



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS
VEGETAIS

FRANCIELE PALUDO

**Co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal *Azospirillum
brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho (*Zea mays* L.)**

FLORIANÓPOLIS

2020

Franciele Paludo

Co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho (*Zea mays* L.)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.
Orientador: Prof. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Paludo, Franciele
Co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento
vegetal *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum*
seropedicae em plantas de milho (*Zea mays* L.) / Franciele
Paludo ; orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi ,
2020.
118 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,
2020.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Consórcio de
bactérias. 3. Inoculação foliar. 4. Agricultura
sustentável. I. Arisi , Ana Carolina Maisonnave . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Franciele Paludo

Co-inoculação de bactérias promotoras de crescimento vegetal *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em plantas de milho (*Zea mays* L.)

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Admir José Giachini
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Arcângelo Loss
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências, área de concentração em Recursos Genéticos Vegetais.

Prof. Dr. Claudio Roberto Fonseca Sousa Soares
Coordenador do Programa

Profª. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi
Orientadora

Florianópolis, 03 de dezembro de 2020.

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Lucimara Rossatto Paludo e Gilisberto Luiz Paludo, por possibilitarem e apoiarem a realização de mais este sonho.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me dar força, garra, discernimento, me guiar, manter viva a esperança em mim, estar ao meu lado sempre e me abençoar com tanto.

Aos meus pais, Lucimara Rossatto Paludo e Gilisberto Luiz Paludo, por dedicarem as suas vidas a mim, por me guiarem até aqui, serem meu suporte, me motivarem, por serem meus maiores incentivadores, por desenvolver esse amor pelo conhecimento dentro de mim, me amarem e pela compreensão nos vários momentos de ausência. Meus maiores exemplos de vida. Amo vocês!

Ao meu namorado, companheiro e amigo Marcos Estevan Kraemer de Moura, que tanto fez por mim nesse momento, me deu suporte, tem sempre um conselho, um carinho, uma palavra certa que acalenta o coração. Obrigada por sempre ser compreensivo, incentivador e por me fazer dar minhas melhores gargalhadas, é sempre um prazer compartilhar a vida contigo.

Á minha orientadora Ana Carolina Maisonnave Arisi pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa, me aceitar para estágio curricular, pela orientação e ensinamentos que foram de grande valia.

Aos professores da banca, Cláudio R. F. S. Soares, Arcângelo Loss e Admir J. Giachini, pelos valiosos apontamentos e conhecimentos transmitidos. Em especial ao professor Cláudio que sempre esteve disponível para ajudar, sanar dúvidas, disponibilizou seus orientados para me auxiliar e cedeu o espaço e equipamentos do laboratório para avaliação de nitrogênio total e a casa de vegetação para a condução do experimento. Ao professor Arcângelo pela disponibilidade em ajudar e disponibilizar seu orientado para auxiliar na coleta do solo. Ao professor José Afonso Voltolini pelas conversas edificantes, sempre disponível e pelo empréstimo do equipamento SPAD.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular que foram essenciais para o meu crescimento profissional e pessoal, pelos momentos de descontração, pelo auxílio principalmente no primeiro experimento conduzido, Ana Marina, Anita, Gabriela, Karina, Lorena, Lucia, Mirella, Nicole e Tuany. Agradeço em especial o Leonardo Wolff de Oliveira que tanto me ajudou, pela amizade, suporte nos momentos aonde o cansaço me vencia. Á Elisandra Triches da Cunha que me ensinou todas as técnicas, sempre esteve disponível com paciência e dedicação para me explicar e que carinhosamente me deu suporte em conhecimento.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos pela oportunidade de estar realizando um sonho, pelo convívio com profissionais de excelência e por todo o conhecimento adquirido ao longo desses anos.

Ao CNPq por fomentar e proporcionar todos os recursos necessários para a realização do projeto.

Aos amigos da vida, os novos e colegas que fiz durante esta vivência, foram essenciais em cada momento, pelas risadas, apoio, carinho, conselhos, momentos que guardo no meu coração e serão lembrados sempre. Em especial gostaria de agradecer ao André, Andressa, Ednilson, Larissa, Lucas e Shantau que estavam sempre dispostos a me ajudar, seja, fazendo análise, tirando dúvidas, facilitando o desenvolver do projeto, doando ou coletando solo. Aos amigos da vida, gostaria de agradecer em especial à Marina Souto Ferreira por sempre estar ao meu lado, pela irmandade, pelas conversas descontraídas e edificantes que foram tão importantes e a Maria Helena Belusso que me acolheu em sua casa de uma forma tão nobre, amiga que o Rondon me trouxe e que é um ser de muita luz.

A todos os professores que tive até aqui, pois, foi com cada conhecimento, vivência, conversa que me formo, em especial a Taciane Finatto, exemplo de profissional, guardo seus conselhos e ensinamentos até hoje, foi minha incentivadora e me deu suporte. As professoras do curso técnico, o qual cursei, Manoela Alano Vieira, Eliane M. Z. Michielin que foram responsáveis pelo meu início na pesquisa, como aluna de iniciação científica e a professora Luciana Senter pelas excelentes aulas de microbiologia, que tanto me auxiliaram no mestrado. Aos profissionais da educação deixo meu agradecimento!

A todos, meus mais sinceros agradecimentos!

Devemos considerar cada partícula da biodiversidade inestimável, insubstituível, enquanto aprendemos a usá-la e a compreender o que significa para a humanidade...Não pode haver propósito mais inspirador do que iniciar uma era de restauração, recuperando a diversidade sublime da vida que ainda nos cerca.

Edward Osborne Wilson

RESUMO

A prática da aplicação foliar de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) apresenta certas vantagens frente a inoculação via semente. A combinação de diferentes microrganismos benéficos pode gerar um efeito sinérgico nas plantas inoculadas, desta forma a co-inoculação apresenta ganhos substanciais para o ecossistema, economia e a agricultura. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* sobre o crescimento e quantificação de DNA bacteriano nas plantas em solo de fertilidade natural. Um ensaio foi conduzido *in vitro* com a co-inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* nas radículas do milho (DKB 390). As coletas ocorreram aos 3, 7 e 9 dias após a inoculação. Dois ensaios foram conduzidos em casa de vegetação, com a inoculação de *A. brasilense* FP2 nas radículas do milho e de *H. seropedicae* SmR1 na parte aérea no estágio V2 da planta (DKB 390). No primeiro ensaio em casa de vegetação, nas variáveis comprimento radicular, diâmetro do colmo, comprimento e largura foliar, massa seca da raiz e parte aérea e acúmulo de nitrogênio ocorreram incrementos de 56%, 66%, 36%, 60%, 170%, 103% e 123% respectivamente, nas plantas co-inoculadas em relação ao controle. No segundo ensaio em casa de vegetação, as variáveis comprimento radicular e comprimento foliar foram maiores para as plantas controle e nas variáveis comprimento da parte aérea e diâmetro do colmo não foram observadas diferenças significativas para as plantas submetidas aos quatro tratamentos. No ensaio *in vitro* observou-se comprimento radicular e da parte aérea maior em plantas co-inoculadas. Para massa seca do tecido radicular e da parte aérea, não foram observadas diferenças significativas para as plantas submetidas aos quatro tratamentos. Os valores de UFC das bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae* em raiz no primeiro ensaio de casa de vegetação e no ensaio *in vitro* ficaram em torno de 5 log UFC g⁻¹. No primeiro ensaio em casa de vegetação, a contagem de bactérias no tecido foliar ficou abaixo do limite de detecção (LOD) e aproximadamente 6 log UFC g⁻¹ no ensaio *in vitro*. A contagem de UFC, baseada no número de cópias de DNA bacteriano quantificado por qPCR, na raiz de plantas co-inoculadas no ensaio *in vitro* denotou valores de *H. seropedicae* nas plantas próximos de 7 log UFC g⁻¹, enquanto que os valores de *A. brasilense* ficaram próximos de 5,6 log UFC g⁻¹. A quantificação bacteriana baseada no número de cópias de DNA de *H. seropedicae* em folhas ficou cerca de 7 log UFC g⁻¹. A quantificação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* no primeiro ensaio ficou abaixo do LOD nas raízes e folhas, embora um efeito positivo da co-inoculação tenha sido observado no crescimento da planta e na nutrição mineral. A quantificação de DNA bacteriano por qPCR proporcionou monitorar as bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae* em plantas co-inoculadas.

Palavras-chave: Agricultura sustentável. Consórcio de bactérias. Inoculação foliar.

ABSTRACT

The foliar application of plant-growth promotion bacteria (PGPB) has advantages over seed inoculation. The combination of different beneficial microorganisms can generate a synergistic effect on the inoculated plants, thus co-inoculation presents substantial gains for the ecosystem, economy and agriculture. This study aims to evaluate the co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* on the maize growth and bacterial DNA quantification in plants grown in natural fertility soil. An assay was conducted in vitro with the co-inoculation of *A. brasilense* and *H. seropedicae* in maize (DKB 390). The harvest occurred at 3, 7 and 9 days after inoculation. Two greenhouse experiments were carried out with the inoculation *A. brasilense* FP2 in the maize roots and *H. seropedicae* SmR1 in the aerial part inoculated in the V2 stage (DKB 390). In the first experiment, the variables root length, stem diameter, leaf length and width, dry root and shoot weight and nitrogen accumulation increased by 56%, 66%, 36%, 60%, 170%, 103% and 123% respectively, in the plants co-inoculated in relation to the control. In the second greenhouse experiment, the root length and leaf length variables were high in control plants and in shoot length and stem diameter, no significant differences were observed for the plants submitted to four treatments. Considering in vitro experiment, the root and shoot length values were higher in co-inoculated plants compared to other treatments. For root and shoot dry mass, significant differences were not observed for the plants submitted to the four treatments. The *A. brasilense* and *H. seropedicae* bacteria counting (CFU) in root was around 5 log CFU g⁻¹ in first greenhouse test and in vitro experiment. For the first greenhouse test, the bacteria count was below the detection limit (LOD) in leaf and approximately 6 log UFC g⁻¹ in leaf of in vitro plants. In co-inoculated plants of in vitro assay, the bacterial *H. seropedicae* values in the root was close to 7 log UFC g⁻¹, while the *A. brasilense* values were close to 5.6 log UFC g⁻¹. *H. seropedicae* count in leaves was about 7 log UFC g⁻¹. *A. brasilense* and *H. seropedicae* count was below the LOD in root and leaf in the first greenhouse experiment, although a positive effect of the co-inoculation has been observed on plant growth and mineral nutrition. Quantification of bacterial DNA by qPCR was used to monitor *A. brasilense* and *H. seropedicae* co-inoculated in plants.

Keywords: Sustainable agriculture. Bacteria consortium. Leaf inoculation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Representação das diferentes formas de colonização radicular pelas BPCV conforme colonização, sendo, endofítica, simbiótica, associativa e de vida livre.....	30
Figura 2 – Etapas do mecanismo de atração, fixação e formação de biofilme na planta por <i>Azospirillum</i> sp.	36
Figura 3 – Colonização de plantas por <i>H. seropedicae</i> . A associação de <i>H. seropedicae</i> (pontos vermelhos) inicia-se pela quimiotaxia da bactéria até a raiz da planta e fixação na superfície das raízes, preferencialmente na zona de pêlos radiculares (1). A maioria das bactérias permanece nas superfícies radiculares, mas algumas penetram através de algumas descontinuidades da epiderme, como a zona de alongamento (2a) e rachaduras radiculares laterais (2b), então ocorre uma ocupação rápida dos espaços intercelulares das raízes, juntamente com a colonização do aerênquima (no arroz) e do xilema (3). Algumas bactérias se movem das raízes para a parte aérea por meio do xilema (4), colonizando os brotos (5) e folhas (6), onde podem espalhar-se em espaços intercelulares e cavidades subestomais.	40
Figura 4. Curvas padrão (Cq versus log UFC) para (A) quantificação de <i>A. brasilense</i> utilizando DNA extraído de cultura pura utilizando iniciadores AzoR2.1. Quantificação realizada em três corridas independentes de qPCR em duplicata (n=6). B) quantificação de <i>H. seropedicae</i> utilizando DNA extraído de cultura pura utilizando iniciadores HERBAS1. Quantificação realizada em seis corridas independentes de qPCR em duplicata (n=12).	60
Figura 5 – Quantificação em log UFC g ⁻¹ de <i>A. brasilense</i> (Azos) em raízes de milho cultivar DKB 390, crescidas <i>in vitro</i> . Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de triplicata biológica e duplicata técnica (n=6) para tratamentos inoculados e duplicata biológica e técnica para controle (n=4). * Amplificação foi observada somente em duas replicatas.	63
Figura 6 – Quantificação em log UFC g ⁻¹ de <i>H. seropedicae</i> (Herbas) em raízes de milho cultivar DKB 390, crescidas <i>in vitro</i> . Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de triplicata biológica e duplicata técnica (n=6) para tratamentos inoculados e duplicata biológica e técnica para controle (n=4). * Amplificação foi observada somente em uma replicata.	64
Figura 7 – Quantificação em log UFC g ⁻¹ de <i>H. seropedicae</i> (Herbas) em folha de milho, cultivar DKB 390, crescidas <i>in vitro</i> . Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de triplicata biológica e duplicata técnica	

(n=6) para tratamentos inoculados e duplicata biológica e técnica para controle (n=4). * Amplificação foi observada somente em uma replicata. Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.	64
Figura 8 – Comprimento radicular e parte aérea do milho cultivar DKB 390, crescidas <i>in vitro</i> . Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.	67
Figura 9 – Massa seca radicular do milho cultivar DKB 390, crescidas <i>in vitro</i> . Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4).	68
Figura 10 – Comprimento da parte aérea e radicular do milho, cultivar DKB 390, cultivadas em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14, 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.	72
Figura 11 – Diâmetro do colmo do milho, cultivar DKB 390, cultivada em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.	73
Figura 12 – A) Largura foliar. B) Comprimento da folha do milho, cultivar DKB 390, cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.	74
Figura 13 – Massa seca da parte aérea e radicular do milho, cultivar DKB 390, cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.	75
Figura 14 – Acúmulo de nitrogênio na parte aérea do milho, cultivar DKB 390, cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.	76
Figura 15 – Comprimento radicular e da parte aérea do milho, cultivar DKB 390 cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.	78

Figura 16 – Diâmetro do colmo do milho, cultivar DKB 390, cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4)..... 79

