO S, FREITAS R, SANTOS CN, CHEN Z, BATISTA LM, DUARTE J, BORGES A, TEIXEIRA AR. The role of plant defense proteins in fungal pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**, 8, 677-700. 2007.
- GEDDES J, EUDES F, LAROCHE A, SELINGER LB. Differential expression of proteins in response to the interaction between the pathogen *Fusarium graminearum* and its host, *Hordeum vulgare*. **Proteomics**, 8, 545-54. 2008.
- GLICK BR. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**. Article ID: 963401. 2012.
- GLICK, B.R. Beneficial Plant-Bacterial Interactions. **Springer**, Heidelberg. Haas. 2015.
- GÓMEZ-LAMA CABANÁS C, SCHILIRÒ E, VALVERDE-CORREDOR A, MERCADO-BLANCO J. The biocontrol endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* PICF7 induces systemic defense responses in aerial tissues upon colonization of olive roots. **Frontiers of Microbiology**, 5, 427. 2014.

- GOR MC, ISMAIL I, MUSTAPHA WAW, ZAINAL Z, NOOR NM, OTHMAN R, HUSSEIN ZAM. Identification of cDNAs for jasmonic acid-responsive genes in *Polygonum minus* roots by suppression subtractive hybridization. **Acta Physiologiae Plantarum**, 33, 283-294. 2011.
- GUIMARÃES EF, GIORDANO LCS. Piperaceae do Nordeste Brasileiro I: Estado do Ceará. **Rodriguésia**, 84, 21-46. 2004.
- HALL TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids Symp. Ser.**, 41, 95-98. 1999.
- HALLMANN J, QUADT-HALLMANN A, MAHAFFEE WF, KLOPPER JW. Bacterial endophytes in Agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, 43, 895-914. 1997.
- HAMADA M, UCHIDA T, TSUDA M. Ascospore dispersion of the causal agent of necrotic blight of *Piper nigrum*. **Annals of Phytopathological Society of Japan**, 54, 303-308. 1998.
- HASSAN MN, AFGHANI S, HAFEEZA FY. Biological control of red rot in sugarcane by native pyoluteorin-producing *Pseudomonas putida* strain NH-50 under field conditions and its potential modes of action. **Pest Management Science**, 67, 1147-1154. 2011.
- HIRAO T, FUKATSU E, WATANABE A. Characterization of resistance to pine wood nematode infection in *Pinus thunbergii* using suppression subtractive hybridization. **BMC Plant Biology** 12:13 doi:10.1186/1471-2229-12-13 2012.
- HOMMA OKA, FERREIRA CAP, DUARTE MLR. Sistema de produção de pimentão. Brasília: **EMBRAPA**. 2005.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. AC em: 29 de Maio de 2017.
- JARAMILLO MA, MANOS PS. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **American Journal of Botany**, 88, 707-716. 2001.
- JONES JDG, WITEK K, VERWEIJ W, JUPE F, COOKE D, DORLING S, TOMLINSON L, SMOKER M, PERKINS S, SIMON FOSTER S. Elevating crop disease resistance with cloned genes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, 369: 20130087, <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2013.0087>. 2015.
- KANG SH, CHO H-S, CHEONG H, RYU C-M, KIM JF, PARK S-H. Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Microbiology Biotechnology**, 17, 96-103. 2007.
- KHAN, M.S.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate solubilizing microorganisms In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J, editors. Phosphate Solubilizing Microorganisms: Principles and Application of Microphos Technology. **Springer International Publishing Switzerland**, Switzerland, p 31-62, 2014. doi:10.1007/978-3-319-08216-5_2.

LATHA AM, RAO KV, REDDY VD. Production of transgenic plants resistant to leaf blast disease in finger millet (*Eleusine cora-cana* (L.) Gaertn.). **Plant Science**, 169: 657-667. 2005.

LI G, ASIEGBU FO. Use of scots pine seedling roots as an experimental model to investigate gene expression during interaction with the conifer pathogen *Heterobasidion annosum* (P-type). **Journal of Plant Research**, 117, 155-162. 2004.

LIU XG, GAO KX, KANG ZS, HE BL. Systemic resistance induced by biocontrol agentes in plants and its biochemical and cytological mechanisms. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**, 18, 1861-1868. 2007.

MEDEIROS RB, FERREIRA MASV, DIANESE JC. Mecanismo de agressão e defesa nas interações planta-patógeno. **Universidade de Brasília**, (ed), Brasília, 209p. 2003.

MISHRA S, SRIVASTAVA S, NAUTIYAL CS. Differential gene expression profile in *Pseudomonas putida* NBRIC19-treated wheat (*Triticum aestivum*) plants subjected to biotic stress of *Parthenium hysterophorus*. **Molecular Biology Reports**, 41, 1385-99. doi: 10.1007/s11033-013-2983-7. 2014.

NASCIMENTO SB, CASCARDO JCM, DE MENEZES IC, DUARTE MLR, DARNET SH, HARADA ML, DE SOUZA CRB. Identifying sequences potentially related to resistance response of *Piper tuberculatum* to *Fusarium solani* f. sp. *piperis* by suppression subtractive hybridization. **Protein & Peptide Letters**, 12, 1429-1434. 2009.

NASCIMENTO SB, LIMA AM, BORGES BN, DE SOUZA CRB. Endophytic bactéria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and in vitro screening for the control of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Genetics and Molecular Research**, 14, 7567-7577. 2015.

NASCIMENTO SB. *Piper tuberculatum* Jacq.: PROSPECÇÃO DE GENES E BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS COM POTENCIAL USO NO MELHORAMENTO GENÉTICO. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 90p. 2009.

PARMAR VS, JAIN SC, BISHT KS, JAIN R, TANEJA P, JHA A, TYAGI OD, PRASAD AK., WENGEL J, OLSEN CE, BOLL PM. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, 46, 597- 673. 1997.

PEREIRA BAS; SILVA MA. Lista de nomes populares de plantas nativas da região geoeconômica de Brasília, DF. 2002. Disponível em <http://www.recor.org.br/publicacoes/plantas-nativas.html>

REGASINI LO, COTINGUIBA F, SIQUEIRA JR, BOLZANI VS, SILVA DHS, FURLAN M, KATO M.J. Radical Scavenging Capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**. 27, 900-903. 2008.

RUIBAL C, CASTRO A, CARBALLO V, SZABADOS L, VIDAL S. Recovery from heat, salt and osmotic stress in *Physcomitrella patens* requires a functional small heat shock protein PpHsp16.4. **BMC Plant Biology** 13:174. doi: 10.1186/1471-2229-13-174. 2013.

- SAMAIN MS, VRIJDAGHS A, HESSE M, GOETGHEBEUR P, RODRÍGUEZ FJ, STOLL A, NEINHUIS C, WANKE S. *Verhuellia* is a segregate lineage in Piperaceae: more evidence from flower, fruit and pollen morphology, anatomy and development. **Annals of Botany**, 105, 677-688. 2010.
- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, New York. 1987.
- SCHENK ST, HERNÁNDEZ-REYES C, SAMANS B, STEIN E, NEUMANN C, SCHIKORA M, REICHEL T, MITHÖFER A, BECKER A, KOGEL K-H, SCHIKORAA A. NAcyl-homoserine lactone primes plants for cell wall reinforcement and induces resistance to bacterial pathogens via the salicylic acid/oxylin pathway. **Plant Cell**, 26, 2708–2723. 2014.
- SHEORANA N.; NADAKKAKATHB AV.; MUNJALA V.; KUNDUC A.; SUBAHARAND K.; VENUGOPALD V.; RAJAMMAB S.; EAPENB SJ.; KUMARA A. Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. **Microbiological Research**. 173, 66–78. 2015.
- TRAN, H.; KRUIJT, M.; RAAIJMAKERS, J.M. Diversity and activity of biosurfactant producing *Pseudomonas* in the rhizosphere of black pepper in Vietnam. **Journal of Applied Microbiology**, 104, 839–851. 2008.
- TREMACOLDI, C. R. Principais Doenças Fúngicas da Pimenteira-do-Reino no Estado do Pará e Recomendações de Controle. Embrapa Amazônia Oriental, Belém, PA. 2010.
- VAN LOON LC, BAKKER PA, PIETERSE CMJ. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology**, 36, 453–483. 1998.
- VAN LOON LC, VAN STRIEN EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 55, 85–97. 1999.
- VANITHA S, RAMJEGATHESH R. Bio Control Potential of *Pseudomonas fluorescens* against Coleus Root Rot Disease. **Journal of Plant Pathology Microbiology**, 5, 216. doi: 10.4172/2157-7471.1000216. 2014.
- VERHAGEN BW, TROTEL-AZIZ P, COUDERCHET M, HÖFTE M, AZIZ A. *Pseudomonas* spp. induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. **Journal of Experimental Botany**, 61, 249-260. 2010.
- YAO Y, NI Z, ZHANG Y, CHEN Y, DING Y, HAN Z, LIU Z, SUN, Q. Identification of differentially expressed genes in leaf and root between wheat hybrid and its parental inbred using PCR-based cDNA subtraction. **Plant Molecular Biology**, 58, 367-384. 2005.

2. An endophytic *Pseudomonas* sp. of *Piper tuberculatum* promotes growth on *Piper nigrum* through increase of root biomass production

^{1,2}Angelo Cleiton da Costa Pereira, ^{1,3}Gledson Luiz Salgado de Castro, ⁴Paulo Canas Rodrigues, ³Gisele Barata Silva, ^{1,2}Danyllo Amaral de Oliveira, ²Cláudia Regina Batista de Souza*

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, CEP 66077-530, Brazil.

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, CEP 66075-110, Brazil.

³Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, CEP 66077-530, Brazil.

⁴Departamento de Estatística, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, CEP 40.170-110, Brazil.

*Corresponding author: bsouza@ufpa.br

Abstract

Microorganisms that can positively influence plants have emerged as a powerful tool for sustainable agriculture. Previous studies identified a *Pseudomonas* sp. (Pt13) associated with the roots of *Piper tuberculatum*, a member of the Piperaceae occurring in the Amazon region with known resistance to infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, which causes root rot in black pepper (*Piper nigrum* L.). Pt13 was able to inhibit the *in vitro* growth of this pathogen by 55.31%; however, studies on *P. nigrum* as a host plant of Pt13 are lacking. Therefore, we aimed to evaluate the effects of Pt13 inoculation on *P. nigrum* growth under greenhouse conditions. The experiments comprised two treatments (inoculated and control) with 10 replicates per treatment and samplings at 30, 60 and 90 days post inoculation (dpi). Results revealed that the plants inoculated by immersion of roots in bacterial suspension showed no physiological differences in comparison to the control plants at 30 dpi. However, when these plants were submitted to additional inoculations through irrigation of soil with bacterial suspension repeated every 10 days, they showed an increment of 32% and 49% in net CO₂ assimilation rate and 23.94% and 42.78% in total chlorophyll content at 60 and 90 dpi, respectively. At 90 dpi, the inoculated plants showed an increase in the specific leaf area at 43,23%, total leaf area at 56%, root dry mass at 29% and total dry mass at 15%. Thus, results confirmed that Pt13 improved the photosynthetic efficiency, resulting in increased biomass production. Results obtained here will be useful in future studies of interaction with *F. solani* f. sp. *piperis*.

Keywords:

Biomass production, *Piper nigrum*, Photosynthetic efficiency, Plant growth, Plant morphology, *Pseudomonas* sp.

Artigo aceito na revista Physiological and Molecular Plant Pathology (E-mail do aceite nos anexos. Fig. 3)

*Correspondência do Autor: fone: (+55) 91 98165-4578, e-mail: bsouza@ufpa.br (SOUZA, C. R. B)

2. 1. Introduction

Global agricultural practice is moving towards more sustainable and less environmentally harmful approaches. In this context, microorganisms that can positively influence the growth and survival of plants with socio-economic importance represent an attractive alternative for sustainable agriculture. Among such microorganisms, bacteria that favor plant growth and development are known as plant growth-promoting bacteria (PGPB) [1, 2].

PGPB may promote plant growth by direct mechanisms that contribute to the use of nutrients by plants (production of phytohormones and siderophores, N₂ fixation and solubilization of phosphate), while the indirect mechanisms include processes to control phytopathogenic microorganisms (induction of systemic resistance-ISR, reduction of iron availability by sequestration with siderophores and production of lytic enzymes) [1, 2]. When these bacteria that are beneficial for plant growth and development are found colonizing the internal tissues of plants, they are known as endophytic PGPB [3-5].

Several endophytic PGPB have been isolated from many plants and evaluated regarding their beneficial properties and potential as bioinoculants in agriculture [3-7]. The production of phytohormones and other growth-promoting metabolites by bacteria and/or their interaction with the host plant can lead to changes in plant physiology, such as the enhancement of gas exchange, chlorophyll content and photosynthesis rate [8-10]. Besides affecting physiological aspects, bacteria interacting with plants can influence their morphological traits, leading to changes in plant phenotype, including increase in root and leaf growth [8, 11]. In addition, it is known that such physiological and morphological changes result from the gene expression regulation of the host plant in response to interaction with bacteria [8, 12-14]. An example of this is the increased synthesis of proteins involved in photosynthesis in rice inoculated with *Pseudomonas fluorescens* [14]. On the other hand, some endophyte genes are also important during interaction with the host plant, such as bacterial genes involved in plant colonization [4, 5].

Among PGPB, several *Pseudomonas* strains have shown potential beneficial effects on agriculture [11, 14-16]. In this regard, Nascimento *et al.* [17] identified a *Pseudomonas* sp. Pt13 associated with roots of *Piper tuberculatum* Jacq., a member of the Piperaceae occurring in the Amazon region with known resistance to infection by *Fusarium solani* f. sp. *piperis* [18]. This fungus infects the roots of black pepper (*Piper*

nigrum L.) causing root rot, also known as fusariosis disease, leading to root rot, leaf fall, and plant death [19]. Infection by *F. solani* f. sp. *piperis* can also occur in stems, causing stem blight disease or Mariquita disease [20, 21].

Black pepper, also known as the „the king of spices“, is a crop native to India with economic and social importance in a number of countries. In Brazil, the productivity of black pepper in 2016 was about 55,000 t, to which the State of Pará in the northern region contributed approximately 66% [22]. However, the productivity of Brazilian black pepper has been drastically affected by *Fusarium* root rot disease, with a reduction of approximately 32.24% between 2006 and 2016 [22]. In this context, *Pseudomonas* sp. Pt13 was able to inhibit the *in vitro* growth of *F. solani* f. sp. *piperis* by 55.31% [17]; however, studies on *P. nigrum* as a host plant of Pt13 are lacking. Therefore, here we aimed to evaluate the effects of Pt13 inoculation on *P. nigrum* growth under greenhouse conditions.

2.2 Material and methods

2.2.1. *Pseudomonas* sp. Pt13 culture

Bacterial cells of *Pseudomonas* sp. Pt13 obtained by Nascimento *et al.* [17] were cultured in tryptone soybean medium (Himedia, India) at 28°C under shaking at 150-180 rpm for 12 hours, when the culture reached the stationary growth phase. For inoculation of plants, the bacterial culture was adjusted to Optical Density (OD), $OD_{600} = 0.1$, which corresponds to 10^8 cells/mL, according to methodology described by Egamberdieva *et al.* [23].

2.2.2 Experimental design

The experiments comprised two treatments (control plants and those inoculated with Pt13), each one with 10 replicates, with each replicate corresponding to one plant per polyethylene bag. The 10 replicates from both treatments were evaluated regarding the effects of bacterial inoculation on their physiological parameters, with three samplings: at T1 (30 days post inoculation (dpi) through immersion of roots), T2 (another 30 days through irrigation of soil) and T3 (another 60 days through irrigation of soil). Thus, three physiological evaluation times were established: T1 (30 dpi), T2 (60 dpi) and T3 (90 dpi). The growth-related parameters were evaluated at T3 (90 dpi).

2.2.3 Plant material and bacterial inoculation

The experiments regarding *P. nigrum* cultivation were performed under greenhouse conditions at the Universidade Federal Rural da Amazônia (01°28'03"S, 48°29'18"W), Belém, state of Pará, Brazil, from June 2017 to August 2017. According to the Köppen-Geiger Climate Classification, the location where these experiments were performed belongs to the Tropical Group.

P. nigrum plants were produced through vegetative propagation of healthy cuttings, variety Kottanadan, supplied by Producer Sítio São José, Capitão Poço, Pará, Brazil. Initially, the cuttings (20-25 cm) containing 3 nodes and 1 leaf were aseptically washed in water and neutral detergent, followed by planting in sterile vermiculite and maintenance in the nursery at 26-32°C with 65-85% humidity for 30 days for rooting, according to the procedure described in the literature [24].