Figura 17– A) Largura foliar. B) Comprimento da folha do milho, cultivar DKB 390, cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Co-inoculação com <i>A. brasilense</i> em diferentes culturas e com diferentes gêneros bacterianos.....	48
Tabela 2 - Análise físico-química do solo coletado em Florianópolis, em área de empréstimo. Solo caracterizado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico de textura franco arenosa.	54
Tabela 3 - Análise físico-química do solo coletado em Florianópolis, em área de empréstimo. Solo de segundo cultivo, caracterizado como Argissolo Vermelho-Amarelo de textura franco arenosa.....	54
Tabela 4 – Parâmetros de qPCR obtidos das curvas padrão para a quantificação de <i>A. brasilense</i> , utilizando iniciadores AzoR2.1 e diluição em série de DNA obtido de cultura bacteriana pura.....	60
Tabela 5 – Parâmetros de qPCR obtidos das curvas padrão para a quantificação de <i>H. seropedicae</i> , utilizando iniciadores Herbas1 e diluição em série de DNA obtido de cultura bacteriana pura.....	61
Tabela 6 – Determinação da repetibilidade do ensaio de qPCR para quantificação de <i>A. brasilense</i> , por meio da média dos valores de Cq em três corridas independentes em duplicata (n=6), utilizando os iniciadores AzoR2.1. ^a Valores são média ± DP de duplicatas de qPCR em três corridas independentes realizadas em dias diferentes. ^b Desvio Padrão. ^c Desvio Padrão da Repetibilidade. ^d Veracidade.....	61
Tabela 7 – Determinação da repetibilidade do ensaio de qPCR para quantificação de <i>H. seropedicae</i> , por meio da média dos valores de Cq obtidos em seis corridas independentes em duplicata (n=12), utilizando os iniciadores HERBAS1. ^a Valores são média ± DP de duplicatas de qPCR em seis corridas independentes realizadas em dias diferentes. ^b Desvio Padrão. ^c Desvio Padrão da Repetibilidade. ^d Veracidade.....	62
Tabela 8 – Contagem em placa de <i>A. brasilense</i> e <i>H. seropedicae</i> (log UFC g ⁻¹) das raízes e parte aérea de milho cultivar DKB 390 crescidas <i>in vitro</i> . Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam médias ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). LOD = 4,95 log UFC g ⁻¹	66
Tabela 9 – Quantificação em log UFC g ⁻¹ de <i>A. brasilense</i> (Azos) e <i>H. seropedicae</i> (Herbas) em raiz de milho, cultivar DKB 390, cultivadas em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média somente dos valores detectados acima do limite de detecção (>LOD) de 10 cópias (n=4 para amostras controle, n=6 para amostras inoculadas).....	70

Tabela 10 – Quantificação em log UFC g ⁻¹ de <i>H. seropedicae</i> (Herbas) em folha de milho, cultivar DKB 390, cultivadas em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14, 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média somente dos valores detectados acima do limite de detecção (>LOD) de 10 cópias (n=4 para amostras controle, n=6 para amostras inoculadas).....	70
Tabela 11 – Contagem em placa de <i>A. brasilense</i> (Azos) e <i>H. seropedicae</i> (Herbas) (log UFC g ⁻¹) em amostras de folha e raiz de milho cultivar DKB 390 cultivadas em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). LOD = 4,95 log UFC g ⁻¹	71
Tabela 12 - Co-inoculação com BPCV inoculadas em plantas de milho.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC Ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano

AIA Ácido indol-3-acético

AM Estado do Amazonas

ANDA Associação Nacional para a Difusão de Adubos

ATP Adenosina trifosfato

Azos *Azospirillum brasilense*

Azos+Herbas *Azospirillum brasilense* + *Herbaspirillum seropedicae*

B.O.D Demanda Biológica de Oxigênio

Bias Veracidade

BPCV Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal

C4 4 carbonos

CAL Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

CAPES Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCA Centro de Ciências Agrárias

CCB Centro de Ciências Biológicas

Che Quimiotaxia

CNPq Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Conab Companhia Nacional de Abastecimento

Cq Ciclo de quantificação

CTAB Brometo de cetiltrimetilamônio

D.A.I Dias após inoculação

D.O Densidade óptica

DIC Delineamento inteiramente casualizado

DKB Dekalb

DNA Ácido desoxirribonucleico

EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético

EMBRAPA Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPS Exopolissacarídeos

F/R *Forward/Reverse*

FAO Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FBN Fixação biológica de nitrogênio

Herbas *Herbaspirillum seropedicae*

IFA Associação internacional de fertilizantes

LOD Limite de detecção

LOQ Limite de quantificação

LPSN *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*

M.O Matéria orgânica

Min. Minuto

MIP Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

n número

NPK Nitrogênio, fósforo, potássio

ODS Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

PCS Polissacarídeos

PIBIC Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica

PVP *Polyvinylpyrrolidone*

qPCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real

R² Coeficiente de determinação

ROS Espécies reativas de oxigênio

RsDr Repetibilidade relativa do desvio padrão

RSI Resistência sistêmica induzida

sp. Espécie

SPAD *Soil Plant Analysis Development*

ssp. Espécies

subsp. Subespécie

UFC Unidade Formadora de Colônia

UFPR Universidade Federal do Paraná

UFSC Universidade Federal de Santa Catarina

UV Ultra violeta

V Volume final

V2 Estágio vegetativo segunda folha

V3 Estágio vegetativo terceira folha

V6 Estágio vegetativo sexta folha

V8 Estágio vegetativo oitava folha

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	MILHO (<i>Zea mays</i> L.).....	23
2.2	O USO DE FERTILIZANTES MINERAIS NA CULTURA DO MILHO.....	24
2.3	INOCULANTES BACTERIANOS EM GRAMÍNEAS	26
2.4	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)	29
2.4.1	Mecanismos diretos utilizados pelas BPCV	31
2.4.2	Mecanismos indiretos utilizados pelas BPCV.....	33
2.4.3	<i>Azospirillum brasilense</i>: Identificação, associação com as plantas e benefícios desta associação	34
2.4.4	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>: Identificação, associação com as plantas e benefícios desta associação	38
2.5	EFEITOS DOS ATRIBUTOS DO SOLO SOBRE O ESTABELECIMENTO DA SIMBIOSE ENTRE PLANTA-BACTÉRIA	42
2.6	CO-INOCULAÇÃO DE BPCV	45
3	OBJETIVOS	50
3.1	OBJETIVO GERAL.....	50
3.1.1	Objetivos Específicos.....	50
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO.....	51
4.2	CONDIÇÕES DE GERMINAÇÃO E INOCULAÇÃO DAS SEMENTES DE MILHO.....	52
4.3	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E ANÁLISES DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL NO ENSAIO <i>IN VITRO</i>	53
4.4	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E ANÁLISES DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL NOS ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO	54
4.5	QUANTIFICAÇÃO DE DNA BACTERIANO POR qPCR EM MILHO CULTIVADO <i>IN VITRO</i> E EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	56

4.5.1	Extração de DNA.....	56
4.5.2	Quantificação de <i>A. brasilense</i> e <i>H. seropedicae</i> em milho por qPCR	57
4.5.3	Construção da curva padrão a partir da cultura pura de <i>A. brasilense</i> FP2 e <i>H. seropedicae</i> SmR1	57
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	58
5	RESULTADOS	59
5.1	PARÂMETROS DE REAÇÃO DE qPCR PARA A QUANTIFICAÇÃO DE <i>A. brasilense</i> e <i>H. seropedicae</i> EM MILHO.....	59
5.2	QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE <i>A. brasilense</i> E <i>H. seropedicae</i> POR qPCR EM MILHO CRESCIDO <i>IN VITRO</i>	62
5.3	DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) DAS BACTÉRIAS <i>A. brasilense</i> E <i>H. seropedicae</i> ASSOCIADAS COM MILHO CRESCIDO <i>IN VITRO</i>	65
5.4	AVALIAÇÃO DE VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO VEGETAL DE MILHO CRESCIDO <i>IN VITRO</i>	66
5.5	QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE <i>A. brasilense</i> E <i>H. seropedicae</i> POR qPCR EM MILHO CULTIVADO EM CASA DE VEGETAÇÃO	69
5.6	DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) DAS BACTÉRIAS <i>A. brasilense</i> E <i>H. seropedicae</i> ASSOCIADAS COM MILHO CULTIVADO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	71
5.7	VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO VEGETAL DE MILHO CULTIVADO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	71
5.7.1	Variáveis de crescimento vegetal avaliadas em plantas de milho obtidas em primeiro ensaio (ano 2018).....	71
5.7.2	Variáveis de crescimento vegetal avaliadas em plantas de milho obtidas em segundo ensaio (ano 2020).....	76
6	DISCUSSÃO	80
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	87
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICE A – Tabela de gêneros bacterianas co-inoculados em milho	115

1 INTRODUÇÃO

O milho fornece cerca de 365 Kcal 100 g⁻¹ representando grande importância na segurança alimentar, podendo ser consumido de diversas formas (NUSS; TANUMIHARDJO, 2010). Além da sua relevância social, o milho se destaca na economia e na ciência, sendo uma *commodity* com numerosos usos industriais e como planta modelo de mecanismo fotossintético C₄ (PECHANOVA *et al.*, 2013; RANUM; PEÑA-ROSAS; GARCIA-CASAL, 2014).

A cultura do milho é bastante exigente em nutrientes, pois é linear a produtividade com a fertilização. Em virtude disso o uso de fertilizantes químicos utilizados na cultura acaba sendo muitas vezes superdimensionado (LACERDA *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2016). Outro fator que favorece o superdimensionamento de fertilizantes sintéticos são as adubações pelos agricultores em quantidades fixas de NPK (nitrogênio, fósforo e potássio), principalmente por receio de queda na produtividade (BENITES; POLIDORO; RESENDE, 2010). Desta forma, o uso exacerbado desses produtos sintéticos e altamente solúveis causa uma perturbação ao meio ambiente gerando reflexos negativos (MIRANSARI, 2011; BOURKE *et al.*, 2015).

Como alternativa para os fertilizantes químicos, as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) vem ganhando espaço no campo e aceitação pelos agricultores, como prova disso é a venda de mais de 80 milhões de doses de inoculantes anualmente no mercado brasileiro (SOARES, 2018). Entre os benefícios confirmados das BPCV, quando associadas as plantas, estão a facilitação da aquisição de nutrientes como nitrogênio, fósforo, ferro, modulação e equilíbrio de hormônios vegetais e auxílio na redução de estresses bióticos e abióticos (BHARDWAJ *et al.*, 2014).

A prática da aplicação foliar de BPCV apresenta vantagens frente a inoculação via semente, principalmente quando se trata de proteção da população inoculada e a chegada das bactérias em uma estrutura vegetal já formada, fator que auxilia na rápida instalação das mesmas (GUIMARÃES *et al.*, 2018). Os efeitos positivos das BPCV sob aplicação foliar é consequência das mudanças no equilíbrio hormonal induzidas por fitormônios liberado pelas bactérias ou pela biossíntese de metabólitos ativos após a colonização bacteriana (GONZALEZ-LOPEZ *et al.*, 1991).

Dentre as BPCV pode-se destacar as espécies *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*, as quais são bactérias diazotróficas e quando associadas com as plantas promovem benefícios como: aumento significativo na altura e biomassa da planta,

comprimento das raízes, matéria seca, produção e rendimento de grãos, bem como aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos (CAMILIOS-NETO *et al.*, 2014; BREDA; ALVES; REIS, 2016; FUKAMI; CERZINI; HUNGRIA, 2018; PEDROSA *et al.*, 2019).

A co-inoculação de microrganismos é uma estratégia eficaz, pois combina diferentes microrganismos benéficos podendo gerar um efeito sinérgico (JARDIN, 2015). A partir desta tecnologia agrícola, os ganhos são substanciais, tanto para o ecossistema, quanto para a economia e a agricultura, a qual contempla alta produtividade da cultura com baixo custo de produção (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

A literatura relata trabalhos de co-inoculação na cultura do milho com diversos gêneros de BPCV, o conjunto desses gêneros traz benefícios, como aumento da produtividade, aumento da germinação de sementes, melhora nas avaliações morfométricas da planta e indução de resistência das plantas às condições de estresse biótico e abiótico, entretanto, poucos estudos relatam a co-inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae* em milho (KIM *et al.*, 2012; GUMARÃES *et al.*, 2014; DARTORA *et al.*, 2016; PANDE; PANDEY; KAUSHIK, 2017; FUKAMI *et al.*, 2018).

Para que ocorra e seja bem-sucedida a interação depende de alguns fatores como a sobrevivência da bactéria no solo, compatibilidade com a cultura inoculada e a capacidade de competir com a microbiota do solo. Os fatores ambientais como radiação UV e altas temperaturas, além do manejo e propriedades do solo como pH, teor de matéria orgânica, nutrientes e textura também influenciam no sucesso da inoculação (MARTINEZ-VIVEROS *et al.*, 2010; ZHANG; VIVANCO; SHEN, 2017; RILLING *et al.*, 2019).

A concepção, formulação e otimização de inoculantes bacterianos eficazes de co-inoculação requerem uma compreensão profunda dos modos de interação, adesão e colonização bacteriana às sementes e/ou aos tecidos vegetais inoculados (MOLINA-ROMERO *et al.*, 2017). São necessários estudos que revelem novas combinações de linhagens bacterianas com diferentes genótipos de plantas para aprimorar esta tecnologia (HELMAN; BURDMAN; OKON, 2011).

Diante do exposto, este estudo teve como objetivo geral avaliar o efeito da co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* via aplicação foliar e na

radícula do milho sobre o crescimento, nutrição mineral e quantificação de DNA bacteriano nas plantas em condições de solo de baixa fertilidade natural.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MILHO (*Zea mays* L.)

A espécie *Z. mays* pertence à Ordem Poales, Família Poaceae e Gênero *Zea*, angiosperma monocotiledônea e gramínea (TROPICOS, 2020). Originária da gramínea selvagem teosinto (*Zea mays* subsp. *parviglumis*), teve como centro de origem diversos lugares do México num período histórico entre 5.000 a 10.000 anos atrás (MATSUOKA *et al.*, 2002). É uma espécie diploide que apresenta 20 cromossomos, seu genoma tem em média 2.500 Mb (WANG *et al.*, 2014). O grão de milho contém aproximadamente 72% de amido, 10% de proteína e 4% de gordura, fornecendo cerca de 365 Kcal 100 g⁻¹ (RANUM; PEÑA-ROSAS; GARCIA-CASAL, 2014).

Devido ao seu excelente potencial energético e nutricional, o milho é consumido tradicionalmente em todo o mundo, sendo de forma *in natura* ou de forma processada como, farinha, xarope, óleo, bebidas alcóolicas entre outros produtos, desta forma apresenta grande importância na segurança alimentar. O consumo animal também é baseado no milho, por meio de ração, silagem e forragem. Além de apresentar numerosos usos industriais, o milho está presente como matéria prima para produtos químicos orgânicos, borracha, etanol e plástico, também é utilizado na indústria farmacêutica e em outros usos. Ademais, tem sido utilizado como planta modelo de mecanismo fotossintético C₄, na biologia e genética, mostrando sua importância não só na economia, na alimentação, saúde, mas também na ciência (NUSS; TANUMIHARDJO, 2010; PECHANOVA *et al.*, 2013; RANUM; PEÑA-ROSAS; GARCIA-CASAL, 2014).