Inoculation of *P. nigrum* plants with isolate Pt13 was performed through two methods: immersion of roots and irrigation of soil with bacterial suspension (10^8 cells/mL). Firstly, 24 rooted cuttings were inoculated through immersion of roots in bacterial suspension for 10 minutes. As negative control, we used 24 rooted cuttings treated with sterile water instead of bacterial suspension, also through immersion of roots for 10 minutes. Plant materials from both treatments were planted in polyethylene bags (27x17 cm) containing 2 kg of yellow latosol soil adjusted by liming and addition of nutritive solution, according to the procedure described in the literature [25], followed by their maintenance under greenhouse conditions (temperature at 26-32°C with 65-85% humidity). After 30 dpi, we randomly selected 10 plants out of 24 inoculated plants, as replicates of each treatment, for evaluation of physiological parameters.

Since no significant differences were found between control and plants inoculated by immersion of roots, methodological adjustments were included, with the 10 inoculated replicates being additionally inoculated with Pt13, through irrigation of soil with 65 mL of bacterial suspension, repeated every 10 days. The 10 control replicates were irrigated with 65 mL of sterile water, repeated every 10 days. The 65 mL of bacterial suspension per plant was the volume required for complete and homogeneous irrigation of 2 kg of soil contained in each polyethylene bag. Control and inoculated plants were cultivated for 60 days under greenhouse conditions. All plants were irrigated daily with water, in order to provide physiological conditions close to those observed in the field, with periodical weighing of each bag/plant for compensation

of water lost by evapotranspiration [26]. Control and inoculated plants (10 replicates of each treatment) were submitted to three physiological evaluation times (T1=30 dpi, T2=60 dpi and T3=90 dpi), as described before.

2.2.4 Leaf gas exchange

The evaluation of gas exchange parameters was performed using a fluorometer coupled to a chamber (LI-6400XT; LI-COR). From each plant, the third or fourth fully expanded leaf, counted from the apex, was used for estimation of the net CO₂ assimilation rate, water vapor stomatal conductance, internal CO₂ concentration and transpiration rate, according to methodology described by Benchimol *et al.* [27]. The water use efficiency was determined by the ratio of net CO₂ assimilation and transpiration rates [28]. The instantaneous carboxylation efficiency was determined by the ratio of net CO₂ assimilation and internal CO₂ concentration rates [29]. The measurements were performed during the diurnal period between 09:00 and 11:00 hours, when the maximal photosynthetically active radiation occurs (900 μmol photons m⁻² s⁻¹ at leaf level and 400 μmol m⁻² s⁻¹ of CO₂ in the air). All measurements were performed at 28°C to 30°C, and the vapor pressure deficit was maintained at approximately 2.39 kPa, with humidity ranging from 65 to 85%.

2.2.5 Total chlorophyll content

The total chlorophyll content was evaluated using a portable chlorophyll meter SPAD-502-PLUS. From each plant, we used the third or fourth fully expanded leaf, which was evaluated at six different points of the leaf area, according to methodology described by Jesus and Marengo [30].

2.2.6 Plant growth-related parameters

For plant growth-related parameters, we used *P. nigrum* plants at T3= 90 dpi, which correspond to plants at 60 dpi through irrigation of soil with bacterial suspension. The plant height was measured using a grid, from the soil surface to the apex of the plant (cm). The stem diameter measurement was performed at three points of the plant (base, median and apex) and averaged using a digital caliper (mm). The number of leaves were counted. The total leaf area was determined by scanning the leaves using the LI-3100C Area Meter (cm²). The specific leaf area was determined by the ratio

between leaf area and leaf biomass. For dry matter determination, the aerial part (stem, leaf) and root were separated and placed in a forced air oven at 65°C, in order to obtain a constant mass. Then, each part of the plant was weighed on an analytical balance to determine the dry mass of the aerial part and root dry mass. The total dry mass was obtained by the sum of the root dry mass and dry mass of aerial part, and the root: aerial part ratio was obtained by calculating the ratio between these parameters [26].

2.2.7 Statistical analysis of experimental data

Data on physiological and plant growth-related parameters were evaluated by the independent samples t test, using the software Action Stat version 3.3.1 (2017) and R version 3.3.2 (2016). In addition, a linear mixed-effects model was used to evaluate the effects of the two factors, treatment and time, on each of the seven physiological parameters. The two factors were considered as fixed effects, and the plant ID was used as a random effect. The function *lme* of the R package *nlme* [31] was used to obtain the results.

2.3 Results

2.3.1 No changes in physiological parameters of *P. nigrum* plants inoculated with Pt13 through immersion of roots at T1 (30 dpi)

Our results revealed that *P. nigrum* plants inoculated through immersion of roots in bacterial suspension at T1 showed no differences in gas exchange parameters in comparison to control plants, according to statistical analysis using the independent samples t test (Figs. 1 and 2). Likewise, the inoculated plants showed no significant differences in total chlorophyll content (SPAD index) when compared to the control plants (Fig. 2), indicating that these plants were not affected by bacterial inoculation under the experimental conditions used here.

2.3.2 *P. nigrum* plants irrigated with Pt13 suspension showed beneficial effects at T2 (60 dpi) and T3 (90 dpi)

Based on the aforementioned results, methodological adjustments were performed, with additional inoculations of *P. nigrum* plants through irrigation of soil with Pt13 suspension. Our results, shown in Figs. 1 and 2, revealed that the net CO₂ assimilation rate (A) found in the inoculated plants comprised an increase of 32% at T2 and 49% at T3 in comparison to control. In contrast, the internal CO₂ concentration (C_i)

was higher in control than in inoculated plants at T2 and T3. Also relative to control, the inoculated plants showed that the instantaneous carboxylation efficiency (A/Ci) increased 54.06% at T2 and 88.33% at T3, while the water use efficiency (WUE) increased 36.69% at T2 and 33.72% at T3, with maximum rate at T3. Likewise, the SPAD index was also higher in inoculated plants than in control, with increases of 23.94% at T2 and 42.78% at T3, when the maximum rate was reached. For the transpiration rate (E) and water vapor stomatal conductance (gs), we found no significant differences between inoculated and control plants. The physiological parameters that were found to have increased in inoculated plants indicated that the Pt13 benefitted the *P. nigrum* plants by improvement of their photosynthetic traits.

Regarding the evaluation of plant growth-related parameters, our results showed significant increases in the leaf area, root dry mass and total dry mass of *P. nigrum* plants irrigated with Pt13 suspension at 90 dpi, in comparison to control plants. For other evaluated parameters (number of leaves, stem diameter, plant height, DMAP and RAPR), we found no differences between inoculated and control treatments (Table 1). These changes found in inoculated plants represented an increase in the specific leaf area at 43.23%, total leaf area at 56%, root dry mass at 29% and total dry mass at 15%, confirming that isolate Pt13 was able to promote *P. nigrum* growth and alter plant traits. Inoculated and control *P. nigrum* plants at 90 dpi are shown in Supplementary Fig. 1.

Besides analysis by the independent samples t test, we used a linear mixed-effects model for evaluation of each of the physiological parameters separately, considering the factors treatment (TRAT) and time (TIME) as fixed effects and the plant ID as a random effect. A model with main effects of TRAT, main effects of TIME and interaction between TRAT and TIME was considered, and the results, after removing the non-significant interaction terms from the mixed-effects model, are shown in Table 2. These results revealed that only for parameters A, A/Ci and SPAD was an interaction effect between TRAT and TIME detected. From the analysis of Table 2, we found significant differences between the levels of the factor TIME for all physiological parameters. Based on further output from the linear fixed-effects model, it was possible to quantify the differences between levels of the factors TRAT, TIME and TRAT x TIME for each of the physiological parameters. The main conclusions, including the p-values (p) and the standard errors (SE), are shown in Supplementary Data. Regarding the effects of factor TRAT, control and inoculated, significant differences were found for parameters A, Ci, WUE, A/Ci and SPAD (Table 2). These findings corroborate our

results using the independent samples t test, confirming that Pt13 positively changed the physiology of *P. nigrum* plants over inoculation time.

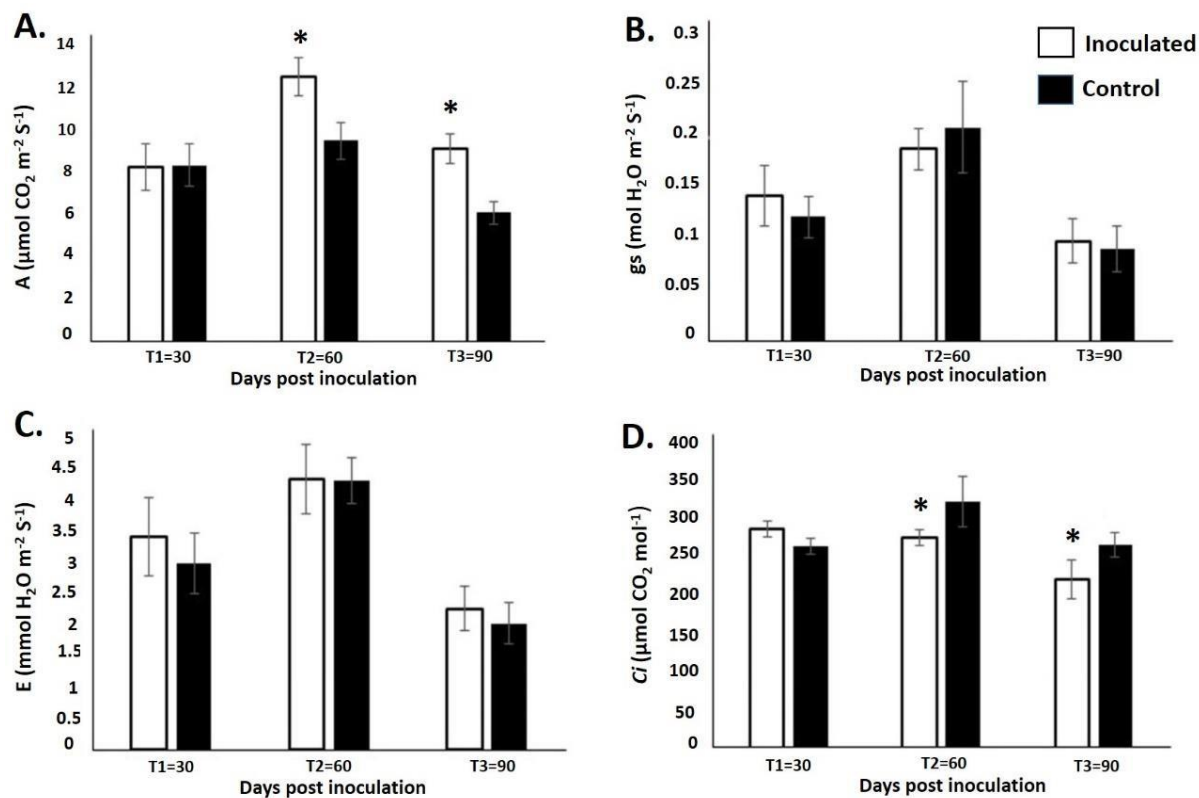


Fig. 1. Evaluation of physiological parameters in control *P. nigrum* plants and those inoculated with *Pseudomonas* sp. Pt13, with samplings at T1 (30 dpi through immersion of roots), T2 (60 dpi through irrigation of soil) and T3 (90 dpi through irrigation of soil) with bacterial suspension. A- Net CO₂ assimilation rate (A), B- Water vapor stomatal conductance (gs), C- Transpiration rate (E), D- Internal CO₂ concentration (Ci). The asterisks (*) indicate the significant differences between parameter values (means) for each treatment using the independent samples t test (P < 0.05). The bars represent the statistical significance (standard deviation) between means, n = 10.

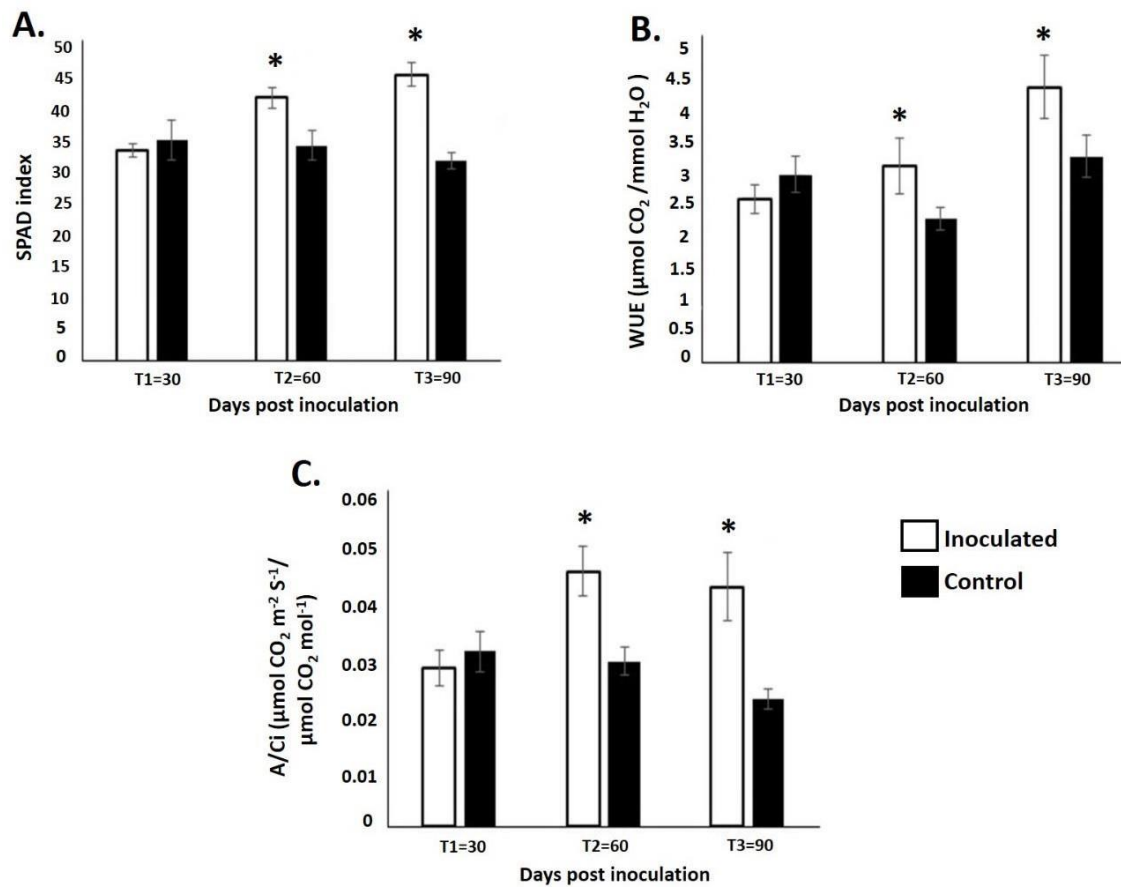


Fig. 2. Evaluation of physiological parameters in control *P. nigrum* plants and those inoculated with *Pseudomonas* sp. Pt13, with samplings at T1 (30 dpi through immersion of roots), T2 (60 dpi through irrigation of soil) and T3 (90 dpi through irrigation of soil) with bacterial suspension. A- Total chlorophyll content (SPAD), B- Water use efficiency (WUE), C- Instantaneous carboxylation efficiency (A/Ci). The asterisks (*) indicate the significant differences between parameter values (means) of each treatment using the independent samples t test ($P < 0.05$). The bars represent the statistical significance (standard deviation) between means, $n = 10$.

Table 1. Plant growth-related parameters (number of leaves, stem diameter, plant height, specific leaf area, total leaf area, dry mass of the aerial part (DMAP), root dry mass (RDM), root: aerial part ratio (RAPR) and total dry mass (TDM) of *P. nigrum* plants inoculated with *Pseudomonas* sp. (Pt13) through irrigation of soil with bacterial suspension at 90 dpi. As negative control, we used plants irrigated with sterile water.

Parameter	Treatment	Values	p-Value
Number of leaves (unit)	Inoculated	10.2±1.6	0.1163
	Control	9±1.5	
Stem diameter (mm)	Inoculated	3.83±0.34	0.2463
	Control	3.55±0.19	
Plant height (cm)	Inoculated	41.3±4.0	0.4346
	Control	43.75±2.7	
Specific leaf area (cm ² /g)	Inoculated	105.09±30.78	0.007
	Control	73.37±13.32	
Total leaf area (cm ²)	Inoculated	362.65±34.97	0.001
	Control	232.55±11.33	
DMAP (g)	Inoculated	3.57±0.74	0.1704
	Control	3.23±0.55	
RDM(g)	Inoculated	1.2±0.23	0.006
	Control	0.93±0.23	
RSR (g)	Inoculated	0.34±0.06	0.0742
	Control	0.28±0.04	
TDM (g)	Inoculated	4.78±0.44	0.001
	Control	4.16±0.37	

Values represent means for ten plants ($n = 10$).