A produção mundial total desse cereal foi 1,15 bilhão de toneladas com um total de áreas plantadas de 193,73 milhões de hectares no ano de 2018 (FAOSTAT, 2018). O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho com uma produção nacional entorno de 101,90 milhões de toneladas, em 18,2 milhões de hectares de área plantada, considerando as três safras na temporada 2019/20, sendo essa produção inferior apenas àquelas obtidas pelos Estados Unidos e a China (CONAB, 2019).

A região sudoeste do Paraná, oeste-catarinense e noroeste do Rio Grande do Sul tem a produção agrícola concentrada pela agricultura familiar e apresentam grande parte da

demanda de milho, devido a produção animal na região como bovino, aves e suínos. A cultura do milho, principalmente no sul do país e de forma mais intensificada, na região oeste-catarinense, tem vínculo histórico com a agricultura familiar, os quais são motivados a basicamente cultivar o milho pela subsistência, consumo pela produção animal e destinação comercial (WORDELL; ELIAS, 2012; WORDELL; CHIARADIA, 2016).

No Brasil o milho é cultivado em regiões tropicais e subtropicais, é uma das culturas com distribuição geográfica mais abrangente e isto se deve ao fato de ser uma cultura anual, com ampla variabilidade em sua precocidade. Este cereal é considerado exigente em fertilidade do solo, pois o aumento da produtividade é linear com a adubação principalmente em relação a adubação nitrogenada, devido a isso o uso de fertilizantes químicos utilizados na cultura acaba sendo muitas vezes superdimensionado (BERGAMASCHI; MATZENAUER, 2014; LACERDA *et al.*, 2015; BARROS *et al.*, 2016).

2.2 O USO DE FERTILIZANTES MINERAIS NA CULTURA DO MILHO

Segundo a pesquisa da FAO (2016), a população continua crescendo com previsão para 9,6 bilhões de pessoas em 2050. Como consequência o consumo de cereais como milho, arroz e trigo estima-se que chegará há 170 milhões de toneladas até o ano de 2024. Devido à essa demanda de alimentos, o sistema de produção agrícola vem buscando aumentar a produtividade a cada safra, utilizando tecnologias mais eficientes como maquinários e insumos químicos, por exemplo defensivos agrícolas e fertilizantes minerais como NPK (nitrogênio, fósforo e potássio) (ARTUZO *et al.*, 2018).

O desenvolvimento da planta, por consequência o seu rendimento, são alterados por diferentes fatores, tais como as condições do solo e clima. A fertilidade natural que o solo oferece está diretamente ligada ao potencial produtivo, pois as plantas necessitam de macro e micronutrientes tais como o nitrogênio, fósforo, potássio, ferro, manganês, boro e zinco, respectivamente, provenientes de forma orgânica ou mineral (MIRANSARI, 2011). O objetivo dos fertilizantes químicos é suplementar os nutrientes presentes no solo naturalmente, desta forma aumentando a fertilidade, a fim de satisfazer a demanda das culturas (IFA, 2018).

Em 2023 as vendas globais de nutrientes primários para fertilizantes químicos são projetadas em 268 milhões de toneladas, para uma taxa média de crescimento anual de 1,3% (IFA, 2019). A utilização de ureia na agricultura do Brasil em 2017 foi de 2,5 milhões de

toneladas, sendo o sétimo país que mais utiliza esse fertilizante químico na agricultura ficando atrás da Índia, Estados Unidos, Paquistão, Indonésia, Egito e Canadá (FAOSTAT, 2017). No final de 2019 foi vendido ao mercado nacional 36,24 milhões de toneladas de fertilizantes NPK, sendo as culturas mais representativas nas vendas, soja e o milho (ANDA, 2019).

Apesar do nível de fertilidade do solo ser interpretado em muitos casos como alto ou muito alto, é usual que os agricultores continuem adubando com quantidades fixas de N, P e K, por temerem a redução de produtividade. Essa prática tem resultado em adubações desnecessárias ou superdimensionadas, com baixa eficiência no uso dos fertilizantes sintéticos (BENITES; POLIDORO; RESENDE, 2010; LACERDA *et al.*, 2015).

O uso indiscriminado e exagerado de fertilizantes químicos causa reflexos negativos no meio ambiente e na biodiversidade presente no solo, perturbando todo o sistema. Por exemplo causando degradação dos recursos naturais, como a lixiviação e escoamento superficial de nutrientes (nitratos e fósforos), resultando no processo de eutrofização dos sistemas aquáticos, volatilização de gases (amônia e óxido nitroso), alterações nas características do solo, entre outras perdas (MIRANSARI, 2011; BOURKE *et al.*, 2015; IFA, 2018).

Tem-se um grande debate sobre como superar os efeitos negativos ambientais e sociais da agricultura convencional, com isso, as pesquisas têm avançado com soluções para minimizar estes impactos. Sobretudo no que diz respeito aos fertilizantes químicos, tecnologias como o uso concomitante de fertilizantes sintéticos e orgânicos, fertilizantes de liberação lenta, controlada ou estabilizado e o uso de inoculantes, a exemplo, as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) são alternativas utilizadas no campo, com o intuito de minimizar os impactos ambientais causado pelo excesso de aplicações químicas e ao mesmo tempo manter a produtividade (OLIVARES *et al.*, 2017; IFA, 2018).

Levando em consideração que o solo é um ecossistema altamente complexo, apresentando diversas comunidades de microrganismos que estão associados as plantas, sendo essenciais para o ciclo dos nutrientes e decomposição da matéria orgânica, processos que liberam nutrientes de forma orgânica no solo e as plantas conseguem usufruir desses minerais para se desenvolver. Desta forma o uso de inoculantes com BPCV é uma abordagem promissora para aumentar a eficiência do uso de nutrientes, reduzindo os custos ambientais e financeiros da produção agrícola (OLIVARES *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2018).

2.3 INOCULANTES BACTERIANOS EM GRAMÍNEAS

Inoculante é uma tecnologia definida como todo produto que contenha microrganismos favoráveis ao crescimento das plantas, conforme DECRETO Nº 4.954, DE 14 DE JANEIRO DE 2004 (BRASIL, 2004). Desse modo, os inoculantes representam o veículo de transporte de bactérias selecionadas. Atualmente, no mercado brasileiro existem duas principais formas de inoculantes bacterianos, sendo elas físicas e sólidos (em pó, tendo a turfa como suporte para as bactérias) e fluídos (líquidos, com a bactéria estabilizada) (CARVALHO; FERREIRA; HUNGRIA, 2010).

Durante os últimos anos o uso de inoculantes tem crescido 10% ao ano (OWEN *et al.*, 2015), mostrando grande adesão dessa tecnologia por parte dos produtores rurais. Conforme ANPII (2018), no ano de 2018 foram vendidas 9.125.995 milhões de doses de inoculantes para gramíneas. Além dos ganhos ambientais com o uso desta tecnologia, também pode-se destacar os ganhos econômicos, por ser um produto mais barato em relação a importação de fertilizantes nitrogenados.

Entre os diferentes gêneros bacterianos que atuam na promoção do crescimento vegetal, ainda é relativamente baixo o número de BPCV utilizadas em formulações de inoculantes, quando comparado com a grande biodiversidade natural presente nas plantas e nos solos. Em torno de 30 gêneros foram utilizados para a produção de inoculantes, entre eles podemos salientar: *Acinetobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Chlorella*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, *Rhodococcus*, *Rhizobium*, *Serratia* e *Stenotrophomonas* (OLIVARES *et al.*, 2017).

A única espécie bacteriana recomendada para a produção de inoculantes no Brasil (MAPA, 2011) para gramíneas é *A. brasilense*. As cepas da *A. brasilense* autorizadas são Ab-V1 e Ab-V8 para trigo, Ab-V4 e Ab-V7 para milho e as cepas, Ab-V5 e Ab-V6 para milho, trigo e arroz. No início de 2020 foi lançado no Brasil e desenvolvido pela Embrapa Milho e Sorgo, o inoculante BiomaPhos[®] líquido e recomendado para a cultura do milho, com as bactérias *Bacillus subtilis* cepa CNPMS B2084 e *B. megaterium* cepa CNPMS B119, as quais são solubilizadoras de fósforo. Paiva *et al.* (2020) encontraram um aumento médio na produtividade do milho de até 8,9% com o uso do inoculante, sendo essa a primeira tecnologia

com o uso de BPCV para a solubilização de fósforo no Brasil. Essas informações ressaltam o número restrito de gêneros, espécies e cepas bacterianas utilizadas comercialmente.

O primeiro inoculante comercial no Brasil foi com a bactéria *A. brasilense*, desenvolvido pela Embrapa Soja e UFPR para as culturas do milho e trigo no ano de 2009, comercializado como AzoTotal contendo as cepas Ab-V5 e Ab-V6 (HUNGRIA, 2011). Com interesse em pesquisas que desenvolvam inoculantes que abranjam maior número de culturas gramíneas, a Embrapa Agrobiologia juntamente com as Embrapas Roraima, Milho e sorgo e Cerrado, estão desenvolvendo um inoculante turfoso com a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*. Esse estudo mostra que a utilização de *H. seropedicae* pode diminuir até 40 kg de N por hectare ou quando convertido para ureia a economia é de 80 kg por hectare (REIS *et al.*, 2009; EMBRAPA, 2012).

Recentemente, um estudo feito pela Embrapa Amazônia Ocidental (OLIVEIRA, I. J; FONTES; BARRETO; PINHEIRO, 2018), demonstrou que fazendo uso da adubação de cobertura com a inoculação de *A. brasilense* na semeadura em sementes de milho, permitiu uma economia de 20 kg de nitrogênio por hectare, podendo resultar em uma redução de 360 toneladas de ureia, o que representaria uma economia de 1,2 milhão de reais.

Embora sejam confirmados os benefícios das BPCV, existem algumas limitações quando considerado o uso dos inoculantes a campo, como é o caso da exposição a produtos químicos utilizados nos tratamentos de sementes, o qual, mostra-se prejudicial às populações de BPCV, sendo o método mais difundido em condições de campo (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; MOHIUDDIN; MOHAMMED, 2013; FUKAMI *et al.*, 2016). Isto pode resultar em diminuição do número de bactérias viáveis, diminuindo a eficácia do inoculante (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007; PENNA *et al.*, 2011). Contudo, uma alternativa para evitar essas interações é a aplicação foliar (BATTISTUS *et al.*, 2014).

A aplicação foliar de bactérias benéficas não é uma prática recente, Javaid (2010) descreveu em seu capítulo de livro diversos trabalhos com aplicação foliar e seus benefícios, além disso, na literatura é encontrado uma gama de trabalhos que apresentam resultados promissores quanto a pulverização foliar de BPCV em diversas culturas, tais como soja (PUENTE *et al.*, 2017), milho (FUKAMI *et al.*, 2016, 2017), trigo (FUKAMI *et al.*, 2016), tomate (CANELLAS *et al.*, 2015), canola (AHMADI-RAD *et al.*, 2016) e feijão (SOUZA; FERREIRA, 2017).

A prática da aplicação foliar de BPCV apresenta vantagens frente a inoculação via semente, principalmente quando se trata de mecanismos de proteção da população inoculada. A aplicação foliar possibilita maior cobertura e distribuição das bactérias, bem como a chegada das bactérias com uma estrutura vegetal já formada, auxilia na rápida instalação das mesmas e favorece a entrada pelas vias aéreas da planta para bactérias endofíticas e quando associativas pode gerar resultados *in loco* no vegetal. A liberação de substâncias tóxicas às outras células, também exerce ação antagonista contra patógenos em diversos pontos do vegetal (BATTISTUS *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2018). Os efeitos das BPCV sob aplicação foliar têm sido amplamente atribuídos a mudanças no equilíbrio hormonal induzidas por fitormônios liberado por essas bactérias ou pela biossíntese *in situ* de metabólitos ativos após a colonização bacteriana (GONZALEZ-LOPEZ *et al.*, 1991).

A inoculação foliar nos estágios vegetativos do milho traz benefícios comprovados. No estágio fenológico V2.5 (2.5 folhas totalmente expandidas) Fukami *et al.* (2016) comprovaram um aumento no rendimento de grão de 773 Kg ha⁻¹. Canellas *et al.* (2013) demonstram um aumento de 65% na produção de grão de milho quando aplicada a inoculação de *H. seropedicae* e ácido húmico via foliar no estágio fenológico V6 (6 folhas totalmente expandidas) e Canellas *et al.* (2015) verificaram um aumento na produção de grãos de 38% com a aplicação foliar em estágio V8 (8 folhas totalmente expandidas).

O estágio vegetativo V3 (3 folhas totalmente expandidas) é definido como o estabelecimento do número máximo de grãos, fator que define a produção potencial da planta. Em estágio V6 o ponto de crescimento e o pendão estão acima do nível do solo. Em estágio V8 ocorre o início da queda das primeiras folhas e o número de fileira de grãos é determinado (MAGALHÃES; DURÃES, 2006). Dessa forma, a inoculação via foliar nos trabalhos de Canellas *et al.* (2013, 2015) e Fukami *et al.* (2016) foram estratégicos, considerando os estágios fenológicos de definição da produção potencial e em que o pendão e o ponto de crescimento da planta estão acima do solo. Demonstrando que ainda não é totalmente claro qual é o melhor estágio fenológico para a aplicação via foliar, no entanto, em cada estágio vegetativo (V3, V6 e V8) foi possível obter resultados positivos.

As BPCV quando aplicadas via foliar denotam valor agrônômico, disponibilizando um método alternativo para o uso agrícola, ampliando a utilização e a eficácia de inoculantes quando utilizada da forma correta (CANELLAS *et al.*, 2015). Desta forma, é importante entender os benefícios das BPCV e suas interações, pois o sucesso da formulação dos

inoculantes depende da sua aplicação adequada na agricultura. O grande desafio nessa área de pesquisa está no fato de que, juntamente com a identificação de várias cepas de BPCV e suas propriedades, é essencial entender o mecanismo real de funcionamento das BPCV para a eficácia da exploração na agricultura sustentável (BHARDWAJ *et al.*, 2014).