Table 2. Linear mixed-effects model applied to data on physiological parameters of control *P. nigrum* plants and those inoculated with Pt13, with the p-values for the hypotheses testing no effects of treatment (TRAT), no effects of time (TIME) and no interaction between TRAT and TIME. Net CO₂ assimilation rate (A), water vapor stomatal conductance (gs), transpiration rate (E), internal CO₂ concentration (Ci), water use efficiency (WUE), instantaneous carboxylation efficiency (A/Ci) and total chlorophyll content (SPAD).

Physiological parameter	TRAT	TIME	TRAT:TIME
A	0.0004	<0.0001	0.0038
Gs	0.5203	<0.0001	
E	0.5026	<0.0001	
Ci	0.0178	0.0013	
A/E	0.0043	0.0001	
A/Ci	<0.0001	0.0037	0.0001
SPAD	<0.0001	0.0001	<0.0001

2.4 Discussion

Here, we evaluated the effects of *Pseudomonas* sp. Pt13 inoculation on the growth of *P. nigrum* plants under greenhouse conditions. For Pt13 inoculation, we used two methods of inoculation described in the literature: immersion of roots and irrigation of soil with bacterial suspension. In this regard, the colonization of *P. nigrum* roots by inoculated Pt13 comprises an essential step toward an effective interaction between these two organisms, and consequently toward promotion of *P. nigrum* growth by Pt13. Our results using *P. nigrum* plants with roots immersed in Pt13 suspension at T1 revealed no changes in comparison to the control, in all the physiological parameters evaluated. This result was not the expected one, since initial studies performed by our group indicated that this bacterium was able to cause significant changes in *P. nigrum* growth (Unpublished results). In our initial studies, besides the immersion of roots in Pt13 suspension adjusted to OD₆₀₀ = 0.1, corresponding to 10⁸ cells/mL, we had dropped a few microliters of non-diluted bacterial culture into the soil, as an inoculation booster. Then, the absence of physiological changes in inoculated plants detected here indicated that they were not affected by bacterial inoculation in the experimental conditions used. Among the possible causes affecting the interaction between *P. nigrum* and Pt13, we considered the process of inoculation used and a probable low density in the bacterial cells. Alterations in the inoculated bacterial cell density during plant cultivation have been reported [32, 33]. An example is *Pseudomonas putida* BP25 isolated from roots of black pepper with antagonistic activity against *Phytophthora*

capsici. After inoculation of black pepper roots with a BP25 suspension (OD = 1.0), Agisha *et al.* [33] detected by real time PCR assays a significant decrease in bacterial DNA from 0.4 ng (nanogram) at 10 and 14 dpi to 0.0046 ng at 28 dpi, indicating a decline in endophyte population during plant cultivation. Thus, it is possible that a similar process occurred in our black pepper plants, whose density of Pt13 cells at 30 dpi may have been lower than that observed for BP25 at 28 dpi by Agisha *et al.* [33], resulting in no changes in the physiological parameters evaluated here.

Therefore, based on the aforementioned information, we submitted our pre-inoculated plants to additional inoculations through irrigation of soil with Pt13 suspension, repeated every 10 days. Studies using repeated plant inoculations have been reported [34-36]; here, we used this strategy in order to favor the maintenance of Pt13 cell density in *P. nigrum* roots during the 90 days of cultivation. The Pt13 inoculum used was the same as that used before, taking into account that a bacterial culture in the stationary phase contains active cells. In addition, bacterial suspensions adjusted to $OD_{600} = 0.1$ have been used with success in plant inoculation assays [23, 37]. Our methodological adjustments produced positive results, since these inoculated *P. nigrum* plants showed physiological changes in comparison to control, indicating that the colonization by Pt13 was effective. The changes found in inoculated plants included increased gas exchange, total chlorophyll content and plant growth-related parameters, confirming *Pseudomonas* sp. Pt13 as a PGPB.

At T2, the net CO₂ assimilation rate found in the inoculated plants represented an increase of 32% relative to the control plants, while at T3 this parameter remained 49% higher, showing that the Pt13 positively influenced the photosynthetic process in *P. nigrum* plants. Additionally, these inoculated plants showed a decrease in the internal CO₂ concentration rate (14.6% at T2 and 17.12% at T3), as is expected for plants with increased photosynthetic rate, which results in a reduced CO₂ concentration in the intercellular space. It is known that the photosynthetic rate depends on environmental factors, such as light, temperature and CO₂, as well as internal factors, including the chlorophyll content. In addition, the relationship between an increase in chlorophyll, photosynthesis and plant growth rates has been shown [38]. Therefore, the increased total chlorophyll content (TChl) found in *P. nigrum* plants inoculated with Pt13 probably contributed to the rise in their photosynthesis rate. At the physiological level, an elevated TChl may contribute to an increase in the CO₂ assimilation rate, favoring the oxidation of H₂O and, consequently, the transport of electrons to produce NADPH

and ATP, which will be used in the process of carboxylation in the Calvin-Benson cycle [39].

In this regard, Samaniego-Gómez *et al.* [40] reported that the promotion of photosynthetic capacity in *Capsicum chinense* was due to the increased electron transport rate in the thylakoid membranes, which was caused by the inoculation of *Bacillus* spp. strains. Thus, an increased electron transport rate caused by an endophyte could boost the production of NADPH and ATP, favoring carboxylation, as found in the inoculated *P. nigrum* plants that showed increased instantaneous carboxylation efficiency. The phytohormones produced by PGPB may increase the nitrogen-use efficiency and activities of nitrate reductase and carbonic anhydrase enzymes of the plant, resulting in an improved nitrogen utilization by plants, also leading to an increase in the photosynthesis rate [41]. The influence of nitrogen on instantaneous carboxylation efficiency has also been reported [42]. A rise in the photosynthetic rate of the host plant inoculated with an endophyte may also result from changes in the expression levels of proteins involved in photosynthesis, such as RuBisCO [14, 43]. Since the photosynthesis process results in the formation of photoassimilates required for various cellular processes, including the production of plant biomass [39], the prevalence of a higher total chlorophyll content and photosynthesis rate in plants inoculated with Pt13 consequently contributed to the increase in their plant growth-related parameters at T3.

Another gas exchange parameter found to be higher in the inoculated *P. nigrum* plants was the efficiency of water use, which is defined as the ratio of the carbon assimilation rate to the transpiration rate. It is known that during gas exchanges, plants tend to an equilibrium between absorption of CO₂ from the external environment and loss of water through transpiration. The reduction of water loss occurs mainly by stomatal control, and the stomata close when water storage is unfavorable to the plant, restricting the entrance of CO₂ [44]. Several studies have shown that plants can be positively influenced by endophytes, as regards increased water use efficiency in host plants cultivated under diverse environmental conditions, including water deficit [10, 37, 45]. Here, the *P. nigrum* plants were cultivated in a greenhouse under favorable growth conditions, including soil quality, humidity, temperature and water availability. Under normal conditions, Pt13 inoculation benefitted the *P. nigrum* plants by an improvement of water use efficiency of 36.69% at T2 and 33.72% at T3 in comparison to control, with maximum rate at T3. This improved water use efficiency indicates a

positive influence on photosynthesis, with *P. nigrum* plants assimilating more CO₂ molecules per water molecule lost by stomata, which may have contributed to an increase in their plant growth-related parameters. At the physiological level, certain factors, such as nitrogen fertilization and light environment, may interfere in the plant's water use efficiency [46]. Thus, it is possible that the phytohormones produced by the endophyte, causing improved nitrogen utilization and photosynthesis rate in the host plant [41], also contribute to higher water use efficiency. Another mechanism by which the endophyte may improve the water use efficiency of the host plant is the modulation of stomatal control, as reported by Rho *et al.* [37] in rice plants inoculated with bacterial and yeast endophytes. Therefore, the better efficiency of water use found in *P. nigrum* inoculated with Pt13 can involve mechanisms similar to those mentioned above, but additional studies must be performed for their elucidation.

Regarding the plant growth-related parameters, the inoculation of *P. nigrum* plants with Pt13 increased their specific leaf area, total leaf area, root dry mass and total dry mass in comparison to control. Similar results reported by Rostamikia *et al.* [47] showed *Corylus avellan* inoculated with a mix of bacteria, including strains of *Pseudomonas putida* and *Bacillus subtilis*, with increased specific leaf area, root dry mass and total dry mass. In black pepper, the inoculation with endophytic fungus *Piriformospora indica* promoted an increase in leaf area and chlorophyll content, as well as biomass accumulation [48]. It has also been reported that colonization by *Pseudomonas* increased the dry mass of cotton and tomato plants [23, 49]. In contrast, other studies show that the endophyte may change some plant characters, but without promoting an increase in its total biomass and plant growth. As an example, Henning *et al.* [11] reported no alterations in the photosynthetic traits and total biomass of *Populus trichocarpa* inoculated with *Pseudomonas*, despite showing a significant increase in its root and leaf growth rates. Likewise, no effects on root dry matter accumulation were found in sugarcane plants inoculated with an endophyte, despite their increased photosynthesis rate [50].

Here, the inoculation of *P. nigrum* plants with Pt13 improved their photosynthetic traits and promoted their growth, mainly regarding their root system. These plants showed an increased root dry mass and a gain of 15% in the total plant biomass in comparison to control. In addition, Pt13 increased specific leaf area and total leaf area, but with no changes in leaf number and increase in aerial dry mass. This result indicated that Pt13 may affect leaves morphologically, resulting in thinner leaves with

increased foliar area, while their biomass remain unchanged. Some effects of *Pseudomonas* on the morphological traits of host plants have been reported [8, 11], with bacterial strains promoting changes in roots and leaves that can result or not in plant growth. In *P. trichocarpa*, the *Pseudomonas* GM30 increased root surface area rate, but without increasing root biomass, while leaf surface area, leaf number and aboveground biomass were increased, but with no effect on the specific leaf area [11]. Although we found no differences in the dry mass of the aerial part of inoculated *P. nigrum* plants, morphological changes observed in their leaves may have favored the plant growth by improvement of their photosynthesis rate, since an increased leaf area interferes in light capture and CO₂ assimilation [51]. Furthermore, the improvement of the root system evidenced by increased root dry mass probably contributed to *P. nigrum* growth through better access to nutrients. In this regard, it is known that indol acetic acid (IAA) comprises the main auxin involved in plant root growth [52], with several IAA-producing *Pseudomonas* strains [23, 53, 54]. The effect of IAA produced by endophytic bacteria includes an increase in the number of lateral and adventitious roots and in root surface area, providing the host plant with better absorption of soil nutrients [55]. Another metabolite produced by *Pseudomonas* bacteria with importance for plant growth is siderophores, which may increase the ferric nutrition of plants [56, 57]. Thus, the production of such plant growth-promoting metabolites by Pt13 may have contributed to an improved photosynthesis rate and root system, causing a better translocation of water and more efficient use of nutrients, resulting in increased growth of *P. nigrum* plants, as reported here. However, further studies are necessary to elucidate the participation of Pt13 in *P. nigrum* growth, including the identification of up- and down-regulated genes during this interaction.

2.5. Conclusions

Overall, our results showed that *Pseudomonas* sp. Pt13 promoted the growth of *P. nigrum* plants, since bacterial inoculation increased their photosynthetic traits and biomass production. This study reported for the first time the evaluation of *P. nigrum* as the host plant of an endophyte isolated from *P. tuberculatum*, contributing to future experiments regarding the interaction with pathogen *F. solani* f. sp. *piperis*.

Acknowledgements

The authors thank: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas do Pará (FAPESPA),

Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), Universidade Federal da Bahia (UFBA), and Universidade Federal do Pará (UFPA), Brazil.

References

- [1] B.R. Glick, Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications, *Scientifica* (2012) Article ID 963401.
- [2] R. Souza, A. Ambrosini, L.M.P. Passaglia, Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils, *Genet. Mol. Biol.* 38 (2015) 401-419.
- [3] J. Hallmann, A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee, J.W. Kloepper, Bacterial endophytes in agricultural crops, *Can. J. Microbiol.* 43 (1997) 895-914.
- [4] S.L. Kandel, P.M. Joubert, S.L. Doty, Bacterial endophyte colonization and distribution within plants, *Microorganisms* 77 (2017) doi:10.3390/microorganisms5040077.
- [5] G. Santoyo, G. Moreno-Hagelsieb, M.C. Orozco-Mosqueda, B.R. Glick, Plant growth-promoting bacterial endophytes, *Microbiol. Res.* 183 (2016) 92–99.
- [6] M. Rosenblueth, E. Martínez-Romero, Bacterial endophytes and their interactions with hosts, *Mol. Plant Microbe Interact.* 19 (2006) 827–837.
- [7] J.R. Gaiero, C.A. McCall, K.A. Thompson, N.J. Day, A.S. Best, K.E. Dunfield, Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion, *Am. J. Bot.* 100 (2013) 1738–1750.
- [8] C.M. Timm, D.A. Pelletier, S.S. Jawdy, L.E. Gunter, J.A. Henning, N. Engle, J. Aufrecht, E. Gee, I. Nookaew, Z. Yang, T-Y. Lu, T.J. Tschaplinski, M.J. Doktycz, G.A. Tuskan, D.J. Weston, Two poplar-associated bacterial isolates induce additive favorable responses in a constructed plant-microbiome system, *Front. Plant Sci.* 7 (2016) 497 DOI 10.3389/fpls.2016.00497.

- [9] A.S. Nascente, M.C.C. Filippi, A.C. Lanna, A.C.A Souza, V.L.S. Lobo, G.B. Silva, Biomass, gas exchange, and nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of microorganism growth promoters, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 2956–2965.
- [10] T.P. Sousa, A.C.A. Souza, M.C.C. Filippi, A.C.L. Lanna, M.V. Cortês, H.A. Pinheiro, G.B. Silva, Bioagents and silicon promoting fast early upland rice growth, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 3657–3668.
- [11] J.A. Henning, D.J. Weston, Pelletier DA, C.M. Timm, S.S. Jawdy, A.T. Classen, Root bacterial endophytes alter plant phenotype, but not physiology, *PeerJ* 4:e2606; (2016) DOI 10.7717/peerj.2606.
- [12] N. Bharti, S.S. Pandey, D. Barnawal, V. K. Patel, A. Kalra, Plant growth promoting rhizobacteria *Dietzia natronolimnaea* modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress, *Scientific Rep.* 6 (2016) 34768.
- [13] F.P. Amaral, J.C.F. Bueno, V. S. Hermes, A.C.M. Arisi, Gene expression analysis of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. *Symbiosis* 62 (2014) 41–50.
- [14] S. Kandasamy, K. Loganathan, R. Muthuraj, S. Duraisamy, S. Seetharaman, R. Thiruvengadam, B. Ponnusamy, S. Ramasamy, Understanding the molecular basis of plant growth promotional effect of *Pseudomonas fluorescens* on rice through protein profiling, *Proteome Sci.* 7 (2009) 7-47.
- [15] L. Bensidhoum, E. Nabti, N. Tabli, P. Kupferschmied, A. Weiss, M. Rothballer, M. Schmid, C. Keel, A. Hartmann, A. Heavy metal tolerant *Pseudomonas protegens* isolates from agricultural well water in northeastern Algeria with plant growth promoting, insecticidal and antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* 75 (2016) 38–46.
- [16] K.A. Devi, G. Pandey, A. K. S. Rawat, G.D. Sharma, P. Pandey, The endophytic Symbiont-*Pseudomonas aeruginosa* stimulates the antioxidant activity and growth of *Achyranthes aspera* L., *Front. Microbiol.* 8 (2017) 1897.