2.4 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)

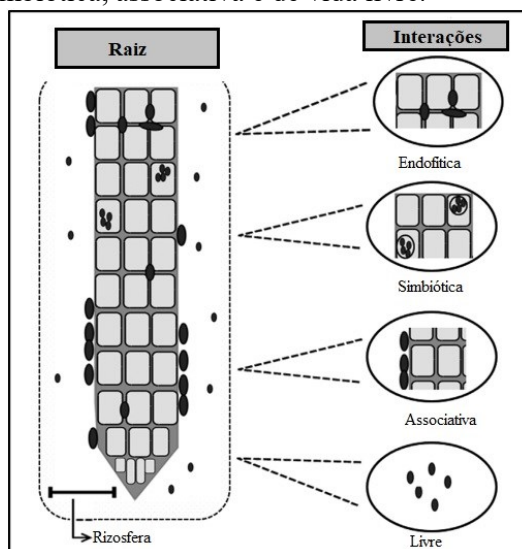
As interações entre raiz-microrganismo desempenham papéis vitais para o crescimento e desenvolvimento da planta. Essas interações complexas na rizosfera são indícios de que as raízes, solo e microrganismos podem ser manejados para favorecer uma agricultura sustentável (DESSAUX; GRANDCLÉMENT; FAURE, 2016). O entendimento profundo das interações entre solo-planta-microrganismo pode em última análise, reduzir a dependência de agroquímicos, substituindo suas funções por microrganismos benéficos, como é o caso das BPCV que são um grupo heterogêneo com capacidade de colonizar a superfície das raízes, rizosfera, filosfera e tecidos internos dos vegetais (DUTTA; PODILE, 2010; HUNGRIA, 2011; ZHANG; VIVANCO; SHEN, 2017).

A rizosfera é a região do solo que circunda a raiz com 1 a 3 mm, sendo diretamente modificada pelo sistema radicular e onde os processos relacionados com microrganismos acontecem na sua grande maioria (GRAY; SMITH, 2005; KUNDAN *et al.*, 2015). É neste microambiente que as raízes das plantas absorvem água, nutrientes e exercem seus efeitos no solo adjacente através dos rizodepósitos, fenômeno conhecido pela liberação de material orgânico pela planta, basicamente constituído de exsudatos (metabólitos vegetais) e detritos vegetais (HARTMANN; SCHMID, 2009; GOUDA *et al.*, 2018). Essas condições favorecem as interações entre plantas e microrganismos, devido aos exsudatos serem fonte de energia e nutrientes (VEJAN *et al.*, 2016; ZHANG; VIVANCO; SHEN, 2017). Em razão a essa característica, a rizosfera é bastante rica quando comparada com o solo a granel, na rizosfera é possível quantificar de 10 a 100 vezes mais bactérias (GOUDA *et al.*, 2018).

Quando se avalia as formas de colonização a partir da rizosfera (Figura 1), as BPCV podem colonizar o interior do vegetal sendo chamadas de bactérias endofíticas, que vivem nos tecidos internos vegetais, utilizando as fissuras radiculares como meio de entrada no tecido vegetal, sendo *Herbaspirillum* spp. e *Azoarcus* spp. exemplos desse grupo. Ou ainda, aderir a

planta vivendo na superfície da raiz denominada associativo, as quais podemos citar as bactérias do gênero *Azospirillum* spp. e *Azotobacter* sp. Existem também bactérias endofíticas simbióticas que é o caso do gênero *Rhizobium* sp. e bactérias livres, ou seja, que não estão associadas intimamente com a raiz (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

Figura 1– Representação das diferentes formas de colonização radicular pelas BPCV conforme colonização, sendo, endofítica, simbiótica, associativa e de vida livre.



Fonte: Modificado de Souza; Ambrosini; Passaglia (2015).

São conhecidas duas formas de promoção do crescimento vegetal, direta e indireta. A promoção direta é quando o microrganismo fomenta a planta disponibilizando nutrientes que estão no ambiente facilitando a aquisição pela planta, como ocorre com o nitrogênio, fósforo e ferro, outra forma é modulando e equilibrando hormônios vegetais (GLICK, 2012; BHARDWAJ *et al.*, 2014). A forma indireta é a indução de resistência aos estresses bióticos e abióticos, utilizando um arsenal de mecanismos biológicos como a produção de antibióticos, enzimas que degradam a parede celular dos patógenos, resistência sistêmica induzida, diminuição da quantidade de ferro disponível ao patógeno e síntese de compostos voláteis inibidores de patógenos (GLICK, 2012; CARVALHO *et al.*, 2014). Os mecanismos pelos quais as bactérias podem influenciar o crescimento das plantas difere entre espécies e linhagens bacterianas, considerando que elas podem utilizar mais de um mecanismo (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015; GOUDA *et al.*, 2018).

De forma geral, os tipos de colonização associativos e endofíticos podem apresentar resultados benéficos para a planta levando à promoção do crescimento vegetal, como aumento

significativo na altura e biomassa da planta, comprimento das raízes, matéria seca, produção e rendimento de grãos, bem como aumento da tolerância a estresses bióticos e abióticos (SAHA *et al.*, 2013; VARGAS *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2015; BREDA; ALVES; REIS, 2016; VURUKONDA *et al.*, 2016; CURÁ *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017b; FUKAMI; CERZINI; HUNGRIA, 2018; BREDA *et al.*, 2019; PEDROSA *et al.*, 2019).

2.4.1 Mecanismos diretos utilizados pelas BPCV

O nitrogênio (N) é utilizado na formação de proteínas e ácidos nucleicos nos organismos no entanto, a principal fonte de N na natureza, o nitrogênio atmosférico (N₂) não é acessível à maioria dos organismos vivos (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009). A produção industrial de fertilizantes nitrogenados chega a 100 milhões de toneladas N ano⁻¹, usando como fonte as energias fósseis (FOWLER *et al.*, 2013). A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo responsável pela redução de N₂ em amônia (NH₃) (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009), processo esse que é desempenhado por microrganismos diazotróficos, os quais executam FBN através da enzima nitrogenase que é formada por dois metaloproteínas (proteína FeMo e proteína Fe) (DIXON; KAHN, 2004; GOUDA *et al.*, 2018).

Exemplos de gêneros de BPCV que são fixadores de nitrogênio são *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Rhizobium* (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016), sendo possível observar os efeitos da FBN pelas BPCV em diversas culturas, como tem sido demonstrado em soja (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015), milho (KUAN *et al.*, 2016), trigo (CORTIVO *et al.*, 2017), girassol (ARIF *et al.*, 2017), arroz (DEFEZ; ANDREOZZI; BIANCO, 2017) e sorgo (SANTOS *et al.*, 2017a).

Depois do nitrogênio, o fósforo (P) é o nutriente mais limitante para as plantas, participando como componente estrutural de ácidos nucleicos, fosfolípidios e trifosfato de adenosina (ATP), como elemento chave das vias metabólicas e bioquímicas importantes particularmente para FBN e fotossíntese (RICHARDSON; SIMPSON, 2011). As plantas absorvem P de duas formas solúveis: a monobásica (H₂PO₄⁻) e a dibásica (HPO₄²⁻) (GOUDA *et al.*, 2018). Os solos tropicais das áreas agrícolas do Brasil geralmente apresentam condição ácida e predomínio de fosfato de ferro (P-Fe), resultando em baixa disponibilidade de fósforo para as plantas. As principais fontes de P na agricultura atualmente são complexos minerais

insolúveis ou orgânicos (incorporados na biomassa ou na matéria orgânica do solo) (RICHARDSON; SIMPSON, 2011; BATISTA *et al.*, 2018).

Os gêneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Rhizobium* são exemplos de bactérias solubilizadoras de fósforo, contribuindo ativamente no ciclo do fósforo, aumentando a biodisponibilidade deste elemento para as plantas. Os microrganismos utilizam alguns mecanismos para fazer a conversão do fósforo pouco solúvel em solúvel, como o processo de acidificação, quelação e reações de troca, liberação de ácidos orgânicos e a produção de sideróforos.

Os sideróforos são quelantes de baixo peso molecular, cuja a função é complexar metais em especial o ferro (KOBAYASHI; NISHIZAWA, 2012; SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015). Como as BPCV são capazes de produzir sideróforos, demonstra valiosa ferramenta no fornecimento da quantidade necessária de fósforo para a planta. Costa *et al.* (2014) avaliou a capacidade de produzir sideróforos em 41 gêneros, entre eles, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Rhizobium* e concluiu que 100% dos gêneros estudados tem a capacidade de produzir.

As BPCV também possuem o potencial de fazer modulações hormonais de fitormônios ou reguladores de crescimento de plantas, que em baixas concentrações promovem, inibem ou modificam crescimento e desenvolvimento de plantas. Os grupos mais comuns de fitormônios são auxinas, citocininas, giberelinas e etileno. (GLICK, 2014; SURESHBABU; AMARESAN; KUMAR, 2016).

As auxinas (AIA - Ácido indol-3-acético) controlam vários estágios do crescimento e desenvolvimento das plantas, como alongamento, divisão e diferenciação celular e ajudam no domínio apical (GLICK, 2014). Souza *et al.* (2013) apontam que cerca de 80% das bactérias presentes na rizosfera da cultura do arroz produz AIA, tornando as plantas com raízes altamente desenvolvidas, aumentando seu tamanho e peso, número de ramificações e área de superfície em contato com o solo, o que por sua vez permite que a planta absorva mais nutrientes, em última análise, auxiliando o crescimento geral da planta. *A. brasilense* pode ser destacado como exemplo de bactéria rizosférica que produz AIA, *Enterobacter* e *Klebsiella* são bactérias endofíticas que também produzem AIA e oferecem suporte hormonal para as plantas (COSTA *et al.*, 2014; GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

As citocinina são fitormônios que promovem a divisão celular nas raízes e brotos das plantas. Sua principal função é crescimento e diferenciação celular, mas também está presente

na sinalização nutricional, expansão foliar, ramificação, produção de clorofila, crescimento radicular, promoção da germinação de sementes e atraso da senescência (MURAI, 2014). Os gêneros que se destacam na modulação da produção de citocinina quando associada as plantas são *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella* e *Escherichia* (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

As giberelinas influenciam e controlam os processos de desenvolvimento das plantas como alongamento do caule, germinação, dormência, florescência, expressão sexual e senescência de folhas e frutos (HEDDEN; PHILLIPS, 2000). *Azospirillum*, *Bacillus* e *Herbaspirillum* são exemplos de BPCV produtoras desse fitormônio (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

2.4.2 Mecanismos indiretos utilizados pelas BPCV

A planta é submetida a diversos estresses frequentemente, estando sujeita a estresses abióticos como ventos fortes, temperaturas extremas, seca, salinidade, inundações e estresse biótico, sendo o ataque de patógenos como fungos, bactérias, vírus, nematoides e insetos. Quando em estresse a planta reage com mecanismos biológicos de resposta, como a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que quando em excesso causam danos nos pigmentos fotossintéticos, lipídios da membrana, proteínas e ácidos nucleicos, produzindo um impacto negativo no desenvolvimento da planta e por consequência na produtividade. As BPCV têm a capacidade de atuar no gerenciamento e diminuição desses estresses (RAMEGOWDA; SENTHIL-KUMAR, 2015; GOUDA *et al.*, 2018).

Para controlar o ataque de patógenos nas plantas, a produção de antibióticos tem sido de grande valia. As BPCV *Bacillus* e *Pseudomonas* são gêneros que tem se destacado com esse potencial. Os antibióticos se dividem entre antifúngicos, antivirais, antibacterianos e se agrupam em compostos voláteis, como exemplos desses grupos são substâncias formadas por álcoois, aldeídos, cetonas, sulfetos, hidrogênio e cianeto e não voláteis como policetídeos, cíclicos, lipopeptídeos, aminopoliol e fenilpirrol (FOUZIA *et al.*, 2015; ULLOA-OGAZ; MUNOZ-CASTELLANOS; NEVAREZ-MOORILLON, 2015; GOUDA *et al.*, 2018).

As BPCV também apresentam a capacidade de induzir a resistência sistêmica induzida (RSI) que consiste na ativação do sistema de defesa natural da planta por meio de substâncias

específicas, promovendo um amplo espectro de proteção. A RSI é regulada contra diversos estresses, ativando enzimas que degradam a parede celular do patógeno (quitinase, β -1, 3-Glucanase, peroxidase, superóxido dismutase, catalase), diminuindo a ativação do hormônio etileno e jasmonico (ACC - ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano), produzindo compostos bacterianos (lipopolissacarídeos, lipopeptídeos cíclicos, 2, 3-butanodiol e acetoína), sideróforos que impede alguns patógenos de adquirir quantidade adequada de ferro e suprime sua capacidade de crescer (KAMAL; GUSAIN; KUMAR, 2014; KUNDAN *et al.*, 2015).

Diante dos vastos conhecimentos que tem sido gerados sobre as BPCV no mundo, o grupo de biologia molecular UFSC/CCA/CAL faz parte desses estudos desde 2010 com trabalhos de dissertações, teses e pós-doutorado que aprofundam os conhecimentos sobre as formas diretas (CANGAHUALA-INOCENTE *et al.*, 2013; AMARAL *et al.*, 2014; FERRARI *et al.*, 2014; FALEIRO *et al.*, 2015; PANKIEVICZ *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2016; CARDOZO, 2017; ESPINDULA *et al.*, 2017) e indiretas (BARBIERI, 2018; DALL'ASTA *et al.*, 2019) das ações das bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae*. Atua também no desenvolvimento de ferramentas moleculares que tornam a quantificação bacteriana mais eficaz (FALEIRO *et al.*, 2013, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014; DALL'ASTA *et al.*, 2017; CUNHA *et al.*, 2020).

2.4.3 *Azospirillum brasilense*: Identificação, associação com as plantas e benefícios desta associação

As bactérias do gênero *Azospirillum* compreendem espécies α -proteobactérias de vida livre no solo. São chamadas de bactérias rizosféricas porque possuem a capacidade de colonizar a rizosfera, superfície das raízes e até os tecidos internos do vegetal, sendo que o local de colonização depende da espécie e cepa do gênero (TARRAND; KRIEG; DÖBERAINER, 1978). Foram encontradas em diversos lugares do mundo principalmente na rizosfera e raízes de inúmeras famílias e espécies de plantas, Pereg; Bashan; Bashan (2016) afirmam que o gênero tem afinidade com 113 espécies de plantas em 35 famílias. Esse gênero possui 22 espécies descritas até o segundo semestre de 2020 (LPSN, 2020a), sendo as mais estudadas *A. brasilense* e *A. lipoferum* (RODRIGUES *et al.*, 2015).

A espécie *A. brasilense* foi classificada pela primeira vez em 1978, sendo uma bactéria Gram-negativa, associativa, com formato de bastonete, uniflagelada, com movimentos

vibroides. Apresenta diâmetro de 1 micrômetro (μm) e comprimento de 2,1 a 3,8 μm (TARRAND; KRIEG; DÖBERAINER, 1978).