- [17] S.B. Nascimento, A.M. Lima, B.N. Borges, C.R.B. de Souza, Endophytic bacteria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and *in vitro* screening for the control of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.), Genet. Mol. Res. 14 (2015) 7567-7577.
- [18] F.C. Albuquerque, M.L.R. Duarte, R.L. Benchimol, T. Endo, Resistência de piperáceas nativas da Amazônia à infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*, Acta Amaz. 31 (2001) 341-348.
- [19] F.C. Albuquerque, S. Ferraz, Características morfológicas e fisiológicas de *Nectria haematococca* f. sp. *piperis* e sua patogenicidade à pimenta do reino (*Piper nigrum* L.), Experientia 22 (1976) 133-151.
- [20] M. Hamada, T. Uchida, M. Tsuda, Ascospore dispersion of the causal agent of Nectria Blight of *Piper nigrum*, Ann. Phytopathol. Soc. Japan 54 (1988) 303–308.
- [21] K. Ikeda, Role of perithecia as an inoculum source for stem rot type of pepper root rot caused by *Fusarium solani* f. sp. *piperis* (teleomorph: *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*), J. Gen. Plant Pathol. 76 (2010) 241–246.
- [22] IBGE. 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Banco de dados. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Accessed in: 29 de Maio de 2017.
- [23] D. Egamberdieva, D. Jabborova, A. Hashem, *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid, Saudi J. Biol. Sc. 22 (2015) 773–779.
- [24] EMBRAPA. 2014. O.F. Lemos, C.R. Tremacoldi, M.C. Poltronieri, Boas práticas agrícolas para aumento da produtividade e qualidade da pimenta-do-reino no Estado do Pará – Brasília, DF. 52 p. ISBN 978-85-7035-305-4
- [25] EMBRAPA. 2004. Manual Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 65 p. (Qualidade e Segurança dos Alimentos).

- [26] W.V. Andrade Júnior, B.G. Santos Filho, A.K.S. Lobato, D.K.Y. Tan, C.F. Oliveira Neto, A.C.C. Pereira, R.L.M. Cunha, R.C.L. Costa, T.Y.S. Kikuchi, R.S. Okumura, Negative interference on growth and morpho-anatomical modifications in young *Parkia gigantocarpa* plants under waterlogging, *Aust. J. Crop Sci.* 9 (2015) 523-531.
- [27] R.L. Benchimol, E.Y. Chu, R.Y. Muto, M.B. Dias-Filho, Controle de fusariose em plantas de pimenta-do-reino com bactérias endofíticas: sobrevivência e respostas morfofisiológicas, *Pesq. Agrop. Bras.* 35 (2000) 1343-1348.
- [28] J.A.P. Torres, M.A. Schiavinato, Crescimento, eficiência fotossintética e eficiência do uso da água em quatro espécies de leguminosas arbóreas tropicais, *Hoehnea* 35 (2008) 395-404.
- [29] R. L. S. Ferraz, A. S. Melo, J. F. Suasuna, M. E. B. Brito, P. D. Fernandes, E. S. Nunes Júnior, Trocas gasosas e eficiência fotossintética em acótipos de feijoeiro cultivados no semiárido, *Pes. Agropec. Trop.* 42 (2012) 181-188.
- [30] S.V. Jesus, R.A. Marengo, O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas, *Acta Amaz.* 38 (2008) 815 – 818.
- [31] J. Pinheiro, D. Bates, S. DebRoy, D. Sarkar, R Core Team, *Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3* (2019) 1-140.
- [32] J.P. Njoloma, M. Oota, Y. Saeki, S. Akao, Detection of gfp expression from gfp-labelled bacteria spot inoculated onto sugarcane tissues, *Afr. J. Biotechnol.* 4 (2005) 1372-1377.
- [33] V.N. Agisha, S.J. Eapen, R.S. Bhai, A. Kumar, Detecting and monitoring endophytic colonization by *Pseudomonas putida* BP25 in black pepper (*Piper nigrum* L.) using quantitative real-time PCR, *J. Spices Aromatic Crop*, 26 (2017) 1-7.

- [34] C. Yang, D.E. Crowley, J.A. Menge, 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots, *FEMS Microbiol. Ecol.* 35 (2001) 129-136.
- [35] J.A.L. García, A. Probanza, B. Ramos, M.R. Palomino, F.J.G. Mañero, Effect of inoculation of *Bacillus licheniformis* on tomato and pepper, *Agronomie* 24 (2004) 169–176.
- [36] S. Bartolini, G.P. Carrozza, G. Scalabrelli, A. Toffanin, Effectiveness of *Azospirillum brasilense* Sp245 on young plants of *Vitis vinifera* L., *Open Life Sci.* 12 (2017) 365–372.
- [37] H. Rho, V.V. Epps, N. Wegley, S.L. Doty, S-H Kim, Salicaceae endophytes modulate stomatal behavior and increase water use efficiency in rice, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 188.
- [38] R. Emerson, Chlorophyll content and rate of photosynthesis, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 15 (1929) 281-284.
- [39] L. Taiz, E. Zeiger Tradução: SANTARÉM, E. R. [et al.]. *Fisiologia Vegetal*, 6ª ed. Porto Alegre: Artmed. 2017.
- [40] B.Y. Samaniego-Gómez, R. Garruña, J.M. Tun-Suárez, J. Kantun-Can, A. Reyes-Ramírez, L. Cervantes-Díaz, *Bacillus* spp. inoculation improves photosystem II efficiency and enhances photosynthesis in pepper plants, *Chil. J. Agric. Res.* 76 (2016) 409-416.
- [41] K. Seema, K. Mehta, N. Singh, Studies on the effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on growth, physiological parameters, yield and fruit quality of strawberry cv. Chandler, *J. Pharmacogn. Phytochem.* 7 (2018) 383-387.
- [42] A.S. Melo, C.D. Silva Júnior, P.D. Fernandes, L.F. M.E.B. Sobral, Brito, J.D.M. Dantas, Alterações das características fisiológicas da bananeira sob condições de fertirrigação, *Ciênc. Rural*, 39 (2009) 733-741, 2009.

- [43] G. Segarra, E. Casanova, D. Bellido, M.A. Odena, E. Oliveira, I. Trillas, Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34, *Proteomics* 7 (2007) 3943–3952.
- [44] K.I. Shimazaki, M. Doi, S. M. Assmann, T. Kinoshita, Light regulation of stomatal movement, *Ann. Rev. Plant Biol.* 58 (2007) 219-247.
- [45] C. Xia, M.J. Christensen, X. Zhang, Z. Nan, Effect of *Epichloë gansuensis* endophyte and transgenerational effects on the water use efficiency, nutrient and biomass accumulation of *Achnatherum inebrians* under soil water deficit, *Plant Soil* 424 (2018) 555–571.
- [46] J.E. Erickson, K.E. Kenworthy, Nitrogen and light affect water use and water use efficiency of zoysiagrass genotypes differing in canopy structure, *Hortscience* 46 (2011) 643–647.
- [47] Y. Rostamikia, M. T. Kouchaksaraei, A. Asgharzadeh, A. Rahmani, The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on growth and physiological characteristics of *Corylus avellana* seedlings, *Ecopersia*. 4 (2016) 1471-1479.
- [48] K.N. Anith, S. Aswini, S. Varkey, N.V. Radhakrishnan, D.S. Nair, Root colonization by the endophytic fungus *Piriformospora indica* improves growth, yield and piperine content in black pepper (*Piper nigrum* L.), *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 14 (2018) 215–220.
- [49] L.G. Hernández-Montiel, C.J. Chiquito-Contreras, B. Murillo-Amador, L. Vidal-Hernández, E.E. Quiñones-Aguilar, R.G. Chiquito-Contreras, Efficiency of two inoculation methods of *Pseudomonas putida* on growth and yield of tomato plants, *J. Soil Sci. Plant Nut.* 17 (2017) 1003-1012.
- [50] F.C.C. Marcos, R.P.F. Iorio, A.P.D. Silveira, R.V. Ribeiro, E.C. Machado, A.M.M. Andrade Lagôa, Endophytic bacteria affect sugarcane physiology without changing plant growth, *Bragantia* 75 (2016) 1-9.

- [51] K. Zhang, Z. Liu, X. Shan, C. Li, X. Tang, M. Chi, H. Feng, Physiological properties and chlorophyll biosynthesis in a Pak-choi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis*) yellow leaf mutant, *Acta Physiol. Plant.* 39 (2017) 22. doi: 10.1007/s11738-016-2321-5.
- [52] E. Tanimoto, Regulation of root growth by plant hormones: Roles for auxin and gibberellin, *Crit. Rev. Plant Sci.* 24 (2005) 249–265.
- [53] E. Khare, N.K. Arora, Effect of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Produced by *Pseudomonas aeruginosa* in suppression of charcoal rot disease of chickpea, *Curr. Microbiol.* 61 (2010) 64–68.
- [54] A. Kumar, S. Prasad, S.K. Singh, Screening of free living rhizobacteria associated with living rhizosphere for plant growth promoting traits, *Afr. J. Agric. Res.* 9 (2014) 10941100
- [55] J.K. Vessey, Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers, *Plant Soil* 255 (2003) 571-586.
- [56] A. Sharma, B.N. Johri, A.K. Sharma, B.R. Glick, Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck), *Soil Biol. Biochem.* 35 (2003) 887–894.
- [57] Y. Zhang, X. Kang, H. Liu, Y. Liu, Y. Li, Xiumei Yu, K. Zhao, Y. Gu, K. Xu, C. Chen, Q. Chen, Endophytes isolated from ginger rhizome exhibit growth promoting potential for *Zea mays*, *Arch. Agron. Soil Sci.* (2018) DOI: 10.1080/03650340.2018.1430892.



Supplementary Fig. 1: Non-inoculated (control) and inoculated *P. nigrum* plants used in interaction study with endophytic *Pseudomonas* sp. at 90 dpi.

Supplementary Data

For parameter A, with a significant interaction between TRAT and TIME (Table 2), when comparing the baseline TRAT=Control and TIME=30, the A value increases 3.460 when changing to TRAT=Inoculated and TIME=60 ($p=0.0034$; SE=1.133), and increases 3.431 when changing to TRAT=Inoculated and TIME=90 ($p=0.0038$; SE=1.133).

For parameter gs, with no significant difference between levels of TRAT, nor interaction effect between TRAT and TIME (Table 2), the gs value increases 0.0579 when changing TIME from 30 to 60 ($p=0.0001$; SE=0.014), and decreases 0.0308 when changing TIME from 30 to 90 ($p=0.0326$; SE=0.014).

For parameter E, with no significant difference between levels of TRAT, nor interaction effect between TRAT and TIME (Table 2), the A value increases 1.2789 when changing TIME from 30 to 60 ($p=0.0001$; SE=0.295), and decreases 0.8926 when changing TIME from 30 to 90 ($p=0.0037$; SE=0.295).

For parameter Ci, with no interaction effect between TRAT and TIME (Table 2), the Ci value decreases 22.433 when changing TRAT from Control to Inoculated ($p=0.0178$; SE=9.183), increases 20.700 when changing TIME from 30 to 60 ($p=0.0710$; SE=11.248), and decreases 22.800 when changing TIME from 30 to 90 ($p=0.0474$; SE=11.248).

For parameter WUE, with no interaction effect between TRAT and TIME (Table 2), the WUE value increases 0.607 when changing TRAT from Control to Inoculated ($p=0.0043$; SE=0.204), decreases 0.394 when changing TIME from 30 to 60 ($p=0.1208$; SE=0.250), and increases 0.766 when changing TIME from 30 to 90 ($p=0.0034$; SE=0.250).

For parameter A/Ci, with a significant interaction effect between TRAT and TIME, when comparing the baseline TRAT=Control and TIME=30, the A/Ci value increases 0.0164 when changing to TRAT=Inoculated and TIME=60 ($p=0.0018$; SE=0.0050), and increases 0.0222 when changing to TRAT=Inoculated and TIME=90 ($p<0.0001$; SE=0.0050).

For parameter SPAD, with a significant interaction effect between TRAT and TIME, when comparing the baseline TRAT=Control and TIME=30, the SPAD value increases 9.490 when changing to TRAT=Inoculated and TIME=60 ($p<0.0001$; SE=1.909), and increases 15.450 when changing to TRAT=Inoculated and TIME=90 ($p<0.0001$; SE=1.909).

3. IMPACTO DE *Pseudomonas* DE *Piper tuberculatum* NA DINÂMICA DO FÓSFORO DO SOLO E NO CRESCIMENTO E NA BIOMASSA DE PLANTAS DE *Piper nigrum*.

^{1,2}Angelo Cleiton da Costa Pereira, ^{1,2} Daihany Moraes Callegari, ³Paulo Canas Rodrigues, ²Cláudia Regina Batista de Souza*

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, CEP 66077-530, Brazil.

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, CEP 66075-110, Brazil.

³Departamento de Estatística, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, CEP 40.170-110, Brazil.

*Corresponding author: bsouza@ufpa.br

RESUMO

A busca pelo aumento da produção agrícola e a redução do uso de fertilizantes químicos que degradam o ambiente sempre foi um desafio para o cultivo das plantas. Nesse cenário, o uso de bactérias solubilizadoras de fosfato para mobilizar grandes reservas de P insolúvel em solos ao invés de fertilizantes fosfatados é uma alternativa ecologicamente segura e economicamente razoável para assegurar uma agricultura sustentável. Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações no crescimento e na biomassa ocorridas em plantas de pimenteira-do-reino inoculadas com bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas*, isolados Pt12 e Pt13 submetidas a diferentes fontes de fósforo no solo. Foi observado pelo modelo do efeito linear misto uma interação entre os níveis de inoculação das plantas e os tratamentos com fósforo. Os resultados mostraram diferenças significativas entre todos os níveis de inoculação das plantas para todas as variáveis estudadas (altura, diâmetro do caule, número de folhas, área foliar, área foliar específica, massa seca da parte aérea, da raiz e total), com exceção da razão raiz parte aérea (RRPA). Com relação aos tratamentos com fósforo, somente o diâmetro do caule não diferiu. Nossos resultados mostraram que as bactérias endofíticas modularam positivamente o crescimento e o acúmulo de biomassa das plantas em estudo, e possivelmente facilitou a absorção e solubilização das fontes de fósforo, em especial do fosfato natural Arad. Diante dos resultados, podemos concluir que os endófitos Pt12 e Pt13 são fortes candidatos a serem bactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPB) e bactérias solubilizadoras de fosfato (PSB), podendo ser utilizadas como biofertilizante em solos pobres em fósforo, bem como potenciais agentes de biocontrole.

Palavras-chave: Solubilização de fosfato. Interação Planta-Endófito. Biofertilização.

ABSTRACT

The search for increased agricultural production and the reduction of the use of chemical fertilizers that degrade the environment has always been a challenge for the cultivation of plants. In this scenario, the use of phosphate solubilizing bacteria to mobilize large P reserves insoluble in soils rather than phosphate fertilizers is an environmentally safe and economically reasonable alternative to ensure sustainable agriculture. Therefore, the objective of this work was to evaluate the growth and biomass changes occurring in black pepper plants inoculated with *Pseudomonas*, Pt12 and Pt13 isolated endophytic bacteria submitted to different sources of phosphorus in the soil. It was observed by the mixed linear effect model an interaction between the levels of inoculation of the plants and the treatments with phosphorus. The results showed significant differences among all the inoculation levels of the plants for all studied variables (height, stem diameter, number of leaves, leaf area, specific leaf area, dry mass of shoot, root and total), with the exception of of the root shoot ratio (RRPA). Regarding the treatments with phosphorus, only the diameter of the stem did not differ. Our results showed that endophytic bacteria positively modulated the growth and biomass accumulation of the plants under study, and possibly facilitated the absorption and solubilization of phosphorus sources, especially the natural phosphate Arad. In view of the results, we can conclude that endophytes Pt12 and Pt13 are strong candidates to be plant growth promoting bacteria (PGPB) and phosphate solubilizing bacteria (PSB), and can be used as biofertilizer in soils poor in phosphorus, as well as potency agents of biocontrol in black pepper plants.

Keywords: Phosphate solubilization. Plant-Endophyte Interaction. biofertilizer.

3.1 Introdução

A pimenta-do-reino é uma das principais especiarias produzidas do mundo, possuindo um alto valor econômico (MALIK; GEORGE, 2018). O Brasil está entre os maiores produtores de pimenta-do-reino, sendo o Pará o maior produtor nacional. Em 2016, a produção de pimenta-do-reino foi 54.426 t, destacando-se o Estado Pará como maior produtor nacional, responsável por aproximadamente 66% dessa produção (IBGE, 2017). Visto sua importância para a economia mundial, nota-se que esta é cultivada em diferentes tipos de solo com pH e fertilidade variados, necessitando então, além de outros fatores, do fornecimento de nutrientes para que se tenha as condições ideais para seu cultivo. O nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e micronutrientes são importantes para que se obtenha uma boa produção, e sua influência depende de suas proporções no solo e na planta (SRINIVASAN et al., 2007).