Devido ao *A. brasilense* possuir flagelo, fator que lhe proporciona mobilidade no solo, permite a migração para os nichos mais favoráveis como a rizosfera (ALEXANDRE, 2010; MUKHERJEE *et al.*, 2016). As plantas liberam exsudatos radiculares, como ácidos orgânicos, açúcares, aminoácidos, compostos fenólicos entre outros, que são quimiotáticos e fonte de carbono, atraindo as bactérias para a rizosfera, sendo esse o primeiro processo de colonização na planta (KASCHUK; HUNGRIA, 2017) (Figura 2).

Os genomas da maioria das bactérias móveis codificam dois ou mais sistemas de quimiotaxia (Che). Mukherjee *et al.* (2016) identificaram o mecanismo pelo qual as células de *A. brasilense* podem obter uma vantagem quimiotática significativa, usando duas vias de quimiotaxia que regulam parâmetros de motilidade distintos. A via da quimiotaxia Che1 foi previamente demonstrada para regular as alterações na velocidade da natação principalmente e apresenta um papel menor na colonização da superfície radicular. O segundo sistema de quimiotaxia, chamado Che4, regula a probabilidade de reversões de natação, sendo a principal via de sinalização para quimiotaxia e colonização da superfície radicular. Desta forma, *A. brasilense* responde a sinalização química e suas células móveis aumentam transitoriamente a velocidade da natação.

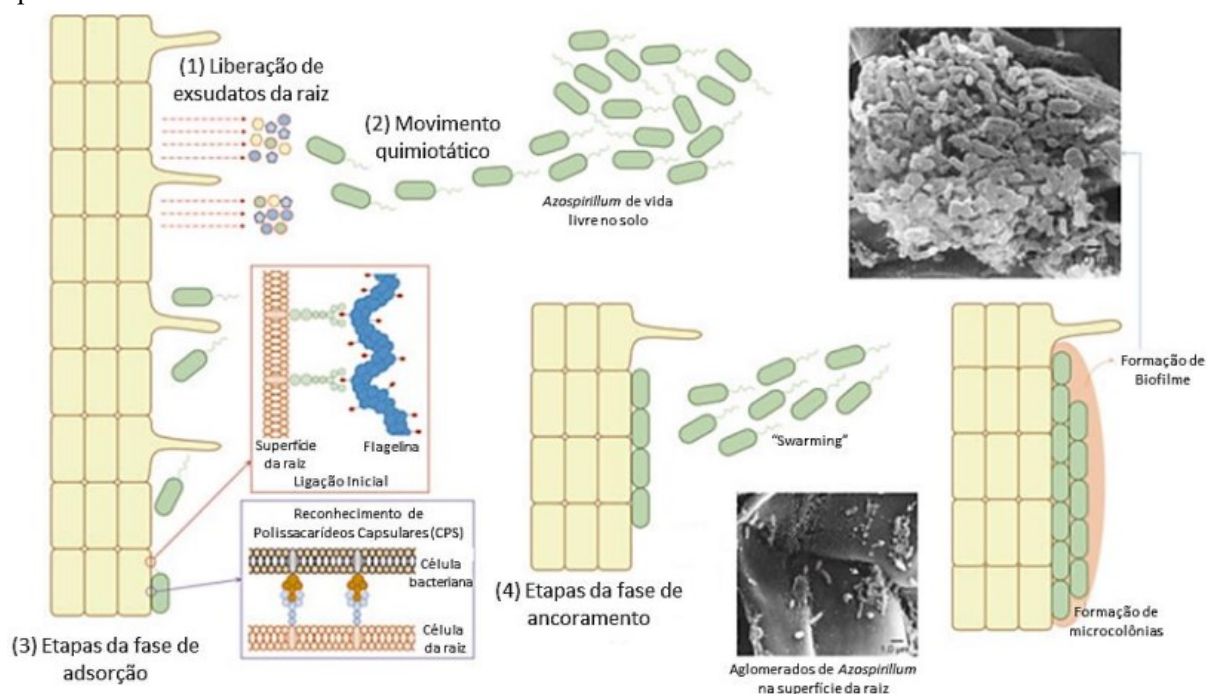
A próxima etapa é a adsorção, onde ocorre uma ligação fraca e reversível entre a bactéria *A. brasilense* e a planta, mediada pelo flagelo e por proteínas da superfície bacteriana, como polissacarídeos capsulares (PCS). Após ocorre a fase de ancoragem, que é irreversível e mediada por exopolissacarídeos (EPS), formando aglomerados no local da ligação (RODRÍGUEZ-NAVARRO; DARDANELLI; RUÍZ-SAÍNZ, 2007), concluindo a etapa de fixação na planta.

Após o término das etapas de liberação de exsudatos da raiz, movimento quimiotático e fases de fixação, ocorre a etapa de translocação do aglomerado de células (*swarming*) rapidamente até locais específicos e a colonização de forma ordenada da superfície radicular e a formação de biofilme, que é fundamental para a sobrevivência bacteriana entre os competidores (VERSTRAETEN *et al.*, 2008).

A. brasilense apresenta a capacidade de formar uma rede fibrilar (biofilme), a qual permite que as bactérias ancorem nas raízes para melhor acesso aos exsudatos da planta e

reciprocamente permite que a planta atinja substâncias excretadas pelas bactérias antes do consumo por microrganismos competidores. Além disso, fornece resistência contra forças físicas aplicadas à raiz, como lavagem e agitação (BASHAN *et al.*, 1991; GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012; FALEIRO *et al.*, 2015). Bem como, a biossíntese de EPS é fundamental para a formação do biofilme e colonização de plantas nas fases iniciais do reconhecimento de uma bactéria diazotrófica benéfica, como no caso da *A. brasilense* (CARVALHO *et al.*, 2016; RAMÍREZ-MATA *et al.*, 2016).

Figura 2 – Etapas do mecanismo de atração, fixação e formação de biofilme na planta por *Azospirillum* sp.



Fonte: adaptado de Guerrero-Molina; Winik; Pedraza (2012); Rodrigues *et al.* (2015).

A literatura confirma os benefícios da inoculação com *A. brasilense* em diversas espécies de plantas, principalmente gramíneas de importância econômica como o milho, trigo, sorgo, arroz e outras famílias como Curcubitaceae em pepino, Rosaceae em morango, Fabaceae em feijão, Simmondsiaceae em Jojoba (MEHNAZ *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2015; GONZALEZ; LARRABURU; LLORENTE, 2015; FUKAMI *et al.*, 2016; GALINDO *et al.*, 2016; PII *et al.*, 2016; FONTANA *et al.*, 2018; MALINICH; BAUER, 2018; NAKAO *et al.*, 2018).

A espécie *A. brasilense* promove o crescimento vegetal por meio de mecanismos biológicos, tais como, liberação de fito-hormônios, principalmente auxina, giberilina e

citocinina, quelação de moléculas de ferro pela produção de sideróforos, fixam nitrogênio e auxiliam no controle biológico de organismos patogênicos (BASHAN; BASHAN, 2010; TORTORA; DÍAZ-RICCI; PEDRAZA, 2011). As BPCV utilizam desse arsenal de mecanismos biológicos em conjunto para atuar no crescimento e desenvolvimento da planta (BASHAN; LEVANONY, 1990).

Pedrosa *et al.* (2019) avaliaram a inoculação com *A. brasilense* cepa Ab-V5 e HM053 associado à fertilização básica ($30 \text{ kg ha}^{-1} \text{ N}$) em milho. O Ab-V5 aumentou a produção de grãos entre 2,2 a 10,4% e a cepa HM053 aumentou a produção de grãos entre 4,7 e 29%, demonstrando que *A. brasilense* tem grande potencial na FBN e que esse potencial depende da cepa.

A. brasilense tem a capacidade de modular hormônios vegetais como AIA e giberilina quando associado as plantas. Zeffa *et al.* (2019) encontraram resultados que indicaram que a inoculação de milho com *A. brasilense* melhorou o crescimento de plantas e características bioquímicas, possivelmente devido à concentração de AIA ter sido maior quando inoculado com a bactéria. Este efeito benéfico pode ser relacionado ao aumento observado na biomassa da planta e modificações na arquitetura radicular. A biossíntese do AIA por *Azospirillum* é produzida em todas as fases do desenvolvimento bacteriano, o que é uma característica altamente relevante para a promoção do crescimento vegetal, uma vez que benefícios já podem ser observados nos primeiros dias ou meses após a inoculação. Espindula *et al.* (2017) observaram a expressão do gene *ZmKol* (estimulado pela giberilina GA3) na parte aérea da planta de milho, fator que pode estar relacionada às giberelinas produzidas por *A. brasilense* na raiz e translocado via xilema.

Calzavara *et al.* (2018) observaram um número maior dos elementos do metaxilema das plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* em comparação com a planta controle. Fator que resultou em um cilindro vascular mais espesso das plantas, favorecendo o transporte de água e nutrientes, resultando em maior produção de biomassa de raiz e parte aérea, também observaram aumento na taxa de fotossíntese das plantas inoculadas.

A capacidade do vegetal tolerar estresses abióticos, como estresse hídrico e salino também é confirmada com a inoculação de *A. brasilense*. Curá *et al.* (2017) demonstraram os efeitos de bioproteção da inoculação com *A. brasilense* no estresse hídrico. As plantas inoculadas mostraram uma maior tolerância aos efeitos negativos em condições de seca, com

maior produção de biomassa, níveis mais altos de carbono, nitrogênio e clorofila, também níveis mais baixos de ácido abscísico e etileno. Os níveis de estresse dessas plantas foram semelhantes aos de plantas não inoculadas, mostrando menos lesões na membrana celular. Foi observado um maior teor relativo de água no tecido vegetal e melhor osmorregulação em condições de seca nas plantas inoculadas, como refletido por um teor significativamente menor de prolina. Fasciglione *et al.* (2015) confirma os estudos de que a inoculação com *Azospirillum* melhorou a qualidade da alface cultivada sob estresse salino e também promoveu maior biomassa.

Os efeitos no controle de patógenos em plantas inoculadas com *A. brasilense* foi demonstrado por Santos *et al.* (2014), pois a colonização por *A. brasilense* afetou a seleção do hospedeiro e o desempenho do inseto *Diabrotica speciosa*. As larvas radiculares se orientaram preferencialmente em direção às raízes de plantas não inoculadas e ganharam menos peso ao se alimentar de plantas inoculadas. Como a inoculação por *A. brasilense* induz maiores emissões de (E)- β -cariofileno em comparação com plantas não inoculadas, é entendível que a não preferência de *D. speciosa* por plantas inoculadas esteja relacionada a esse sesquiterpeno, que é conhecido por mediar interações solo-inseto abaixo do solo.

Os artigos acima citados são alguns estudos que demonstram os diversos benefícios trazidos pela inoculação com *A. brasilense*. Esses mecanismos em conjunto induzem o aumento do comprimento e maior número de raízes e pêlos radiculares, facilitando a absorção de nutrientes, maior tamanho de planta, coloração mais verde das folhas e aumento da produtividade de grãos (BASHAN; BASHAN, 2010; HUNGRIA, 2011; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013). Para que seja bem-sucedida a interação entre a planta-bactéria, depende da relação da espécie da planta com a da bactéria, bem como as condições ambientais favoráveis (SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013).

2.4.4 *Herbaspirillum seropedicae*: Identificação, associação com as plantas e benefícios desta associação

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* compreendem espécies β -proteobactérias conforme a LPSN (2020b) esse gênero é composto por 12 espécies, sendo apenas *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*, *H. frisingense*, *H. lusitanum*, *H. hiltneri* com potencial para a interação com plantas, as quais têm sido encontrados em associação com uma grande variedade de vegetais, mais particularmente com os membros da família Poaceae. As outras 7

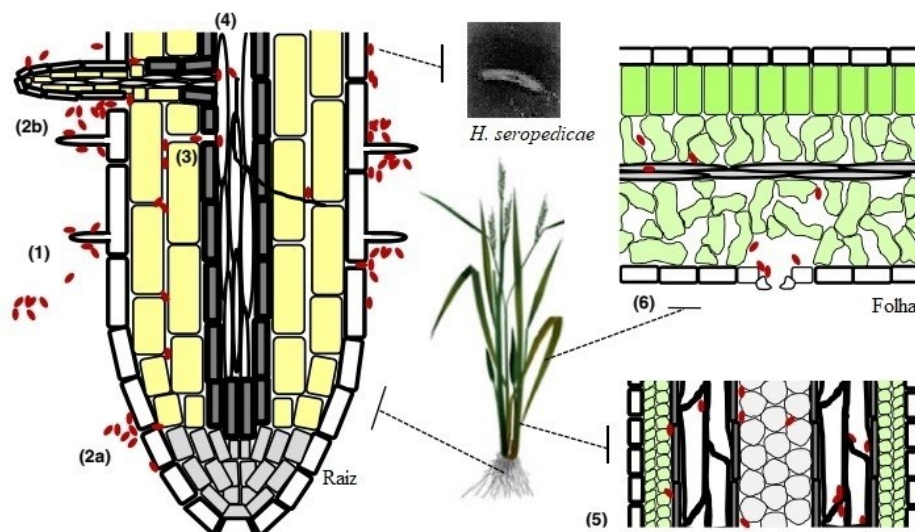
espécies vivem em diferentes ambientes, como solos poluídos, ambientes aquáticos ou até em pulmão de pessoas com fibrose cística. *H. seropedicae* é a espécie mais estudada quando o assunto é associação com plantas (MONTEIRO *et al.*, 2012).

H. seropedicae foi isolado da rizosfera de raízes de milho, sorgo e arroz pela primeira vez em 1984, no entanto foi classificado como *Azospirillum seropedicae*, devido as semelhanças com o gênero *Azospirillum*. Em 1986, dois anos após a descoberta, com estudos de homologia de DNA:DNA foi identificado um novo gênero, *Herbaspirillum* e assim renomeado de *H. seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986; BALDANI; BALDANI, 2005).

H. seropedicae é uma bactéria Gram-negativa, endofítica, com formato podendo variar entre helicoidal e vibróide, possui de um a três flagelos, apresenta diâmetro da célula de 0,6 a 0,7 μm e o comprimento da célula varia de 1,5 a 5 μm . A cepa SmR1 é a mais estudada da espécie, mutante espontânea resistente ao antibiótico estreptomicina da linhagem Z78 (ATCC 35893) e teve seu genoma completo sequenciado e publicado sob número de acesso no GenBank NC_014323.1 (BALDANI *et al.*, 1986; PEDROSA *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2012).