Dentre os nutrientes essenciais para os vegetais, o fósforo (P) se destaca por seu papel determinante no crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo o segundo maior elemento químico consumido na escala agrícola mundial (HAMEEDA, et al., 2008; CARDINALE et al., 2019). Este exerce importante papel na transferência de energia da célula, na respiração e na fotossíntese, além de ser também um componente estrutural dos ácidos nucléicos (DNA e RNA), genes, cromossomos, assim como de coenzimas, fosfoproteínas e fosfolipídios (GRANT et al., 2001; TAIZ e ZEIGER, 2017). Está envolvido no controle de fitormônios de crescimento das plantas e é determinante na composição de amido, proteína solúvel, sacarose e glicose. Reduções de sua disponibilidade nos períodos iniciais de crescimento podem resultar em danos na maturação do vegetal, os quais podem ser irreversíveis, mesmo aumentando o suprimento de P a níveis adequados, isso demonstra que o fornecimento adequado de P é, pois, essencial desde os estádios iniciais de crescimento da planta (FAQUIN, 2005).

No entanto, o P possui uma lenta difusão e alta fixação no solo, onde sua concentração na solução do solo é geralmente baixa ($> 0,06$ ppm), o que está relacionado a rápida adsorção desse elemento nas superfícies dos colóides do solo ou então na precipitação como fosfatos de cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe) e alumínio (Al), tornando-o um fator limitante importante para a produção agrícola. A maior parte do P no solo se move até as raízes da planta por difusão, entretanto, este movimento é restrito, pois se estima que por esta via o P se mova, em média, somente 1-2 mm; desta forma, apenas o P que se encontra a esta distância das raízes fica disponível para absorção. Por esse motivo, a absorção de P pelas plantas é

proporcional à densidade das raízes, pois o incremento da área superficial da massa radicular aumenta a habilidade da planta em acessar e absorver o P do solo (EPSTEIN; BLONNM, 2006; SHEN et al., 2011; COSTA, 2014). Com isso, em solos com baixa disponibilidade de P, as culturas somente irão responder a aplicação de P após a satisfação da capacidade de fixação dos solos, justificando a necessidade de altos níveis de P aplicado na cultura.

No Brasil, a maior parte dos solos agricultáveis tem baixos teores de fósforo disponível. Para atender as exigências das plantas e suprimento adequado de fósforo há a necessidade da aplicação de adubos fosfatados (HARGER et al., 2007), sendo predominante o uso de fertilizantes minerais, que são oriundos a partir do tratamento ácido de rochas fosfáticas, tendo como exemplo o superfosfato simples (18% de P_2O_5) e triplo (44% de P_2O_5) (FONTOURA et al., 2010) que possuem alta solubilidade. Os fertilizantes fosfatados solúveis são facilmente dissolvidos no solo, liberando altas concentrações de P, levando a uma maior absorção de P e rápido crescimento das plantas, porém, essas fontes de fosfato perdem sua eficiência ao longo do tempo, uma vez que a adsorção de P ocorre na conversão para formas não lábeis, ou seja, não disponível (FORTES et al., 2018). Além disso, o elevado valor dessas fontes de P tem aumentado o interesse pelos fosfatos naturais, que custam bem menos por unidade de P do que os solúveis (RESENDE et al., 2006).

O fosfato natural é obtido através da extração da rocha fosfatada, cuja o mineral predominante é a apatita, podendo este ser usado diretamente como fonte de fósforo se a produção for em solos ácidos (SANCHEZ, 2007). Os fosfatos naturais são uma opção para o grande poder de adsorção do P no solo, que, por sua liberação gradual e progressiva, proporciona P e Ca (NOVAIS et al., 2017). Estes fosfatos podem ser de origem vulcânica (ígneas), os quais são de baixíssima solubilidade tanto em água como em ácido e, portanto, com eficiência agrônômica próxima de zero, já os de origem sedimentar têm maior substituição isomórfica em sua estrutura o que a torna mais frágil e, portanto, mais solúvel, pois possuem menor cristalização e maior reatividade no solo, sendo, por isso, denominados fosfatos naturais reativos (FONTOURA et al., 2010; POSSAMAI et al., 2014).

Dentre eles destaca-se o fosfato de ARAD, que é oriundo de Israel, possuindo aproximadamente 33% de P_2O_5 . Este vem demonstrando uma eficiência agrônômica crescente após o segundo ano de aplicação de fertilizantes, confirmando suas características de disponibilidade gradual de P no solo, podendo, após muitos anos de safra, ter efeitos similares aos dos fosfatos solúveis (FOLONI et al., 2016). Contudo, o uso dos fosfatos na sua forma natural é muito restrito devido à sua baixa solubilidade, o que requer uma associação deste

material com outras fontes de fósforo solúvel, ou a utilização de microrganismos solubilizadores de fósforo (NOVAIS et al., 2007).

Atualmente a agricultura sustentável vem ganhando espaço e requer a utilização de estratégias que permitam o aumento da produção de alimentos sem prejuízo ao meio ambiente e a saúde (MARIANO et al., 2004; de MEDEIROS et al., 2019), dentro desse contexto, a utilização de microrganismos promotores de crescimento vegetal é uma das alternativas para promover o aumento da produção de culturas de forma sustentável. Entre esses microrganismos, encontram-se os endofíticos (LUZ et al., 2006).

O termo endófito está atribuído a microrganismos (bactérias e fungos), que criam colônias nos tecidos vegetais vivos durante todo ou parte do seu ciclo de vida, no entanto, estes não causam efeitos deletérios no hospedeiro (LACAVA; SOUSA, 2016). Logo, estudos com bactérias endofíticas incluindo o gênero *Pseudomonas*, que são capazes de minimizar as perdas nas atividades agrícolas são necessários, pois já é amplamente conhecido na literatura que bactérias envolvidas na promoção do crescimento de plantas (PGPB) de várias espécies, auxiliam as plantas na nutrição mineral, no aumento da tolerância ao estresse biótico e abiótico, muitas vezes capazes de provocar mudanças fisiológicas e bioquímicas drásticas que modulam o crescimento e o desenvolvimento da planta, como desenvolvimento radicular e foliar, bem como a supressão de doenças transmitidas pelo solo (GAMALERO, GLICK 2011; SANTORO et al. 2015). Com relação aos principais mecanismos bacterianos envolvidos nessa interação, estão incluídos a fixação de nitrogênio, produção de sideróforos, sequestro de ferro, solubilização de fosfato, síntese de fitormônios, modulação dos níveis de etileno na planta e controle de microrganismos fitopatogênicos, podendo desencadear resistência sistêmica induzida (IRS) (GAMALERO; GLICK, 2011; MERCADO-BLANCO; LUGTENBERG, 2014; AHEMAD; KIBRET, 2014; AGISHA et al., 2017)

As bactérias solubilizadoras de fosfato (PSB) ocorrem naturalmente, podendo solubilizar o P insolúvel e torna-lo em forma solúvel na solução do solo, onde pode ser absorvida pelas raízes das plantas (GOLDSTEIN, 1995; DEUBEL et al., 2000). Em geral, PSB hidrolisam formas orgânicas para as formas inorgânicas (PO_4), em decorrência da ação de enzimas hidrolíticas (principalmente fosfatases ácidas), sendo assim possível sua disponibilização para as plantas (GYANESHWAR et al., 2002; BARROSO; NAHAS, 2005; SANTORO et al. 2015). A aplicação do PSB aos solos pode substituir ou reduzir parcialmente o uso de fertilizantes inorgânicos de P, melhorando sua absorção e baixando o custo da produção, tornando-se altamente eficiente e sustentável para conservar os recursos P, bem como, prevenir a poluição causada por esse elemento (MATSUSHITA et al., 2002; RAJ

et al., 2006; RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999). O PSB tem sido tradicionalmente associado à quelação, permuta iônica e à produção de ácidos orgânicos tais como ácido glucônico, ceto-glucônico e ácido láctico (DEUBEL et al., 2000; VAZQUEZ et al., 2000; WHITELAW, 2000)

Trabalhos realizados por Nascimento et al. (2015) isolaram bactérias endofíticas associadas as raízes de *Piper tuberculatum* Jacq, onde demonstraram ser eficientes no controle do fungo *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, causador da fusariose, que ataca plantas de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.), reduzindo grandes áreas de cultivo e, conseqüentemente a produção da pimenta-do-reino. Entre os isolados, foi identificada a bactéria *Pseudomonas* sp., isolado Pt13 e a *Pseudomonas putida*, isolado Pt12 (Sequências do gene 16S rRNA registradas com o Acesso JF900612 e JF900611 no GenBank, respectivamente), que apresentou habilidade em inibir o crescimento *in vitro* deste fungo em 55.31% e 38.96%, respectivamente (ALBUQUERQUE et al. 2001; NASCIMENTO et al., 2015).

Levando em consideração a versatilidade das *Pseudomonas*, amplamente discutido na literatura, em atuar tanto contra infecções de fitopatógenos de forma direta e indireta, quanto em facilitar a absorção de nutrientes por meio da promoção de crescimento, em especial do sistema radicular, bem como atuar como solubilizadoras de fósforo retido no solo, este trabalho buscou avaliar o crescimento e a produção de biomassa das plantas de pimenteira-do-reino inoculadas com bactérias endofíticas *Pseudomonas* isoladas de *P. tuberculatum* Pt12 e Pt13 associadas com diferentes fontes de fósforo.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1 Local do experimento

A condução do experimento foi realizada em casa de vegetação pertencente ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) (01°28'03"S, 48°29'18"W) e no Laboratório de Biologia molecular pertencente ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA) (01°28'23.43"S, 48°27'27.81"W), ambos localizados em Belém-Pará.

3.2.2 Produção das mudas

As mudas de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L) utilizadas no experimento foram provenientes de sementes colhidas de matrizes sadias de cultivares Kottanadan, vindas do município de Capitão poço - PA, Sitio São José, distante cerca de 201 km de Belém - PA.

As sementes foram despulpadas e assepsiadas, submersas por um minuto em álcool 70% depois por um minuto em hipoclorito de sódio 2%, sendo lavadas cinco vezes com água destilada, em seguida foram semeadas em bandejas plásticas contendo areia estéril. Após a germinação das sementes, as plântulas foram transplantadas para recipientes plástico de 350 ml/v contendo como substrato latossolo amarelo, textura média (estéril), previamente seca e peneirada, feita correção por calagem e solução nutritiva de acordo com a recomendação para a cultura (EMBRAPA, 2004), onde ficaram em casa de vegetação com a temperatura variando de 26-30°C e 65-85% de umidade relativa do ar durante 5 meses. As plantas foram irrigadas diariamente para mantê-las próximo da capacidade de campo, sendo efetuada a pesagem do conjunto vaso/planta periodicamente, para reposição da água evapotranspirada.

3.2.3 Tratamentos e condução das plantas

As mudas de cinco meses foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 3 kg, utilizando latossolo amarelo (pH 5,3; matéria orgânica 13,52 g kg⁻¹; P 2 mg dm⁻³; N 0,56 g kg⁻¹; K 92 mg dm⁻³; Ca 2,3 cmolc dm⁻³; Ca+Mg 3,7 cmolc dm⁻³; Na 6 mg dm⁻³; H+Al 0,05 cmolc dm⁻³; v% 68,67, m% 0,50) autoclavado a 125 °C por 40 min. Foram testadas quatro condições de P no solo: sem adição de P (controle), adição de fosfato natural (Arad: 33% de P₂O₅), Super Fosfato Simples (SSP: 18% de P₂O₅) e Super Fosfato Triplo (STP: 45% de P₂O₅) e a quantidade foi baseada na recomendação de adubação da cultura para o estado do Pará (0,94 g P₂O₅ 3 kg⁻¹ de solo) (OLIVEIRA e NAKAYAMA, 2009), os demais nutrientes foram suplementados no solo mediante solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) sem o P. As inoculações com os isolados Pt12 e Pt13 foram feitas próximo às raízes da planta, as mesmas foram realizadas por rega com 100 ml de suspensão bacteriana previamente quantificada em espectrofotômetro ajustado para uma densidade óptica de 600 nm e absorvância de 0,1, correspondendo a aproximadamente 10⁸ UFC ml⁻¹, em intervalos de 10 em 10 dias por quatro meses; os grupos não inoculados foram regados com água destilada estéril pelo mesmo tempo.

3.2.4 Cultivo dos microrganismos

As *Pseudomonas*, isolado Pt12 e Pt13 provenientes do tecido de raízes de *Piper tuberculatum*, sequência do gene 16S rRNA registrada no GenBank com os Acessos JF900611 e JF900612 respectivamente, foi cultivado em placa de Petri contendo meio TSA (Tryptona de soja com ágar, da HIMEDIA), onde cresceu por 12h a uma temperatura de 28° C. Em seguida uma alíquota desse material foi usada para ser cultivado em 150 ml do meio TS no shake com rotação de 1.8 rpm a 28° C durante 12h (NASCIMENTO et al. 2015). A suspensão bacteriana foi ajustada para uma $OD_{600} = 0,1$, utilizando o espectrofotômetro, correspondendo a uma densidade celular de aproximadamente 10^8 UFC.

3.2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental adotado foi inteiramente casualizado, em fatorial 3 x 4 x 5, assim especificados: três níveis de inoculação (inoculado com Pt12, Inoculado com Pt13 e não inoculadas); quatro tratamentos, sendo três com fontes diferentes de fósforo (Arad, SSP, TSP) e uma sem adição de fósforo, com 5 repetições por tratamento, totalizando 60 unidades experimentais, sendo que cada unidade experimental consistiu de uma planta por vaso e foram avaliadas com 120 dpi (dia pós inoculação).

3.2.6 Características de crescimento

As medições relacionadas ao crescimento foram efetuadas aos 120 dpi, com a altura (H) de planta, sendo medida com o uso de uma trena, a partir da superfície do solo até ao ápice da planta (cm). O diâmetro do caule (DC) foi realizado em três pontos da planta (base, região mediana e ápice da planta) e tirado a média, usando um paquímetro digital (mm). Os números de folhas (NF) foram obtidos pela contagem. A área foliar (AF) foi determinada pelo escaneamento das folhas utilizando o equipamento LI-3100C Area Meter (cm²). A área foliar específica (AFE) foi determinada pela razão entre a área foliar e massa seca da foliar (cm².g⁻¹). Para a determinação da biomassa, as plantas foram removidas e separadas em parte aérea (caule, folha) e raiz e colocado em uma estufa de ventilação forçada a 65 ° C para se obter uma massa constante. Cada parte da planta foi pesada em uma balança analítica para determinar a massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de raízes (MSR), e massa seca

total (MST) determinado pela soma de MSPA e MSR, bem como a razão raiz parte área (RRPA) (ANDRADE JUNIOR et al., 2015).

3.2.7 Análise estatística

Os parâmetros de crescimento e biomassa das plantas foram avaliados pelo teste tukey, utilizando o software Action Stat versão 3.3.1 (2017) e R versão 3.3.2 (2016). Além disso, o modelo linear de efeitos mistos foi usado para avaliar os efeitos dos dois fatores, níveis de inoculação e fontes de P, em cada um dos 9 parâmetros de crescimento e biomassa. Os dois fatores foram considerados os efeitos fixos e a repetição, ou seja, as amostras da planta foram usadas como o efeito aleatório. A função lme do pacote R nlme Pinheiro et al. (2019) foi usada para obter os resultados.

3.5 Resultados

Nossos resultados mostraram que as plantas inoculadas com bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* isoladas de *P. tuberculatum* (Pt12 e Pt13) em tratamentos separados, foram eficientes em modular o crescimento e a biomassa em diferentes fontes de fósforo (P) para a maioria das variáveis estudadas. Pelo modelo do efeito linear misto foi observado uma interação entre os níveis de inoculação das plantas e as fontes de P ($p \leq 0.02$), bem como houve diferenças entre os níveis de inoculação das plantas ($p < 0.0001$) para todas as variáveis estudadas, com exceção da RRPA ($p = 0,3$). O mesmo ocorreu com as fontes de P no solo, que apresentaram diferenças entre todas variáveis analisadas ($p \leq 0.01$), exceto para DC ($p = 0.47$) (Tabela 1).

Tabela 1. Modelo linear de efeito misto aplicado a dados de parâmetros de crescimento e de biomassa de plantas de *P. nigrum* com três níveis de inoculação (inoculadas com Pt12, Pt13 e controle) associados a quatro tratamento com fontes de fósforo (Sem fósforo, Arad, SSP e TSP), com os valores "p" para as hipóteses de teste de não efeitos dos níveis de inoculação (NI), de não efeitos de fontes com P (FONTE de P) e não interação entre NI e FONTE de P. Altura (H), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), área foliar (AF), área foliar específica (AFE), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca da raiz (MSR), massa seca total (MST), razão raiz parte aérea (RRPA).

Variáveis	NI	FONTE de P	NI:FONTE de P
H	<0.0001	0.0120	0.0018
DC	0.0011	0.4700	0.0234
NF	<0.0001	<0.0001	0.0017
AF	<0.0001	<0.0001	<0.0001
AFE	<0.0001	0.0002	<0.0001
MSPA	<0.0001	<0.0001	<0.0001
MSR	<0.0001	<0.0001	<0.0001
MST	<0.0001	<0.0001	<0.0001
RRPA	0.3089	<0.0001	0.0139

Fonte: Os autores

O teste de tukey foi utilizado para comparar as médias das variáveis estudadas no crescimento da *P. nigrum* dentro de cada nível de inoculação associado às fontes de fósforo separadamente (Tabela 2), bem como para comparar os níveis de inoculação das plantas dentro de cada fonte de fósforo para cada variável (Figuras 1, 2 e 3).

Nas plantas não inoculadas (controle), as aplicações de SSP e TSP foram os que melhor resultaram em incrementos nas variáveis estudadas, exceto na AFE e RRPA. O maior incremento ocorreu na variável AF com ganhos de 71,46% e 67,44% com estes tratamentos, respectivamente, em relação às plantas sem fósforo (S/P). O mesmo foi observado para variável MSPA, que teve um incremento de 69,78% e 65,25%, respectivamente comparadas com as plantas S/P. Para as variáveis MSR e MST as três fontes de P utilizadas (Arad, SSP e TSP) foram maiores que as plantas S/P (Tabela 2)

Nas plantas inoculadas com Pt12 associadas às fontes de P, somente a variável DC não apresentou diferença. Na H a não aplicação de P (S/P) foi a que apresentou maior comprimento (185,2 cm), diferindo das demais fontes. As aplicações com Arad e SSP e o tratamento S/P foram as que tiveram maiores aumentos para MSPA, MSR e MST. O TSP teve reduções quando comparados com o S/P, a maior delas ocorreu na MSR, onde teve um

declínio de 25,45%, no entanto, este mesmo tratamento teve um aumento de aproximadamente 46% na AFE quando relacionado ao S/P (Tabela 2).

Em relação às plantas inoculadas com Pt13, o TSP foi o que apresentou o pior resultado comparado com o S/P, com as maiores reduções ocorrendo nas massas secas, onde foram observadas diminuições de 32,55%, 47,71% e 37,26%, na MSPA, MSR e MST respectivamente, quando comparadas ao tratamento S/P. As variáveis H e DC não tiveram alterações com as aplicações das fontes de P (Tabela 2).

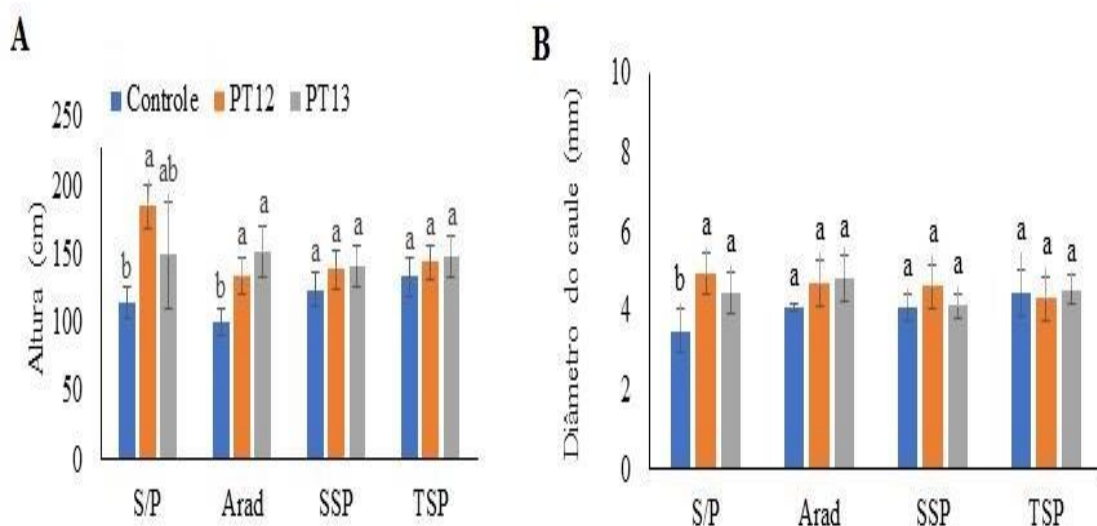
Tabela 1: Altura (H), diâmetro do caule (DC), número de folhas (NF), área foliar (AF), área foliar específica (AFE), massas seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST) e razão raiz parte aérea (RRPA) de plantas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) submetidas a três níveis de inoculação: Controle (sem inoculação), inoculado com Pt12 e inoculado com Pt13, associado a quatro fontes de fósforo no solo: sem fósforo (S□P), Arad, superfosfato simples (SSP) e superfosfato triplo (TSP). Diferentes letras indicam diferença significativa em relação ao teste de tukey (P<0.05) entre as fontes de fósforo testadas dentro de cada nível de inoculação. Os valores descritos correspondem as médias e desvios-padrão de cinco repetições (n=5).

Níveis de inoculação	Fonte de P	H	DC	NF	AF	AFE	MSPA	MSR	MST	RRPA
		Cm	Mm	Unid	cm ²	cm ² g ⁻¹	g planta ⁻¹			
Controle	S/P	115,4 ± 11,19ab	3,51 ± 0,54b	26,80 ± 2,28c	829,49 ± 96,00b	78,71 ± 1,53a	14,56 ± 1,42b	5,18 ± 0,61c	19,74 ± 1,25c	0,36 ± 0,07a
	Arad	101,0 ± 10,07b	4,09 ± 0,12ab	29,60 ± 2,19bc	996,98 ± 58,74b	72,39 ± 5,96ab	17,88 ± 1,77b	6,70 ± 0,67b	24,58 ± 1,66b	0,38 ± 0,06a
	SSP	124,2 ± 11,97a	4,10 ± 0,35ab	37,40 ± 4,39a	1422,27 ± 130,20a	68,82 ± 3,31b	24,72 ± 2,37a	7,76 ± 0,77ab	32,48 ± 1,82a	0,32 ± 0,06a
	TSP	133,8 ± 13,81a	4,47 ± 0,58a	35,40 ± 5,59ab	1388,90 ± 104,56a	69,88 ± 8,15ab	24,06 ± 2,40a	8,42 ± 0,84a	32,48 ± 3,22a	0,35 ± 0,01a
PT12	S/P	185,2 ± 16,07a	4,94 ± 0,54a	36,80 ± 4,02ab	1268,51 ± 371,60c	58,48 ± 10,70b	25,44 ± 2,53b	10,66 ± 1,02ab	36,10 ± 3,03a	0,42 ± 0,05a
	Arad	134,2 ± 13,55b	4,69 ± 0,58a	38,00 ± 3,81ab	1711,54 ± 188,97ab	66,07 ± 4,91b	29,95 ± 2,85ab	10,97 ± 0,96a	40,92 ± 3,61a	0,37 ± 0,02a
	SSP	139,2 ± 13,81b	4,61 ± 0,57a	45,20 ± 6,57a	1887,10 ± 141,22a	70,64 ± 5,43b	30,86 ± 3,07a	9,13 ± 0,75ab	40,00 ± 3,67a	0,30 ± 0,02b
	TSP	144,2 ± 13,10b	4,31 ± 0,58a	34,20 ± 4,49b	1404,64 ± 126,75ab	85,62 ± 5,42a	20,42 ± 1,25c	8,16 ± 0,62c	28,58 ± 1,52b	0,40 ± 0,03a
PT13	S/P	149,4 ± 38,06a	4,48 ± 0,51a	39,20 ± 4,15a	1394,88 ± 184,55a	60,12 ± 2,16a	27,17 ± 2,72a	12,24 ± 1,21a	39,41 ± 3,86a	0,45 ± 0,02a
	Arad	151,8 ± 17,92a	4,83 ± 0,60a	40,00 ± 4,06a	1340,28 ± 80,31a	54,38 ± 2,37b	28,70 ± 2,11a	10,47 ± 1,00b	39,17 ± 3,11a	0,36 ± 0,01b
	SSP	142,2 ± 14,96a	4,14 ± 0,31a	42,80 ± 4,97a	1557,20 ± 143,49a	62,04 ± 2,92a	29,17 ± 2,89a	8,21 ± 0,81c	37,38 ± 3,60a	0,28 ± 0,01c
	TSP	148,6 ± 15,58a	4,53 ± 0,37a	30,40 ± 2,97b	920,28 ± 63,93b	64,59 ± 3,88a	18,33 ± 1,78b	6,40 ± 0,60d	24,73 ± 1,56b	0,35 ± 0,06b

Fonte: Os autores.

Ao comparar os níveis de inoculação em cada fonte de fósforo para cada variável, foram observadas alterações em todas elas. Na H, o maior aumento ocorreu com a Pt12 no tratamento S/P (60,49%) comparado com o controle (Figura 1A), sem diferir das plantas inoculadas com a Pt13. Com a aplicação do ARAD também houve aumentos com a Pt12 e a Pt13 em relação ao controle, sendo o de maior incremento o tratamento com a Pt13 (50,30%). As aplicações de SSP e TSP não diferiram na variável H. No DC o menor resultado foi nas plantas controle + S/P, as demais não diferiram (Figura 1B).

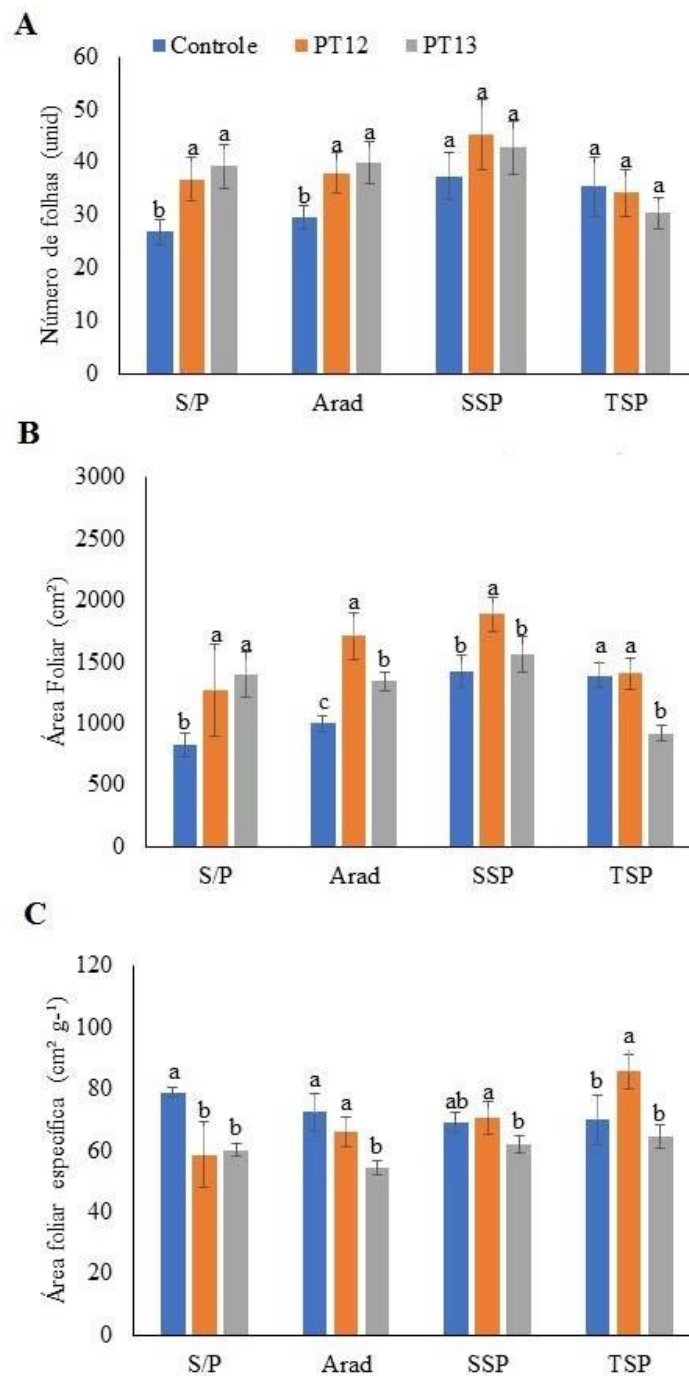
Figura 5: Altura (A) e diâmetro do caule (B) de plantas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) submetidas a três níveis de inoculação: Controle (sem inoculação), inoculado com Pt12 e inoculado com Pt13, associado a quatro fontes de fósforo no solo: sem fósforo (S/P), Arad, superfosfato simples (SSP) e superfosfato triplo (TSP). Diferentes letras indicam diferença significativa em relação ao teste de tukey ($P < 0.05$) para os níveis de inoculação das plantas dentro de cada fonte de fósforo e para cada variável. Colunas representam os valores médios de cinco repetições ($n=5$) e as barras representam os desvios-padrão.



Fonte: Os autores.

No NF a interação entre as fontes de P e os níveis de inoculação promoveu aumentos nos tratamentos S/P e ARAD com a Pt12 e a Pt13 em relação ao controle, com os maiores incrementos ocorrendo nas plantas associadas com Pt13+S/P (46,27%) e com Pt13+Arad (35,14%) (Figura 2A). Na AF a Pt12 se destacou em todos os tratamentos com o P, com o maior aumento ocorrendo com a fonte Arad (71,67%) seguido por S/P (52,93%) em comparação a condição controle (Figura 2B). Na AFE as plantas controle apresentaram os maiores valores com a aplicação das fontes com P, com exceção da fonte TSP, onde a Pt12 foi maior, apresentando um aumento de 22,52% comparado com o controle (Figura 2C).

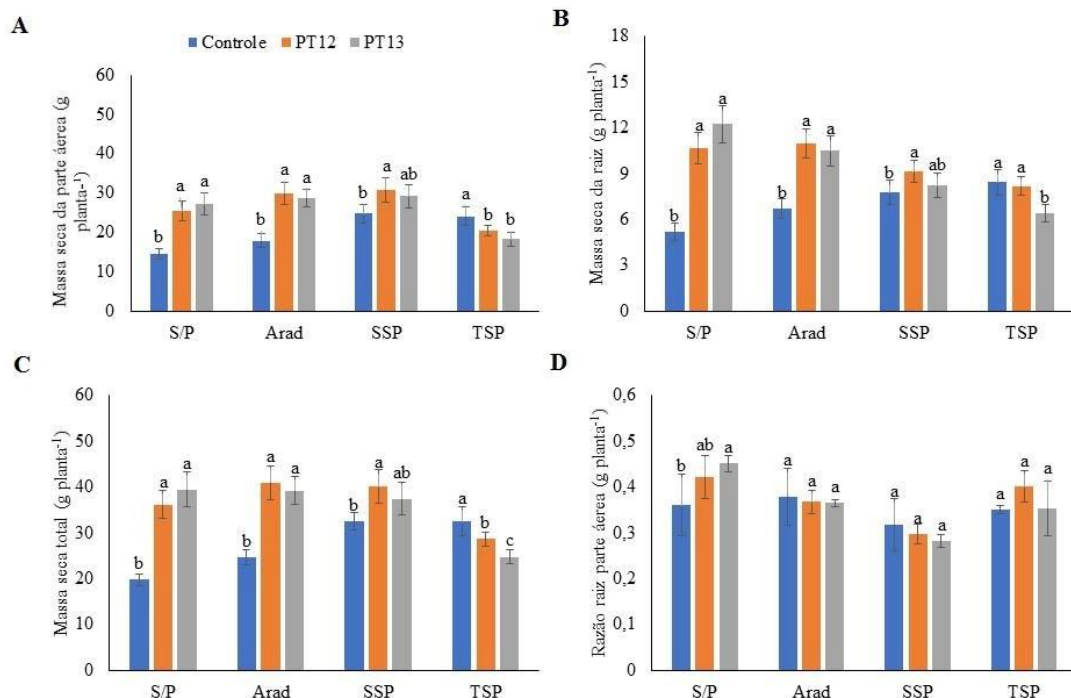
Figura 6: Número de folhas (A), área foliar (B), área foliar específica (C) de plantas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) submetidas a três níveis de inoculação: Controle (sem inoculação), inoculado com Pt12 e inoculado com Pt13, associado a quatro fontes de fósforo no solo: sem fósforo (S/P), Arad, superfosfato simples (SSP) e superfosfato triplo (TSP). Diferentes letras indicam diferença significativa em relação ao teste de tukey ($P < 0.05$) para os níveis de inoculação das plantas dentro de cada fonte de fósforo e para cada variável. Colunas representam os valores médios de cinco repetições ($n=5$) e as barras representam os desvios-padrão.



Fonte: Os autores.