Conforme estudo feito por Chi *et al.* (2005) demonstram que as bactérias endofíticas são principalmente recrutadas pelas raízes e posteriormente translocam para o restante da planta. A associação das plantas com *H. seropedicae* pela raiz (Figura 3) tem início com a quimiotaxia, atraindo as bactérias para a rizosfera. Após esse processo, *H. seropedicae* entra em contato com os tecidos radiculares da planta, ocorrendo a adesão da bactéria a superfície das raízes preferencialmente nos pontos de emergência em raízes laterais. A penetração ocorre pelas fissuras radiculares laterais e zonas de alongamento, atingindo os vasos do xilema juntamente com espaços intercelulares, ocorrendo a colonização endofítica na planta, podendo ser encontrada em folhas, brotos e cavidades subestomatais (MONTEIRO *et al.*, 2012). Conforme Pedrosa *et al.* (2011), *H. seropedicae* não possui genes para degradar as paredes celulares das plantas no entanto, é um endófito de sucesso, confirmando a existência de outras estratégias para penetrar nos tecidos vegetais.

Figura 3 – Colonização de plantas por *H. seropedicae*. A associação de *H. seropedicae* (pontos vermelhos) inicia-se pela quimiotaxia da bactéria até a raiz da planta e fixação na superfície das raízes, preferencialmente na zona de pêlos radiculares (1). A maioria das bactérias permanece nas superfícies radiculares, mas algumas penetram através de algumas discontinuidades da epiderme, como a zona de alongamento (2a) e rachaduras radiculares laterais (2b), então ocorre uma ocupação rápida dos espaços intercelulares das raízes, juntamente com a colonização do aerênquima (no arroz) e do xilema (3). Algumas bactérias se movem das raízes para a parte aérea por meio do xilema (4), colonizando os brotos (5) e folhas (6), onde podem espalhar-se em espaços intercelulares e cavidades subestomais.



Fonte: Adaptado de Baldani *et al.* (1986) e Monteiro *et al.* (2012).

Nas folhas e no caule normalmente os estômatos e lenticelas são as aberturas que facilitam a entrada na parte aérea da planta, ocorrendo a colonização nas células da epiderme superior, mesófilas, vasos do xilema e os espaços intercelulares (LIU *et al.*, 2017). Baldotto; Olivares; Bressan-Smith (2011) estudaram a colonização de *H. seropedicae* linhagem RAM 10 marcada com GFP em folhas de abacaxi (*Ananas comosus*) e puderam identificar que quando a bactéria é inoculada na folha, em caso de pulverização foliar por exemplo, nos primeiros dias ela se encontrava nos tricomas, a partir do sétimo dia colonizou as junções epidérmicas da parede celular além da periclinal externa de células epidérmicas e estômatos. A penetração da *H. seropedicae* nos tecidos vegetativos começa pela câmara subestomática e se espalha através dos espaços intercelulares do clorênquima esponjoso do mesofilo foliar.

Após a associação planta-bactéria estabelecida, *H. seropedicae* pode promover o crescimento vegetal por meio de diferentes mecanismos como fixação de nitrogênio, produção de sideróforos, liberação de fito-hormônios, indução de resistência das plantas às condições de estresse biótico e abiótico (PEDROSA *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2012).

H. seropedicae apresenta em seu genoma 15 genes de fixação de nitrogênio, sendo eles *nifA*, *nifB*, *nifZ*, *nifZ1*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifQ*, *nifW*, *nifV*, *nifU* e *nifS*, fator que evidencia a capacidade de FBN (PEDROSA *et al.*, 2011). Diversos trabalhos vêm confirmando o potencial de FBN desta espécie. Pode-se salientar os estudos feitos por Ferrari *et al.* (2014) que avaliaram o perfil proteico de raízes de milho inoculadas com *H. seropedicae* identificando a proteína dinitrogenase redutase. Olivares *et al.* (2015) estudaram a inoculação foliar e no substrato com *H. seropedicae*+ Humus, resultando no aumento da captação de nitrato e atividade de nitrato redutase em tomate e Brusamarello-Santos *et al.* (2017) confirmaram que nos estágios iniciais do desenvolvimento do milho *H. seropedicae* foi capaz de reduzir o acetileno, sugerindo atividade funcional da nitrogenase.

Costa *et al.* (2014) em seu estudo, demonstraram que o gênero *H. seropedicae* apresentou cepas que não possuem a capacidade de solubilizar fosfatos e estão associadas com uma baixa produção de sideróforos. No genoma da *H. seropedicae* Pedrosa *et al.* (2011) encontraram 27 genes envolvidos no transporte e metabolismo do ferro.

Conforme estudo feito por Brusamarello-Santos *et al.* (2012) a diminuição da expressão de proteínas relacionadas à defesa PBZ1 e tioninas no arroz foi responsivo a inoculação com *H. seropedicae*, sugerindo que a bactéria modulou respostas de defesa de plantas durante a colonização.

A expressão de genes responsivos ao etileno e giberilina é regulado pela *A. seropedicae*. O etileno é um hormônio vegetal sintetizado a partir de ACC sintase, uma enzima ativada pelo AIA sob condições de estresse biótico e abiótico. O ACC é convertido em etileno por ACC oxidase. Um gene que codifica ACC desaminase está presente na *H. seropedicae*, o qual compete com o ACC oxidase modulando os níveis de etileno nas plantas, diminuindo a resposta ao estresse promovida pelo etileno (PEDROSA *et al.*, 2011). Amaral *et al.* (2014) demonstraram que a inoculação com *H. seropedicae* aumentou a expressão do gene *ZmKol*, o qual é envolvido na via da biossíntese de giberilina.

Estudos recentes demonstram os benefícios da bactéria quando associada com diferentes famílias de plantas de interesse econômico, como a alface (*Lactuca sativa*), couve chinesa (*Brassica rapa L. ssp. perkinensis*) trigo (*Triticum aestivum*), abacaxi (*Ananas comosus*) arroz (*Oryza sativa*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) e milho (*Zea mays*) (BALDOTTO; OLIVARES; BRESSAN-SMITH, 2011; AMARAL *et al.*, 2014; CHAVES *et*

al., 2015; BALSANELLI *et al.*, 2016; HOSEINZADE *et al.*, 2016; LEE; LEE; CHAE, 2016; MEIRELLES; BALDOTTO; BALDOTTO, 2017).

2.5 EFEITOS DOS ATRIBUTOS DO SOLO SOBRE O ESTABELECIMENTO DA SIMBIOSE ENTRE PLANTA-BACTÉRIA

O sucesso da inoculação com BPCV depende de alguns fatores como sobrevivência da bactéria no solo, compatibilidade com a cultura inoculada e a capacidade de competir com a microbiota do solo. Além dos fatores ambientais como radiação UV, precipitação e altas temperaturas, fatores como manejo do solo (fertilização e rotação de culturas) e propriedades do solo (pH, teor de matéria orgânica, nutrientes e textura) também influenciam no sucesso da inoculação. As mudanças nas condições do solo podem, por sua vez, levar a uma mudança adicional na composição da microbiota das plantas (MARTINEZ-VIVEROS *et al.*, 2010; ZHANG; VIVANCO; SHEN, 2017; RILLING *et al.*, 2019).

A quantidade de células inoculadas e que se estabelecem no hospedeiro, é importante para a efetivação dos benefícios das BPCV. A dose do inoculante pode promover em diferentes graus a promoção do crescimento em plantas. De forma geral, os inóculos costumam conter de 10^8 a 10^9 células mL^{-1} . Após a inoculação na planta com altas densidades de células bacterianas, o número de células pode sofrer um rápido declínio, dependendo se o solo for esterilizado ou não. Em solos autoclavados, a concentração de células bacterianas muito provavelmente persistira entre 10^7 a 10^8 células mL^{-1} no solo por muitas semanas. Em solos não estéril onde há competição com a microbiota residente, as populações bacterianas diminuem rapidamente até a população atingir o equilíbrio com o meio (MARTINEZ-VIVEROS *et al.*, 2010).

Alguns componentes do solo contribuem para a colonização e sobrevivência bacteriana. A estrutura do solo pode restringir ou facilitar a capacidade de um microrganismo se mover em direção a planta, o pH do solo pode restringir o crescimento bacteriano, as partículas do solo podem adsorver ou imobilizar as células bacterianas, a porosidade e estrutura do solo também podem afetar os reservatórios locais da biodiversidade microbiana (WEI *et al.*, 2020).

O pH exerce efeito indireto sobre os microrganismos do solo como na composição da comunidade microbiana, condições de solubilidade e toxidez de nutrientes e efeitos diretos como é no caso da efetiva colonização bacteriana na planta. Fernández-Calviño; Bååth (2010)

comprovam que uma variação de 1,7 tanto para cima como para baixo no pH ideal para colonização bacteriana na planta pode reduzir o crescimento bacteriano, além de ser altamente influenciado pelo pH, apresentando um crescimento ótimo em pH próximo ao do solo e um crescimento menor em solos mais ácidos.

O tipo de solo e a nutrição que ele oferece está intimamente ligada com a efetivação da colonização da bactéria na planta (WEI *et al.*, 2020). A sobrevivência e o crescimento das bactérias recém-introduzidas no solo, são fortemente limitados pela competição por substratos orgânicos com os microrganismos já presentes. As BPCV são mais eficazes em solos com baixo teor de matéria orgânica ou solos estressados onde o crescimento da população microbiana presente no solo é restrito (MARTINEZ-VIVEROS *et al.*, 2010). O estudo de Zeffa *et al.*, (2018) demonstra uma forte influência dos níveis de nitrogênio presente no solo na eficiência da inoculação, visto que os efeitos positivos da inoculação foram significativos apenas na ausência de nitrogênio no solo.

O estudo de Ramirez; Craine; Fierer (2012) demonstrou efeito negativo na microbiota do solo adubado com doses de fertilizante nitrogenado, resultando na diminuição da capacidade de colonização pela bactéria. A adição de fertilizante nitrogenado diminuiu as taxas de respiração microbiana em 11% e a biomassa microbiana entorno de 35% ao longo de um ano, também alterou de forma substancial a composição da comunidade bacteriana. Concluíram que a adição de nitrogênio no solo de forma sintética deprime a atividade microbiana no solo, mudando a capacidade metabólica das bactérias, resultando em comunidades que são menos capazes de decompor o carbono do solo.

Além do estabelecimento das BPCV ser afetado pelas características químicas do solo, a FBN e os mecanismos da promoção de crescimento vegetal também são influenciados. Zeffa *et al.* (2019) observaram que a FBN aumentou sob condições limitantes de nitrogênio no solo. Costa *et al.* (2014) avaliaram o comportamento do *Azospirillum* em solo de alta ou baixa fertilidade. Em solos de alta fertilidade encontraram aumento na produção de compostos indólicos e apresentaram uma diminuição na produção de sideróforos.

O comportamento das BPCV também é alterado conforme a fertilidade que o solo oferece, característica que foi demonstrado por Costa *et al.* (2014), no seu estudo foi possível identificar um comportamento mais endofítico do gênero *Herbaspirillum* quando o solo é de baixa fertilidade. Característica que pode ser explicada como uma resposta a fertilização em

solos ricos em fertilidade nitrogenada, reduzindo a necessidade da interação com as cepas bacterianas diazotróficas. Dessa forma, as plantas não utilizam todo o potencial dos benefícios da interação planta-bactéria (BODDEY *et al.*, 2003).

O tipo de solo é outro fator que pode influenciar nos benefícios nas plantas inoculadas, sendo considerado um dos fatores mais importantes na formação do rizomicrobioma (ZHANG; VIVANCO; SHEN, 2017). O estudo de Ferreira *et al.* (2013) avaliou o tipo de solo e a eficiência da inoculação. Demonstraram que o milho cultivado em casa de vegetação com o uso de solo argiloso e arenoso, inoculado com *A. brasilense* obteve respostas melhores em solo argiloso, uma vez que um maior volume de solo foi explorado pelas raízes. No entanto, no trabalho de Fachinelli; Ceccon (2020) contrapõem o estudo de Ferreira. Concluíram que tanto para o solo arenoso quanto para o solo argiloso, o crescimento inicial e os componentes de produtividade da soja, inoculadas com *A. brasilense* ou *Bradyrhizobium japonicum* ou co-inoculadas, foi equivalente a adubação nitrogenada mineral, não sendo afetada pelo tipo de solo.

Em condições ambientais e de solo idênticas, estudos mostram que o genótipo da planta é o principal fator que influencia e altera o rizomicrobioma, indicando que a planta atua como um filtro do seu rizomicrobioma (ZHANG; VIVANCO; SHEN, 2017). Araujo *et al.* (2013) avaliaram 35 genótipos de milho com a inoculação de *H. seropedicae* e confirmaram que a promoção do crescimento vegetal, é dependente do genótipo da planta. Zeffa *et al.* (2019) também mostraram que depende do genótipo do milho para obtenção das melhores respostas, observaram esse resultado em 27 genótipos de milho inoculados com *A. brasilense*.

O genótipo e o estágio de desenvolvimento do vegetal, características bacterianas como formação de biofilme e adesão de superfície podem também determinar quem pode colonizar os compartimentos radiculares. Portanto, a estrutura do rizomicrobioma é o resultado da complexa interação planta-solo-bactéria (ZHANG; VIVANCO; SHEN, 2017).

A eficiência a campo de inoculantes bacterianos é um aspecto chave para a aceitação de bioinoculantes e uso agrícola mais amplo (OWEN *et al.*, 2015). A eficácia do inoculante depende de sua versatilidade e adaptação às mudanças ambientais, bem como sua capacidade de colonizar e competir com outros microrganismos já presentes no solo e na planta, também devem superar e/ou se adaptar a fatores como características da planta, clima, composição e manejo do solo (RILLING *et al.*, 2019). Além dos vários benefícios de inoculação, outras tecnologias alternativas têm sido estudadas, como a co-inoculação bacteriana.

2.6 CO-INOCULAÇÃO DE BPCV

A grande maioria dos primeiros inoculantes bacterianos produzidos comercialmente, continham apenas uma espécie bacteriana com uma cepa ou no máximo duas cepas do mesmo gênero. A combinação de duas cepas do gênero *Bradyrhizobium* para a cultura da soja é utilizado comercialmente desde 1950, no milho é utilizado o conjunto de cepas do gênero *Azospirillum* (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). O uso de inoculantes bacterianos com gêneros diferentes tem expandido pois, a combinação de diferentes microrganismos benéficos pode gerar um efeito sinérgico, superando os resultados produtivos quando associados às plantas isoladamente, estimulando um ao outro, assim tornando-se uma importante tecnologia agrícola para melhorar o desempenho das culturas inoculadas (JARDIN, 2015).