Com relação às massas secas a interação também promoveu mudanças nas condições estudadas. A MSPA teve maior incremento com o tratamento Pt12+S/P (86,63%) em relação ao controle+S/P (figura 3A). No tratamento controle+TSP foi observado maior incremento na MSPA em comparação aos tratamentos Pt12 e Pt13 com essa mesma fonte. O mesmo ocorreu com a MSR (figura 3B) e MST para fonte TSP (Figura 3C). Na MSR o tratamento Pt13+S/P teve um incremento de 140% comparando com o controle+S/P. Já na MST foi o tratamento Pt13+Arad (99,67%) que teve maior acréscimo em relação ao controle+S/P. Na RRPA o tratamento controle+S/P apresentou o menor incremento com relação aos níveis de inoculação Pt12 e Pt13 que não diferiram em condições sem S/P.

Figura 7: Massas secas da parte aérea (A), da raiz (B) e total (C) e razão raiz parte aérea (D) de plantas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) submetidas a três níveis de inoculação: Controle (sem inoculação), inoculado com Pt12 e inoculado com Pt13, associado a quatro fontes de fósforo no solo: sem fósforo (S/P), Arad, superfosfato simples (SSP) e superfosfato triplo (TSP). Diferentes letras indicam diferença significativa em relação ao teste de tukey ($P < 0.05$) para os níveis de inoculação das plantas dentro de cada fonte de fósforo e para cada variável. Colunas representam os valores médios de cinco repetições ($n=5$) e as barras representam os desvios-padrão.



Fonte: Os autores.

3.6 Discussão

Plantas de pimenteira-do-reino (*Piper nigrum* L.) da cultivar Kottanadan de cinco meses foram tratadas com três níveis de inoculação e quatro tipos de solos diferentes com relação a fonte de fósforo. Com base neste desenho experimental um modelo linear de efeito misto foi ajustado para cada uma das variáveis de resposta separadamente, considerando os níveis de inoculação, fontes com P e a interação entre os níveis de inoculação e as fontes de P. Esta análise mostrou que as bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* de *P.Tuberculatum* (Pt12 e Pt13) e as fontes de fósforo utilizadas no solo influenciaram no crescimento e desenvolvimento das plantas. Já é amplamente conhecido que bactérias do gênero *Pseudomonas* confere proteção às plantas contra pragas, estimula o crescimento e/ou realiza biorremediação (DAVAL et al., 2011), sendo consideradas promotoras de crescimento de plantas (PGPB) (PARRAY et al., 2016).

Avaliando separadamente os níveis de inoculação associado às fontes de fósforo foi possível visualizar a influência do tipo de P que melhor resultou em incrementos para as variáveis estudadas (Tabela 2). No grupo controle (não inoculado) as fontes SSP e TSP foram as que melhores promoveram o incremento nas variáveis. Esse resultado era esperado, já que essas fontes são as que apresentam maior reatividade no solo, SSP (18% de P_2O_5) e TSP (44% de P_2O_5) (FONTOURA et al., 2010), ou seja, sua solubilização é mais rápida para a planta. Trabalhos realizados por Amanullah et al. (2010), observaram aumentos significativos na AF aplicando fosfatos solúveis (DAP e SSP) em relação ao controle (sem P). Chaves et al. (2013), observaram maior incremento na massa seca de foliar (MSF) para o tratamento TSP e para associação TSP+Itafós (Itafós é fosfato natural) em relação ao controle, também observou maior incremento na massa seca total (MST) para o tratamento TSP em relação aos fosfatos naturais (Gafsa e Itafós).

Nas plantas inoculadas apenas com bactérias endofíticas Pt12 ou Pt13 em solo sem adição de fósforo foi observado incrementos significativos para as maiorias das variáveis estudadas, não diferindo das plantas inoculadas associadas com fontes de P (Tabela 2). Esse resultado nos leva a afirmar que os dois endófitos estudados são fortes candidatos a serem bactérias promotoras de crescimento em plantas (PGPB). Este crescimento pode está relacionado a vários fatores, como melhor resposta fotossintética, devido maior teor de clorofila foliar, além do aumento da área foliar que colabora para maior captação de luz, resultando em maior ganho de biomassa da planta como um todo. Pereira et al. (2019) observou influencia positiva do isolado Pt13 nos parâmetros fisiológico de plantas de

pimenteira-do-reino (dados não publicados), o que pode ter influenciado positivamente na biomassa da planta. Resultados semelhantes relatados por Rostamikia et al. (2016) mostraram que plantas de *Corylus avellan* inoculadas com as linhagens de *Pseudomonas putida* (DSM291) e *Bacillus subtilis* (FZB24) tiveram um aumento da área foliar específica, massa seca da raiz e massa seca total, em comparação ao controle. Também foi relatado que a colonização por *Pseudomonas* aumentou a massa seca de plantas de algodão e tomate (EGAMBERDIEVA et al., 2015; HERNÁNDEZ-MONTIEL et al. 2017).

Nas plantas associadas com as bactérias endofíticas Pt12 e Pt13 os resultados foram positivos com relação à solubilização das fontes de fósforo, em especial do fosfato natural, ARAD. Esse resultado foi muito importante, pois sabendo que os fosfatos naturais tem uma baixa reatividade no solo com relação às outras fontes utilizadas, indica que os endófitos foram determinantes em solubilizar e facilitar a absorção da fonte ARAD, em especial pelo desenvolvimento radicular, que torna a área de absorção maior, como observado neste trabalho. Sabe-se que as bactérias endofíticas produzem substâncias reguladoras do crescimento e algumas delas são capazes de dissolver o fosfato. De acordo com Ponnuragan e Gopi (2006), algumas das bactérias solubilizadora de fosfato (PSBs) são capazes de produzir vitaminas para a dissolução do fosfato bicálcico e todas as estirpes de bactérias fosfáticas são capazes de solubilizar fosfato inorgânico. O aumento da biodisponibilidade de P com a inoculação de PGPB ou com uma combinação da inoculação + fósforo de rocha também foi relatado por Han e Lee (2005). Trabalhos semelhantes foram realizados por Manzoor et al. (2016), onde o efeito global de bactérias solubilizadoras de fosfato (PSBs) + fósforo de rocha (RP) quando comparando com RP aplicado sozinho em plantas de milho teve um aumento relativo no comprimento da parte aérea (21%), massa fresca da parte aérea (42%), MSPA (22%), comprimento da raiz (11%), peso fresco da raiz (59%), MSR (78%) e teor de clorofila (32%). Chaves et al. 2013, observou que inoculação com *P. fluorescens* via sementes incrementou a AIE (altura da inserção da espiga) e AP (altura da planta) quando utilizado TSP. No controle a inoculação da rizobactéria resultou em 87% de eficiência agrônômica relativa (EAR).

Quando comparamos qual foi o melhor nível de inoculação dentro de cada fonte de P para cada variável, observamos que para todos os tratamentos com P no solo as plantas inoculadas com Pt12 e Pt13 tiveram o melhor resultado, não diferindo entre si para maioria das variáveis, com exceção da área foliar, que em plantas do grupo Pt12+Arad e Pt12+SSP apresentaram a maior área foliar e área foliar específica, onde o grupo controle apresentou o maior resultado (Fig. 2), e este já era esperado, visto que, a biomassa foliar desse grupo foi

menor. Tantawy et al. (2009) também observaram os efeitos da inoculação com bactérias solubilizadoras de fosfato sobre a rizosfera de tomate, o crescimento das plantas, no processo de colonização e o rendimento. A inoculação com *Pseudomonas* sp. teve um efeito significativo positivo no teor de fósforo nas folhas de tomate. Fenta et al. (2015) trabalhando com cinco bactérias solubilizadoras de fosfato codificadas como PSB1, PSB2, PSB4, PSB5 e PSB7 foram isoladas e caracterizadas no gênero *Pseudomonas*, este trabalho mostrou que a inoculação desta PSB juntamente com a aplicação de fosfato tricálcico aumentou o rendimento da MSPA e a absorção de fósforo da planta de tomate significativamente com relação ao controle. As bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* tem grande potencial em solubilizar fosfato em ambientes agrícolas, devido ao seu potencial inato de produzir sideróforos, IAA (ácido indolacético), HCN (ácido cianídrico) e antibiose fúngica, também podendo ser usado como um potencial biofertilizante, bem como um potencial agente de biocontrole (MURNIR et al., 2019).

No tratamento com TSP o controle teve o melhor resultado para maioria das variáveis. Entretanto, vale destacar, que 30 dias antes das coletas das amostras, foi observado no grupo de plantas Pt12+TSP e Pt13+TSP problemas não identificados, que afetaram a saúde da planta, o que resultou em perdas de folhas comprometendo a morfologia e a produção de biomassa desses grupos.

3.7 Conclusão

As fontes de fósforo SSP e TPP apresentaram as melhores respostas nas variáveis estudadas em plantas de *P. nigrum* sem inoculação.

As bactérias endofíticas de *P. tuberculatum* isolados Pt12 e Pt13 promoveram o crescimento e o acúmulo de biomassa em plantas de *P. nigrum* mesmo sem adição de fósforo no solo.

Os endófitos Pt12 e Pt13 associados ao fosfato natural Arad aumentaram a eficiência da absorção e solubilização em *P.nigrum* com relação às plantas controle, o mesmo correu para fonte SSP.

Os endófitos Pt12 e Pt13 são fortes candidatos a serem PGPB e PSB, podendo ser utilizadas como biofertilizante em solos pobre em fósforo, bem como potenciais agentes de biocontrole.

REFERÊNCIAS

- AGISHA, V. N.; EAPEN, S. J.; BHAI, R. S.; KUMAR, A. Detecting and monitoring endophytic colonization by *Pseudomonas putida* BP25 in black pepper (*Piper nigrum* L.) using quantitative real-time PCR. **Journal of Spices and Aromatic Crops**, 26 (1), 1-7. 2017.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and Applications of Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Current Perspective. **Journal of King Saud University-Science**, 26, 1-20. 2014.
- ALBUQUERQUE, F. C.; DUARTE, M. L. R.; BENCHIMOL, R. L.; ENDO, T. 2001. Resistência de piperáceas nativas da Amazonia a infecção causada por *Nectria haematococca* f. sp. *piperis*. **Acta Amaz**, 31: 341-348.
- ANDRADE JUNIOR, W. V.; SANTOS FILHO, B. G.; LOBATO, A. K. S.; TAN, D. K. Y.; OLIVEIRA NETO, C. F.; PEREIRA, A. C. C.; da CUNHA, R. L. M.; da COSTA, R. C. L.; KIKUCHI, T. Y. S.; OKUMURA, R. S. Negative interference on growth and morpho-anatomical modifications in young *Parkia gigantocarpa* plants under waterlogging. **Australian journal of crop science**. 9(6): 523-531, 2015.
- AMANULLAH, A. M.; MALHI, S. S.; KHATTAK, R. A. Effects of phosphorus fertilizer source and plant density on growth and yield of maize in Northwestern Pakistan. **Journal of Plant Nutrition**, London, v. 32, n. 12, p. 2080-2093, 2009.
- BARROSO, C.B.; NAHAS, E. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. **Applied Soil Ecology**, 29: p.73-83, 2005.
- BATES, L.S; WALDREN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil**. 39, 205–207. 1973.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem**. 72, 248-254. 1976.
- CARDINALE, M.; SUAREZ, C.; STEFFENS, D.; RATERING, S.; SCHNELL, S. Effect of different soil phosphate sources on the active bacterial microbiota is greater in the endorhiza of Barley (*Hordeum vulgare* L.). **Microbial ecology**. 77, 689-700. 2019.
- CATALDO, D. A.; HAROON, S. L. E; YOUNGS, V. L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Commum Soil Science Plant Analyse**. 6, (1),71-80. 1975.
- CHAVES, D. P.; ZUCARELI, C.; OLIVEIRA JUNIOR, A. Fontes de fósforo associadas à inoculação com *Pseudomonas fluorescens* no desenvolvimento e produtividade do milho. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 57-72, jan./fev. 2013. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n1p57
- COSTA, A. R. **Nutrição Mineral de Plantas Vasculares**. Edição: Escola de Ciências e Tecnologia da Universidade de Évora. ISBN: 978-989-97060-9-5. 2014.

- DAVAL, S., LEBRETON, L., GAZENGEL, K., BOUTIN, M., GUILLERM-ERCKELBOUDT, A.Y. and SARNIGUET, A. The biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* Pf29Arp strain affects the pathogenesis-related gene expression of the take-all fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on wheat roots. *Molecular Plant Pathology*, vol. 12, no. 9, pp. 839-854. 2011. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00715.x>. PMID:21726382
- DEUBEL, A., GRANSEE, A., MERBACH, W. Transformation of organic rhizodeposits by rhizoplane bacteria and its influence on the availability of tertiary calcium phosphate. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** 163, 387–392. 2000.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry** 28, n.3, 350-356. 1956.
- EGAMBERDIEVA, D.; JABBOROVA, D.; HASHEM, A. *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. **Saudi Journal of Biological Sciences.** 22, 773–779. 2015.
- EMBRAPA. 2004. Manual Segurança e Qualidade para a Cultura da Pimenta-do-Reino Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 65 p. (Qualidade e Segurança dos Alimentos)
- EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Mineral Nutrition of Plants** – Sunderland: Sinauer Associates, 2006
- FAQUIN, V. **Nutrição Mineral de Plantas** - Lavras: UFLA / FAEPE, 2005.
- FENTA, L. Isolation and Characterization of Phosphate Solubilizing Bacteria from Tomato (*Solanum l.*) Rhizosphere and Their Effect on Growth and Phosphorus uptake of the Host Plant under Green House Experiment. *International Journal of Advanced Research.* 2017.
- FOLONI, J. S. S.; CALONEGO, J. C.; BARBOSA, A. M.; CATUCHI, T. A.; TIRITAN, C. S. Availability of Phosphorus in Soil and Straw in Successive Tropical Grasses Crop Fertilized with Different Phosphates. **Journal of Agronomy.** 15 (3): 104-113, 2016.
- FONTOURA, S. M. V.; VIEIRA, R. C. B.; BAYER, C.; ERNANI, P. R.; de MORAES, R. P. Eficiência técnica de fertilizantes fosfatados em latossolo sob plantio direto. **R. Bras. Ci. Solo.** 34: 1907-1914. 2010.
- FORTES, M. A.; de SOUSA, R. O.; GOMES, A. S.; SCHIMIDT, F.; SCIVITTARA, W. B.; FERREIRA, L. H. G. F.; TEIXEIRA, J. B. S.; VEÇOZZI, T. A. Phosphorus availability for irrigated rice cultivated under no-tillage and different phosphate sources. **Journal of agricultural Science.** 10: 276-287. 2018.
- GAMALERO, E.; GLICK, B.R. Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. In: Maheshwari, M.K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management.* **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, pp. 17–46. 2011.

GOLDSTEIN, A.H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram-negative bacteria. *Biol. Agric. Hortic.* 12, 185–193. 1995

GRANT, C.A.; FLATEN, D.N.; TOMASIEWICZ, D.J.; SHEPPARD, S.C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**. Nº 95. 2001.

GRIEVE, C.M.; GRATTAN, S.R. 1983. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. **Plant and Soil**. 70, 303-307.

GYANESHWAR, P., KUMAR, G.N., PAREKH, L.J., POOLE, P.S. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. In: Adu-Gyamfi, J.J. (Ed.), *Food Security in Nutrient-Stressed Environments: Exploiting Plants' Genetic Capabilities*. Springer, Netherlands, pp. 133–143. 2002.

HAGEMAN, R. H. G.; HUCKLESBY, D. P., 1971. Nitrate reductase from higher plants. In: *Methods in enzymology*. 17 A, 491 – 503.

HAMEEDA, B.; HARINI, G.; RUPELA, O. P.; WANI, S. P.; REDDY, G. Growth promotion of maize by phosphate – solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological research**, 162:234-242, 2008.

HAN, H. S. AND LEE, K. D. Phosphate and Potassium Solubilizing Bacteria Effect on Mineral Uptake, Soil Availability and Growth of Eggplant. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 1(2): 176-180. 2005

HARGER, N.; BRITO, O. R.; RALISCH, R.; ORTIZ, F. R.; WATANABE, T. S. Avaliação de fontes e doses de fósforo no crescimento inicial do milho. **Semina: Ciências Agrárias**. 28: 39-44. 2007.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil. California Agricultural Experiment Station, **Circular-347**, 1950.

IBGE. 2017. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de dados**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. AC em: 29 de Maio de 2017.

KAMACHI, K.; YAMAYA, T.; MAE, T.; OJIMA, K. A. Role for glutamine synthetase in remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. **Plant Physiology**. 96, 411-417. 1991.