A co-inoculação tem sido evidenciada e tem ganhado cada vez mais espaço no mercado, principalmente quando se considera a cultura da soja inoculada com *Bradyrhizobium* em conjunto com *Azospirillum*. No Brasil, a co-inoculação comercial desses gêneros foi lançado para soja e feijão no ano de 2014 (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019), desde então o aumento da adoção da técnica tem sido gradual, no ano de 2018-19 teve uma adoção de 15% a mais pelos produtores rurais na cultura da soja (HELMAN; BURDMAN; OKON, 2011; ANPII, 2019). Os benefícios principais dessa união são aumento da nodulação, maior comprimento radicular, estabilidade da planta em condições de estresses hídricos e por consequência, aumento da produtividade, para diversas culturas como mostra a Tabela 1.

A soja quando bem inoculada com BPCV pode fixar cerca de 30 kg N ha⁻¹ no solo para a cultura subsequente, ou seja, ela em conjunto com as BPCV fixam mais nitrogênio do que realmente precisa, oferecendo um efeito residual para a próxima cultura, como o milho, pois a sucessão soja e milho safrinha é comumente praticado no Brasil (HUNGRIA, 2011).

O efeito residual da co-inoculação em soja foi estudado por Cândido *et al.* (2020) onde, avaliaram o efeito da co-inoculação de *B. japonicum* e *A. brasilense* inoculados em soja e seus efeitos residuais nas características vegetativas e produtivas, em plantas de milho cultivado em sucessão a soja. Observaram aumento na massa seca da raiz nas plantas de milho em duas safras, no entanto para as avaliações, altura da planta, altura da inserção da primeira folha, diâmetro do colmo, índice SPAD, massa seca da parte aérea, número de grãos por espiga, peso de mil

grãos e o rendimento de grãos não ocorreu aumento significativo. Devido a soja ser a cultura mais inoculada em todo o mundo e o Brasil ser o líder mundial no uso de inoculantes nessa cultura, é importante compreender os efeitos residuais deixados pela soja (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019).

Azospirillum é o gênero entre as BPCV mais estudado e empregado como inoculante no mundo, incluindo o Brasil (HUNGRIA *et al.*, 2010). Dentre esse gênero, *A. brasilense* desenvolve respostas satisfatória em co-inoculação com diversos gêneros bacterianos, destacando o *Bradyrhizobium* e o *Rhizobium*. Os benefícios foram comprovados por diversos trabalhos que corroboram com diferentes plantas, como trigo, tomate, morango, feijão, ervilhaca e amendoim (Tabela 1).

Dentre a literatura é incipiente o uso da *H. seropedicae* na co-inoculação, os trabalhos mostram benefícios comprovados em cana-de-açúcar, feijão, sorgo, orquídea, brachiaria, setaria e arroz, resultando em aumento na biomassa total da planta, N foliar, comprimento da raiz e parte aérea, número de nódulos em feijão e melhor recuperação do vegetal em estresse hídrico (MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009; DEEPADEVI; BASU; SANTHAGURU, 2010; PANKIEVICZ *et al.*, 2015; AMARAL *et al.*, 2016; HOSEINZADE *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2016; MELO *et al.*, 2017).

A literatura relata trabalhos de co-inoculação na cultura do milho com diversos gêneros de BPCV como *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Pseudomonas* e *Bacillus*. Conforme apêndice A o conjunto desses gêneros trazem benefícios já comprovados, como aumento da produtividade, aumento da germinação de sementes, melhora nas avaliações morfométricas da planta e indução de resistência das plantas às condições de estresse biótico e abiótico (KIM *et al.*, 2012; PANDE; PANDEY; KAUSHIK, 2017; FUKAMI *et al.*, 2018). Entretanto, apenas alguns trabalhos relatam a co-inoculação com *A. brasilense* e *H. seropedicae* em milho, como o trabalho de Dartora *et al.* (2016) onde, encontraram incrementos de 12% de quantidade de fósforo na folha de milho (cv. 30R50) e Guimarães *et al.* (2014) que utilizaram o mesmo conjunto de bactérias e não encontraram resultados morfométricos substanciais na cultivar de milho DKB 390..

A co-inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* em diferentes genótipos de *Brachypodium distachyon* foi descrito por Amaral *et al.* (2016) que encontraram uma ampla gama de respostas positivas e negativas entre os genótipos de *B. distachyon*, sugerindo que a promoção do crescimento vegetal por bactérias benéficas foi fortemente afetada pelo genótipo

da planta. Pankievicz *et al.* (2015) estudaram esse conjunto de bactérias na gramínea modelo *Setaria viridi* e encontraram como resposta da inoculação, aumento no peso seco da parte aérea de 82,2%, comprimento da raiz em 28,6%, número de raízes laterais em 39,6% e maior rendimento na produção de sementes. O experimento foi conduzido em substrato com baixo nitrogênio (0,5 mM KNO₃) ou sem adição de nitrogênio. Outro resultado que deve ser mencionado é que ocorreu a FBN em nível suficiente para suprir a demanda diária de N da planta em condições controláveis de laboratório.

Helman; Burdman; Okon (2011) indicaram que existem diferentes aspectos da co-inoculação a serem estudados, como o estudo de novas linhagens de combinações de bactérias com diferentes genótipos de plantas, formulações comerciais para o desenvolvimento de produtos com o consorcio de bactérias em larga escala para comercializar, bem como, ressalta a importância de estudos que demonstrem a relevância da colonização endofítica, sendo necessário investigar profundamente as possíveis vantagens da colonização endofítica em comparação/associação com a colonização da superfície radicular.

A eficiência da co-inoculação está intimamente relacionada a seleção apropriada de cepas, a concentração celular de cada um, método de inoculação e genótipo da planta (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019). A concepção, formulação e otimização de inoculantes bacterianos eficazes de co-inoculação, requer uma compreensão profunda dos modos de interação, adesão e colonização bacteriana às sementes e/ou tecidos vegetais inoculados (MOLINA-ROMERO *et al.*, 2017).

A co-inoculação de microrganismos representa uma tática barata e inovadora, que ainda está nos primórdios de adoção na agricultura em larga escala (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). São de suma relevância trabalhos que incentivam o uso dessa tecnologia. A introdução de bactérias benéficas no solo tende a ser menos agressivo e causar menos impacto ao meio ambiente do que a fertilização química, o que a torna uma prática agrônômica sustentável e uma maneira de reduzir os custos de produção (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015). Desta forma, contemplando benefícios ambientais, agrônômicos e econômicos com resultados promissores, sendo importante o desenvolvimento de estudos que aprimorem a sua utilização e que explorem os diversos conjuntos bacterianos, de modo que possa ser aplicada com eficiência em uma agricultura sustentável (GOSWAMI; THAKKER; DHANDHUKIA, 2016).

Tabela 1 – Co-inoculação com *A. brasilense* em diferentes culturas e com diferentes gêneros bacterianos.

Co-inoculação	Cultura	Benefícios	Referência
<i>A. brasilense</i> ; <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Soja	Aumento da produção em média 16,1%; Número de nódulos e seu peso fresco; N em 23%; Hemoglobina 39%; Comprimento total da raiz; Número de raízes e pêlos radiculares; Matéria seca das raízes e parte aérea; Comprimento total das plantas; Nodulação precoce; Melhorou a estabilidade da membrana foliar sob condições de estresse hídrico; Reduziu a taxa de aborto de vagem sob estresse moderado por seca.	(GROPPA; ZAWOZNIK; TOMARO, 1998) (MOLLA <i>et al.</i> , 2001) (MOLLA; SHAMSUDDIN; SAUD, 2006) (AUNG <i>et al.</i> , 2013) (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013) (CHIBEBA <i>et al.</i> , 2015) (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015) (FERRI; BRACCINI; CAIUBI, 2017) (PUENTE <i>et al.</i> , 2017) (BULEGON <i>et al.</i> , 2017) (GALINDO <i>et al.</i> , 2018) (SILVA <i>et al.</i> , 2019)
<i>A. brasilense</i> ; <i>Bradyrhizobium</i>	Amendoim	Aumento do comprimento do caule; Comprimento da raiz; Peso seco da parte aérea e da raiz; Número de nódulos.	(VICARIO <i>et al.</i> , 2016) (BURDMAN; KIGEL; OKON, 1997)
<i>A. brasilense</i> ; <i>Rhizobium tropici</i>	Feijão	Aumento do rendimento em 19,6%; Número de nódulos 9%; Fixação de N ₂ ; Peso seco de nódulos 25%; Peso seco da raiz 35% e parte aérea 31%.	(HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013) (ARAÚJO <i>et al.</i> , 2016) (PERES <i>et al.</i> , 2016) (SOUZA; FERREIRA, 2017)
<i>A. brasilense</i> ; <i>R. meliloti</i>	Trigo	Aumento do rendimento de grãos em 53,8%; Teor de N 22,8%, P 59,5% e K 34% dos grãos.	(ASKARY <i>et al.</i> , 2009)

<i>A. brasilense</i> ; <i>R. leguminosarum</i>	Ervilhaca	Aumento da densidade de pêlo radicular; Matéria seca da parte aérea; Nodulação.	(STAR <i>et al.</i> , 2012)
<i>A. brasilense</i> ; <i>H. seropedicae</i>	Braquipódio	Aumento do comprimento e peso seco das raízes; Comprimento e peso seco da parte aérea.	(AMARAL <i>et al.</i> , 2016)
<i>A. brasilense</i> ; <i>H. seropedicae</i>	Setaria	Peso seco da parte aérea aumentou 82,2%, comprimento da raiz aumentou 28,6% e o número de raízes laterais aumentou 39,6%.	(PANKIEVICZ <i>et al.</i> , 2015)
<i>A. brasilense</i> ; <i>Methylobacterium oryzae</i>	Tomate, pimenta e arroz	Aumento do comprimento da parte aérea e da raiz; Absorção de nutrientes.	(MADHAIYAN <i>et al.</i> , 2010)
<i>A. brasilense</i> ; <i>Azotobacter</i> spp.	Morango	Aumento significativo da altura das plantas; Teor de clorofila; Peso de raiz seca.	(RUEDA <i>et al.</i> , 2016)
<i>A. brasilense</i> ; <i>Burkholderia vietnamensis</i>	Morango	Maior índice de crescimento (30%) e teor relativo de clorofila nas folhas; Aumento do rendimento comercial de frutos.	(LOVAISA; MOLINA; SALAZAR, 2015)
<i>A. brasilense</i> ; <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Tomate	Aumento do comprimento da raiz; Número de pêlos radiculares; Massa seca total.	(BOTTA <i>et al.</i> , 2013)

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da co-inoculação de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* via aplicação foliar e na radícula do milho sobre o crescimento, nutrição mineral e quantificação de DNA bacteriano nas plantas em condições de solo de baixa fertilidade natural.

3.1.1 Objetivos Específicos

Avaliar o comportamento das bactérias *Azospirillum brasilense* FP2 e *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 co-inoculadas nas radículas de milho, em experimento conduzido em condições de cultivo *in vitro*.

Avaliar variáveis de crescimento vegetal e absorção de nitrogênio nas plantas de milho crescidas em solo com baixa fertilidade natural, em casa de vegetação, após co-inoculação de *A. brasilense* FP2 nas raízes e *H. seropedicae* SmR1 na parte aérea.

Quantificar por meio das técnicas de determinação de unidade formadora de colônia (UFC) e PCR em tempo real (qPCR) a população bacteriana de *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SmR1 nas raízes e parte aérea das plantas de milho co-inoculadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A. brasilense linhagem FP2 (linhagem Sp7 ATCC29145 Nal^R Sm^R) (PEDROSA; YATES, 1984) foi inicialmente cultivado em meio sólido NFbHPN (NFbN High Phosphate – 1,5 mg L⁻¹) (MACHADO *et al.*, 1991) suplementado com 5 mg L⁻¹ de lactato de sódio, com adição dos antibióticos estreptomicina (Sm) e ácido nalidíxico (Nal) nas concentrações finais de 80 µg mL⁻¹ e 10 µg mL⁻¹ respectivamente.

H. seropedicae linhagem SmR1 (linhagem Z78 ATCC 35893 Sm^R) (BALDANI *et al.*, 1986) foi cultivada em meio sólido NFbHPN, suplementado com 5 mg L⁻¹ de ácido málico com adição do antibiótico Sm na concentração final de 80 µg mL⁻¹ (KLASSEN *et al.*, 1997).

Após o esgotamento em placa e crescimento por período de 48 horas, as colônias isoladas foram repicadas em meio de cultivo líquido específico para *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SmR1, sob agitação (120 rpm) a 30 °C até atingir a densidade óptica de 0,8 (~10⁸ células mL⁻¹) em comprimento de onda de 600 nm (DO₆₀₀) medido em Espectrofotômetro Hitachi U2910 (Tokyo, Japan).

Para determinar o número de UFC das bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae* inoculadas nas plantas de milho, foi utilizado o método *drop plate*. Foram maceradas 0,1 g de raízes e folhas separadamente, com 1 mL de solução salina 0,9% estéril seguido de diluição seriada 10⁻¹ a 10⁻⁷ em solução salina 0,9% estéril e seguidas para cultivo em placa em seus respectivos meios de cultivo sólido. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas e as colônias foram contadas (STETS *et al.*, 2015).

Para as plantas que receberam os tratamentos controle e co-inoculado, quando analisado o tecido radicular, a contagem foi observada nos dois meios de cultura. Para o tecido foliar a contagem ocorreu apenas nas placas referentes ao meio de cultura da bactéria *H. seropedicae*, uma vez que *A. brasilense* tem como característica a colonização da superfície do tecido vegetal e o mesmo foi inoculado apenas nas raízes.

Para a avaliação do inóculo, ou seja, da cultura bacteriana pura, as metodologias de diluição seriada e plaqueamento ocorreram da mesma forma, no entanto, a diluição seriada foi de 10⁻¹ a 10⁻⁶.

4.2 CONDIÇÕES DE GERMINAÇÃO E INOCULAÇÃO DAS SEMENTES DE MILHO

Para os três ensaios foi utilizada a variedade de milho DKB 390 (CARDOZO, 2017; ARAUJO *et al.*, 2013). As sementes foram lavadas 3 vezes com água destilada autoclavada, posteriormente para obter uma desinfecção superficial foram submergidas em etanol 70% por 3 minutos e após, em uma solução de hipoclorito de sódio 2% e Tween20[®] 2,5% por 30 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas com água destilada autoclavada por 3 vezes (RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003), transferidas para papel filtro úmido e armazenadas em câmara de germinação por 3 dias a 25 °C no escuro, conforme descrito por Brasil (2009).