LACAVA, P. T.; de SOUSA, C. P. Role of Endophytic Actinomycetes in Crop Protection: Plant Growth Promotion and Biological Control. **Plant Growth Promoting Actinobacteria**, 1: 147-160, 2016.

LI, B.; McKEAND, S.E.; ALLEN, H.L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **For. Sci.**, 37:613-626, 1991.

LUZ, J. S.; SILVA, R. L. O.; SILVEIRA, E. B.; CAVALCANTE, U. M. T. Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 19, n. 2, p. 128-134, 2006

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, A.S. **Avaliação do estado nutricional de plantas: princípios e aplicações**. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba. 1997.

MALIK, N.; GEORGE, J. K. Resistance genes in *Piper colubrinum*: in silico survey from leaf transcriptome and expression. studies upon challenge inoculation with *Phytophthora capsici*. **Appl Biochem Biotechnol.** 184, 987-1008.2018.

MANZOOR, M.; KALEEM ABBASI, M.; TARIQ SULTAN. Isolation of Phosphate Solubilizing Bacteria from Maize Rhizosphere and Their Potential for Rock Phosphate Solubilization–Mineralization and Plant Growth Promotion. *Geomicrobiology Journa.* 2016. <http://dx.doi.org/10.1080/01490451.2016.1146373>.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B.; ASSIS, S. M. P.; GOMES, A. M. A.; NASCIMENTO, A. R. P.; DONATO, V. M. T. S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 1, p. 89-111, 2004.

MATSUSHITA, K., TOYAMA, H., YAMADA, M., ADACHI, O. Quinoproteins: structure, function, and biotechnological applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 58, 13– 22. 2002.

de MEDEIROS, E. V.; SILVA, A. O.; DUDA, G. P.; dos SANTOS, U. J.; SOUZA JUNIOR, A. J. The combination of *Arachis pintoi* green manure and natural phosphate improves maize growth, soil microbial community structure and enzymatic activities. **Plant and Soil.** 435: 175–185, 2019.

MERCADO-BLANCO, J.; LUGTENBERG, B. J. J. Biotechnological applications of bacterial endophytes. **Current Biotechnology**, 3, 60-75. 2014.

MUNIRA, I.; BANO, A.; FAISALA, M. Impact of phosphate solubilizing bacteria on wheat (*Triticum aestivum*) in the presence of pesticides. *Braz. J. Biol.*, vol. 79, no. 1, pp.29-37. 2019.

NASCIMENTO, S. B.; LIMA, A. M.; BORGES, B. N.; SOUZA, C. R. B. Endophytic bactéria from *Piper tuberculatum* Jacq.: isolation, molecular characterization, and in vitro screening for the control of *Fusarium solani* f. sp. *piperis*, the causal agent of root rot disease in black pepper (*Piper nigrum* L.). **Genet. Mol. Res.**, 14: 7567-7577. 2015.

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. J.; NUNES, F. N. Fósforo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 471-537.

NOVAIS, S. V.; MATTIELLO, E. M.; VERGUTZ, L.; FRADE JUNIOR, E. F.; NOVAIS, R. F. Solubilization of Bayóvar Natural Phosphate Rock under the Drain Effect of Calcium and Phosphorus at Two Levels of Acidity. **Open Journal of Soil Science.** 7: 173-180. 2017.

OLIVEIRA, R. F.; NAKAYAMA, L. H. I. Pimenta-do-reino. In: CRAVO, M. S.; VIÉGAS, I. J. M.; BRASIL, E. C. (org.). **Recomendações de adubação e calagem para o estado do Pará**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2007. p. 175-179.

PARRAY, J.A., JAN, S., KAMILI, A.N., QADRI, R.A., EGAMBERDIEVA, D. and AHMAD, P. Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, vol. 35, no. 3, pp. 877-902. 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-016-9583-4>.

PINHEIRO, J.; BATES, D.; DEBROY, S.; SARKAR, D. R Core Team, *Nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3* (2019) 1-140.

PONMURUGAN, P.; GOPI, C. Distribution Pattern and Screening of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Different Food and Forage Crops. *J.Agron.* 5:600-604. 2006.

POSSAMAI, A.J.; de FREIRIA, L. B.; BARBOZA, A. C.; SILVA, I. J. L. R.; ZERVOUDAKIS, J. T. Influência da adubação fosfatada e calagem na ecofisiologia de gramíneas forrageiras. **PUBVET.** 8: Art. 1705. 2014.

arah Vieira Novais^{1*}, Edson Marcio Mattiello², Leonardus Vergutz²,
Elizio Ferreira Frade Junior¹, Roberto Ferreira Novais

PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; REAKASEM, B. E.; Herridge, D. F. Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field. Australian Centre for International Agricultural Research Canberra. 76p. 1989.

RAJ, S.N., SHETTY, H.S., REDDY, M.S. Plant growth promoting rhizobacteria: potential green alternative for plant productivity. In: Siddiqui, Z.A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization.* Springer, Netherlands, pp. 197–216. 2006.

RESENDE, A. V.; FURTINI NETO, A. E.; ALVES, V. M. C.; MUNIZ, J. A.; CURI, N.; FAQUIN, V. et al. Sources and methods of phosphorus application to maize in cultivated soil of the Cerrado region. **Rev. Bras. Ci. Solo.** 30: 453-466. 2006.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnol. Adv.** 17, 319–339. 1999.

SANCHEZ, C. A. Phosphorus. In: BARKER, A. V.; PILBEAM, D. J. (org.) **Handbook of plant nutrition.** New York: Taylor&Francis, 2007. p. 51-90.

SANTORO, M. V.; CAPPELLARI L. R.; GIORDANO W.; BANCHIO, E. Plant growth-promoting effects of native *Pseudomonas* strains on *Mentha piperita* (peppermint): an in vitro study. **Plant Biology.** 17, 1218–1226, 2015.

SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **J. Plant Nut.**, 4:289-302, 1981

SHEN, J.; YUAN, L.; ZHANG, J.; LI, H.; BAI, Z.; CHEN, X.; ZHANG, W.; ZHANG, F. Phosphorus dynamics: from soil to plant. **Plant physiology.** 156: 997-1005. 2011.

SRINIVASAN, V. ; HAMZA, S.; DINESH, R; PARTHASARATHY, V. A. Nutrient management in black pepper (*Piper Nigrum* L.). *CABI Reviews: Perspectives in Ag. Vet. Sci., Nutr., and Nat. Res.* 67p

SWIADER, J.M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F.G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **J. Plant Nut.**, 17:1687-1699, 1994

TAIZ L.; ZEIGER E. Tradução: SANTARÉM, E. R. [et al.]. **Fisiologia Vegetal**, 6ª ed. PortovAlegre: Artmed. 2017.

VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**. 22, p. 280-283. 1968.

VAZQUEZ, P., HOLGUIN, G., PUENTE, M.E., LOPEZ-CORTES, A., BASHAN, Y., Phosphatesolubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biol. Fertil. Soils** 30, 460–468. 2000.

WEATHERBURN, M. W. Phenol hipochlorite reaction for determination of ammonia. **Analytical Chemistry**. 39, 971-974. 1967.

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. **Adv. Agron.** 69, 99–151

CONCLUSÕES GERAIS

As bactérias endofíticas de *P. tuberculatum* isolados Pt12 e Pt13 promoveram o crescimento e o acúmulo de biomassa em plantas de *P. nigrum* mesmo sem adição de fósforo. E quando associados ao fosfato natural Arad, aumentam a eficiência da absorção e solubilização em *P.nigrum* com relação às plantas controle. A bactéria endofítica *Pseudomonas* sp. (Pt13) melhora as trocas gasosas em folhas e promove o crescimento das plantas de pimenteira-do-reino, podendo aumentar a tolerância das plantas aos estresses bióticos e abióticos e favorecer maiores taxas de sobrevivência no campo, contribuindo para maior produtividade e preservação do meio ambiente. Os endófitos Pt12 e Pt13 são fortes candidatos a serem PGPB e PSB, podendo se utilizadas como biofertilizante em solos pobre em fósforo, bem como potenciais agentes de biocontrole.

ANEXOS

TABELA A: Propriedades químicas e físicas do solo na profundidade de 0-20 cm

ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO									
pH	N	MO	P	K	Na	Ca	Ca+Mg	Al	H+Al
H ₂ O	%	g/kg	-----Mg/dm ³ -----			-----cmol _c /dm ³ -----			
5,1	0,29	96,16	120	263	252	0,3	4,0	0,85	5,05
MICRONUTRIENTES									
			Cu	Mn	Fe	Zn			
			-----mg/kg-----						
			3,0	14,7	195,1	13,2			
ANÁLISE GRANULOMÉTRICA									
Areia grossa		Areia fina			Silte		Argila total		
485		164			232		120		


Fonte: Embrapa Amzônia Oriental. Belém, 2018.

TABELA B: Propriedades químicas na profundidade de 0-20 cm

ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO									
pH	N	MO	P	K	Na	Ca	Ca+Mg	Al	H+Al
H ₂ O	%	g/kg	-----mg/dm ³ -----			-----cmol _c /dm ³ -----			
5,1	0,29	96,16	2	92	6	2,3	3,7	0,0	1,81

Fonte: Embrapa Amzônia Oriental. Belém, 2018.

Physiological and Molecular Plant Pathology 104 (2018) 23–30



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Physiological and Molecular Plant Pathology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pmpp



Expression profiles of defense genes in cassava storage roots upon exposure to *Phytophthium* sp., causal agent of soft root rot disease 

Aline Medeiros Lima^{a,b,c}, Elisa Ferreira Moura^d, Alessandra Keiko Nakasone Ishida^d,
Angelo Cleiton da Costa Pereira^{a,c}, Sávio Pinho dos Reis^{c,e}, Cláudia Regina Batista de Souza^{c,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, CEP 66077-530, Brazil
^b Universidade Federal Rural da Amazônia - Campus de Tomé-Açu, Tomé-Açu, PA, CEP 68680-000, Brazil
^c Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, CEP 66075-110, Brazil
^d Embrapa Amazônia Oriental, Caixa postal 48, Belém, PA, CEP 66095-903, Brazil
^e Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Marabá, PA, CEP 68503-120, Brazil

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p>Keywords: Cassava <i>Phytophthium</i> sp. Plant defense Plant-pathogen interaction Semi-quantitative RT-PCR Soft root rot disease</p>	<p>Cassava is one of the most important crops in Africa, Asia and Latin America, where millions of people depend on its starchy storage roots as their main source of energy. In Brazil, cassava is cultivated in all regions; however, soft root rot disease has hampered its production mainly in the Amazon region. The identification of <i>Phytophthium</i> sp., as the causal agent of soft root rot disease in cassava plants collected in Brazil, was recently reported. Here, our main aim was to evaluate changes in expression levels of genes possibly involved in compatible cassava-<i>Phytophthium</i> sp. interaction. Semi-quantitative RT-PCR assays were performed to evaluate the expression levels of genes coding for proteins with known functions in plant defense, such as enzymes involved in oxidative burst and the phenylpropanoid pathway, in detached cassava storage roots inoculated and non-inoculated with pathogen. Our results showed that cassava responded to pathogen infection through up-regulation of genes coding for superoxide dismutase, phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase, cysteine proteinase inhibitor and RING zinc finger protein. Furthermore, the expression pattern of the allergenic-related glutamic acid-rich protein and translationally controlled tumor protein genes in detached roots used here validated the absence of post-harvest physiological deterioration, a known endogenous disorder affecting the storage roots of cassava at 24–72 h after harvest. This is the first study of interaction between cassava and <i>Phytophthium</i> sp. at the molecular level contributing to understanding how cassava responds to pathogen infection, as well as to future strategies of molecular breeding regarding the tolerance to soft root rot disease.</p>

Figura 1 do anexo: Trabalho desenvolvido paralelamente a pesquisa de Doutorado



VII Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de
PLANTAS

SEMI-QUANTITATIVE RT-PCR ANALYSIS REVEALS CHANGES IN GENE EXPRESSION OF CASSAVA ROOTS DURING INFECTION BY *Phytophthium* sp.

Pereira, ACC¹; Lima, AM^{1,2,3}; Moura, EF⁴; Ishidad, AKN⁴; Reis, SP^{3,5}; de Souza, CRB³

¹Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, PA, Brazil.
²Universidade Federal Rural da Amazônia - Campus de Tomé-Açu, Tomé-Açu, PA, Brazil.
³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, PA, Brazil.
⁴Embrapa Amazônia Oriental, Caixa postal 48, Belém, PA, Brazil
⁵Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará, Marabá, PA, Brazil.

bsouza@ufpa.br

Key words: *Manihot esculenta* Crantz, Plant defense, Plant-pathogen interaction, Root rot disease.

Figura 2 do anexo: Trabalho desenvolvido paralelamente a pesquisa de Doutorado

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the crops more cultivated in the world; however, several stresses related to biotic factors, such as the root rot disease, have affected its production. This disease may be caused by many pathogens, including the recently reported *Phytophthium* sp. Thus, the objective of this work was to evaluate changes in the expression levels of genes possibly involved in the response of susceptible cassava to infection by *Phytophthium* sp. Detached storage roots of cassava (accession CPATU 359) were inoculated with pathogen and collected 24, 48 and 72 hours after inoculation. As negative control, we used detached roots non-inoculated. For gene expression analysis, samples of total RNA were extracted from roots and semi-quantitative RT-PCR assays were performed. Our results showed that cassava responded to *Phytophthium* sp. infection through up-regulation of genes coding for superoxide dismutase, phenylalanine ammonia-lyase, chalcone synthase, cysteine proteinase inhibitor, bZIP transcription factor and RING zinc finger protein. In addition, our results showed the expression pattern of the allergenic-related glutamic acid-rich protein and translationally controlled tumor protein genes in detached roots (inoculated and non-inoculated) validated the absence of post-harvest physiological deterioration (PPD), a known endogenous disorder affecting the storage roots of cassava at 24–72 hours after harvest. Since many effects observed in cassava roots with PPD are similar to those caused by pathogen infection, this molecular validation was very useful to exclude the PPD and confirm the symptoms of root rot disease in detached roots inoculated with *Phytophthium* sp. This molecular study of interaction between cassava and *Phytophthium* sp. contributes to understanding how cassava responds to pathogen infection, as well as to future strategies of molecular breeding regarding the tolerance to root rot disease.

Supported by CNPq, CAPES and FAPESPA.

24/06/2019

Gmail - Fwd: Your manuscript YPMPP_2019_17_R2 has been accepted



Angelo Cleiton <angelobio13@gmail.com>

Fwd: Your manuscript YPMPP_2019_17_R2 has been accepted

2 mensagens

Claudia Souza <claudiarbdesouza2016@gmail.com>
 Para: Angelo Cleiton <angelobio13@gmail.com>

23 de junho de 2019 21:31

----- Forwarded message -----

From: Claudia Regina Batista de Souza <bsouza@ufpa.br>
 Date: dom, 23 de jun de 2019 21:29
 Subject: Fwd: Your manuscript YPMPP_2019_17_R2 has been accepted
 To: Claudia Souza <claudiarbdesouza2016@gmail.com>

----- Mensagem original -----

Assunto: Your manuscript YPMPP_2019_17_R2 has been accepted
Data: 2019-06-23 18:45
De: "Brad Day (Physiological and Molecular Plant Pathology)" <Evisesupport@elsevier.com>
Para: bsouza@ufpa.br
Responder para: bday@msu.edu

Ref: YPMPP_2019_17_R2

Title: An endophytic *Pseudomonas* sp. of *Piper tuberculatum* promotes growth on *Piper nigrum* through increase of root biomass production
 Journal: Physiological and Molecular Plant Pathology

Dear Professor. Batista de Souza,

I am pleased to inform you that your paper has been accepted for publication. My own comments as well as any reviewer comments are appended to the end of this letter.

Your accepted manuscript will now be transferred to our production department. We will create a proof which you will be asked to check. You can read more about this [here](#). Meanwhile, you will be asked to complete a number of online forms required for publication. If we need additional information from you during the production process, we will contact.

Thank you for submitting your work to Physiological and Molecular Plant Pathology. We hope you consider us again for future submissions.

Kind regards,

Brad Day
 Editor-in-Chief
 Physiological and Molecular Plant Pathology

Comments from the editors and reviewers:

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

 Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

<https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=919480ef1c&view=pt&search=all&permthid=thread-f%3A1637179754484702827&siml=msg-f%3A16371797...> 1/2

Figura 3 do anexo: E-mail informando o aceite do artigo intitulado “An endophytic *Pseudomonas* sp. of *Piper tuberculatum* promotes growth on *Piper nigrum* through increase of root biomass production”