As plântulas de milho pré-germinadas foram inoculadas com as culturas bacterianas após a diluição para 10^7 células mL⁻¹ em solução salina 0,9% estéril (um mL de inóculo por semente). No ensaio *in vitro* as sementes que receberam o tratamento de co-inoculação foi utilizado uma mistura das duas bactérias na mesma proporção. As sementes do grupo controle foram inoculadas nas mesmas condições sem a adição da bactéria, somente com solução salina 0,9% estéril. A suspensão de inóculo e sementes foram acondicionados em um agitador orbital à 80 rpm por 30 minutos (BALSANELLI *et al.*, 2010). Após a inoculação, as sementes foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio *Plant Medium* (EGENER; HUREK; REINHOLD-HUREK, 1999) modificado, sem fonte de nitrogênio e carbono.

No primeiro ensaio em casa de vegetação o processo de inoculação com *A. brasilense* FP2 nas sementes pré-germinadas seguiu o mesmo processo descrito no experimento *in vitro*, no entanto para a diluição das células bacterianas foi utilizado o meio de cultivo NFbHPN lactato 50% e no final foi realizado uma lavagem das mesmas com solução salina 0,9% estéril (BALSANELLI *et al.*, 2010). Para o segundo ensaio, o processo de inoculação da *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SmR1 seguiu a mesma metodologia, entretanto, a diluição das células bacterianas ocorreu com solução salina 0,9% estéril no lugar do meio de cultivo da bactéria. As sementes controle foram inoculadas nas mesmas condições, no entanto, sem a adição da bactéria. Após a inoculação as sementes foram transferidas para os vasos. As sementes que receberiam somente a inoculação com *H. seropedicae* SmR1 na parte aérea, não foram submetidas a nenhuma inoculação antes do plantio.

A inoculação da parte aérea foi realizada de forma manual com o auxílio de um borrifador com 10 mL de inóculo, sendo aspergido cerca de 1 mL do inóculo da bactéria *H. seropedicae* SmR1 por planta. As plantas inoculadas com *H. seropedicae* SmR1 foram as que receberam o tratamento com inoculação somente de *H. seropedicae* SmR1 e as plantas co-

inoculadas. A inoculação ocorreu no estágio V2 no horário mais fresco do dia conforme Fukami *et al.* (2016). As plantas controle foram aspergidas somente com o meio de cultivo líquido NFbHPN ácido málico 20%.

4.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E ANÁLISES DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL NO ENSAIO *IN VITRO*

A condução do experimento *in vitro* e das análises laboratoriais ocorreram em julho de 2019 e foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL), no Centro de Ciências Agrárias (CCA), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis.

Após a inoculação, as plântulas foram transferidas para tubos de ensaio, os quais foram acondicionados após sorteio sob delineamento inteiramente casualizado, em câmara de germinação a 16 horas de fotoperíodo, 25 °C e 40% de umidade relativa. A cada coleta foi aplicado um novo sorteio para a randomização das unidades experimentais.

Devido ao uso de análises destrutivas, o experimento foi delineado para conter quatro repetições biológicas em cada tratamento, sendo cada uma composta por quatro plantas, totalizando 192 ao final do experimento. Para cada tratamento foram coletadas as plantas aos 3, 7 e 9 D.A.I. Os tratamentos utilizados foram: controle, inoculação com *A. brasilense* FP2, inoculação com *H. seropedicae* SmR1 e co-inoculação com *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SmR1, sendo todos os tratamentos inoculados nas radículas das sementes de milho pré-germinados.

As análises do experimento consistiram na quantificação de DNA bacteriano por qPCR, contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC) por *drop plate*, avaliação do comprimento de raiz e parte aérea com o auxílio de uma régua graduada, partindo do ponto de inserção entre a raiz e a parte aérea de cada planta e massa seca da raiz e parte aérea utilizando estufa à 65 °C até peso constante. Após as avaliações morfométricas, as raízes e a parte aérea das plantas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer a – 80 °C para posterior extração de DNA e análise molecular.

4.4 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E ANÁLISES DA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL NOS ENSAIOS EM CASA DE VEGETAÇÃO

Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) no Centro de Ciências Biológicas (CCB) e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (CAL), no Centro de Ciências Agrárias (CCA), ambos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis.

Os dois solos foram coletados em uma área de empréstimo com baixa fertilidade natural na camada de 0 – 20 cm em mata secundária no município de Florianópolis, estado de Santa Catarina, Brasil (-27.578016, -48.501443). Foram classificados como Argissolo Vermelho-Amarelo de textura franco arenosa (SANTOS, 2018), as análises físico-químicas foram feitas conforme Tedesco *et al.* (1995) e estão descritas nas Tabelas 2 e 3. Para o primeiro ensaio o solo era distrófico.

No segundo ensaio foi utilizado solo de segundo cultivo, sendo aplicado correção da adubação no primeiro cultivo conforme recomendação do Manual de Adubação e Calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (MANUAL, 2004) (correção do pH para 6 com adição equivalente a 7,7 toneladas de calcário calcítico por hectare e adubação com Superfosfato triplo na quantidade de 189,02 Kg ha⁻¹ e Cloreto de potássio 254,09 Kg ha⁻¹) e cultivado soja. O solo foi peneirado em malha de 2 mm e não foi realizado correção nutricional, nem esterilização do mesmo. Em vasos de 3,6 L foram plantadas três sementes, logo nos primeiros dias no início do desenvolvimento do milho ocorreu o desbaste mantendo apenas 2 plantas por vaso.

Tabela 2 - Análise físico-química do solo coletado em Florianópolis, em área de empréstimo. Solo caracterizado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico de textura franco arenosa.

P (mg dm ³)	K (mg dm ³)	MO (%)	pH (H ₂ O)	Areia (g Kg ⁻¹)	Silte (g Kg ⁻¹)	Argila (g Kg ⁻¹)
2,12	1,4	1,5	4,4	658	249	93

Tabela 3 - Análise físico-química do solo coletado em Florianópolis, em área de empréstimo. Solo de segundo cultivo, caracterizado como Argissolo Vermelho-Amarelo de textura franco arenosa.

P (mg dm ³)	K (mg dm ³)	MO (%)	pH (H ₂ O)	Areia (g Kg ⁻¹)	Silte (g Kg ⁻¹)	Argila (g Kg ⁻¹)
13,2	100	1,3	6,5	660	250	90

Os tratamentos foram: controle, sem inoculação de bactéria; inoculação nas sementes pré-germinadas com a bactéria *A. brasilense* FP2 (Azos); inoculação da parte aérea com *H. seropedicae* SmR1 (Herbas) no estágio fisiológico da planta de milho V2 (vegetativo, segunda folha); co-inoculação de *A. brasilense* FP2 nas sementes pré-germinadas e na mesma planta, inoculação da bactéria *H. seropedicae* SmR1 na parte aérea no estágio fisiológico da planta de milho V2 (Azos+Herbas).

O delineamento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições biológicas dispostas em duas bancadas. No primeiro ensaio as coletas ocorreram aos 14 e 21 dias após a inoculação da *A. brasilense* FP2. Devido as avaliações destrutivas, as duas plantas em cada unidade experimental foram totalmente utilizadas, desta forma, foram empregadas 4 unidades experimentais (vasos) para cada tratamento, totalizando 32 vasos.

Para o segundo ensaio, foram realizadas coletas aos 7, 14, 21 e 28 D.A.I de todos os tratamentos, desta forma foram utilizados 16 vasos para cada tratamento, totalizando 64 vasos no total. A irrigação foi com água potável em quantidade e dias que mantiveram 50% da umidade do solo para os dois experimentos.

As unidades experimentais foram randomizadas entre duas bancadas, no entanto, no momento da aplicação do inoculante foliar, os tratamentos foram divididos entre os tratamentos que não receberam inoculação na parte aérea ficando na bancada A e na bancada B ficaram os tratamentos que receberam inoculação na parte vegetativa, essa divisão ocorreu para evitar a contaminação entre os tratamentos. Após um dia de separação, os vasos foram dispostos novamente conforme novo sorteio.

As variáveis avaliadas em cada coleta para os dois experimentos foram: comprimento das raízes e parte aérea utilizando uma trena métrica, considerando a inserção entre a raiz e a parte aérea, diâmetro do colmo acompanhado com o auxílio de um paquímetro digital, sendo avaliado na parte superior e basal do colmo, índice SPAD utilizando o medidor de clorofila portátil (SPAD-502Plus, Japão) (GHORCHIANI; ETESAMI; ALIKHANI, 2018), comprimento e largura foliar com o auxílio de uma régua graduada. As avaliações nas folhas foram feitas em folhas totalmente expandidas, saudáveis e duas leituras por folha. As avaliações citadas acima, foram executadas em cada planta do vaso e após feito média dos valores. As avaliações da parte aérea (colmo e folhas) ocorreram com as plantas ainda em vaso.

Para o primeiro ensaio também foram feitas avaliações de massa seca da raiz e da parte aérea, a qual o material vegetal foi seco utilizando estufa com circulação de ar a 65 °C até peso constante e pesada em balança analítica. O nitrogênio total da parte aérea da planta do milho foi realizado por meio da metodologia de micro-Kjeldahl (TEDESCO *et al.*, 1995). Estas avaliações foram avaliadas considerando o vaso. A quantificação bacteriana por qPCR e contagem de UFC por *drop plate* também foram realizados. Após realizar as avaliações das variáveis de crescimento, as raízes e a parte aérea das plantas foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas em freezer a – 80 °C para posterior extração de DNA e avaliação molecular.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE DNA BACTERIANO POR qPCR EM MILHO CULTIVADO *IN VITRO* E EM CASA DE VEGETAÇÃO

4.5.1 Extração de DNA

Para extração do DNA genômico bacteriano do inóculo, utilizou-se 2 mL da cultura bacteriana contendo $\sim 10^8$ células mL⁻¹, o mesmo foi submetido ao protocolo de extração de acordo com o fabricante do Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega™, Madison, WI, USA).

Para a extração de DNA genômico de raízes e folhas de milho não inoculadas e inoculadas, as amostras foram submetidas ao protocolo hot CTAB de Sun *et al.* (2008), com modificações. O protocolo iniciou com a adição de PVP 1,5% diretamente no tubo falcon contendo 100 mL do tampão CTAB (CTAB 2%, Tris-HCl 0,1 M, NaCl 1,4 M, EDTA bissódico 0,2 M) e após submetido a 65 °C por 5 minutos, além disso, 4,5 µL de 2-mercaptoetanol foi adicionado diretamente. Após adição de 4 µL RNase as amostras foram incubadas em banho-maria a 65 °C por 60 minutos, foi adicionado 900 µL de CIA (Clorofórmio/Álcool isoamílico 24:1), centrifugado por 10 minutos a 14.000 rpm a 4 °C. Após recuperado o sobrenadante, foi adicionado CIA e repetido o processo de centrifugação e recuperação do sobrenadante. Após adição de 540 µL de isopropanol gelado, foi homogeneizado e incubado por 2 horas em -20 °C. Após foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm a 4 °C e descartado o sobrenadante. Foi lavado o precipitado bacteriano com 1 mL de álcool 70% e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm a 4 °C e descartado o sobrenadante. O precipitado bacteriano secou em temperatura

ambiente e após foi ressuspensos em 50 µL de água ultrapura, armazenado a 4 °C *overnight* e após congelado.

As concentrações de DNA foram determinadas em espectrofotômetro Thermo Scientific NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific, Delaware, USA), onde a concentração é estimada pela medida da absorbância da amostra em 260 nm e 280 nm.

4.5.2 Quantificação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* em milho por qPCR

A quantificação de DNA de *A. brasilense* e *H. seropedicae* inoculadas em plantas de milho cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação foi realizada utilizando equipamento ABI Prism™ 7500 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de 2X SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 1,25 µL de cada iniciador Azor2.1 F/R para *A. brasilense* na concentração final de 500 nM e 0,25 µL de cada iniciador HERBAS1 F/R para *H. seropedicae* na concentração final de 100 nM, além de água ultrapura e 10 ng µL⁻¹ ou 20 ng µL⁻¹ de DNA molde, para *A. brasilense* e *H. seropedicae*, respectivamente. As reações foram realizadas em duplicata técnica utilizando triplicata biológica para amostras inoculadas e duplicata biológica para o controle.

O protocolo de amplificação consistiu em incubação inicial a 50 °C durante 2 min, 95 °C de incubação durante 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 s e 60 °C durante 1 minuto. Todas as corridas de qPCR foram analisadas usando configurações automáticas do *software*.

Como controle negativo nas corridas foi utilizado DNA de outras espécies bacterianas previamente cultivadas conforme Pereira *et al.* (2014), sendo elas: *Pseudomonas aeruginosa*, *B. cereus*, *Escherichia coli*, *H. seropedicae* e *A. brasilense*.

4.5.3 Construção da curva padrão a partir da cultura pura de *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SmR1

O DNA extraído de cultura pura (inóculo) de cada bactéria foi utilizado para construção das curvas padrão C_q (ciclo de quantificação) versus log UFC, a partir de uma

diluição (10X) seriada do DNA em água ultrapura, cujas concentrações finais continham de 10^6 a 10^0 cópias de DNA genômico bacteriano, o que corresponde à 8,26 ng a 8,26 fg para *A. brasilense* FP2 e 6,04 ng a 6,04 fg para *H. seropedicae* SmR1.

O número de cópias de DNA foi obtido a partir do cálculo com base no tamanho do genoma de *A. brasilense* Sp24 com 7.53 Mpb (Genbank ASM23736V1) (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011), e *H. seropedicae* SmR1 de 5.51 Mpb (PEDROSA *et al.*, 2011), considerando a constante de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$) e a massa molecular média dos ácidos nucleicos (660 Da bp^{-1}), que correspondem a fórmula:
$$m = \frac{\text{Tamanho do genoma da bactéria} \times 660}{6,023 \times 10^{23}}$$

Os números de UFC correspondentes às concentrações de DNA foram determinados pela contagem de UFC em placa, a partir das mesmas alíquotas utilizadas no isolamento do DNA, como descrito por Ilha *et al.* (2016) com modificações. Os parâmetros de reação foram calculados com base nos valores de Cq versus o logaritmo do número de cópias de DNA. As eficiências de amplificação foram determinadas usando a equação $E = \left[10 \left(-\frac{1}{s}\right) - 1\right] \times 100$, onde E é a Eficiência calculada e s é o coeficiente angular (*slope*) obtido a partir da curva padrão. O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados com base no *Guidelines for verification of Analytical Methods from European Network of GMO Laboratories* (HOUGS; GATTO; ŽEL, 2017).

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram analisados quanto a normalidade pelo teste de Lilliefors e homogeneidade conforme teste de Levene dos dados para os três experimentos. Em seguida, os dados foram submetidos a análise de variância para cada tempo de coleta e teste de comparação de médias multivariadas Tukey ($\alpha = 0,05$) para os tratamentos que foram significativos na análise de variância, utilizando o *software* estatístico Statistica versão 7.0.

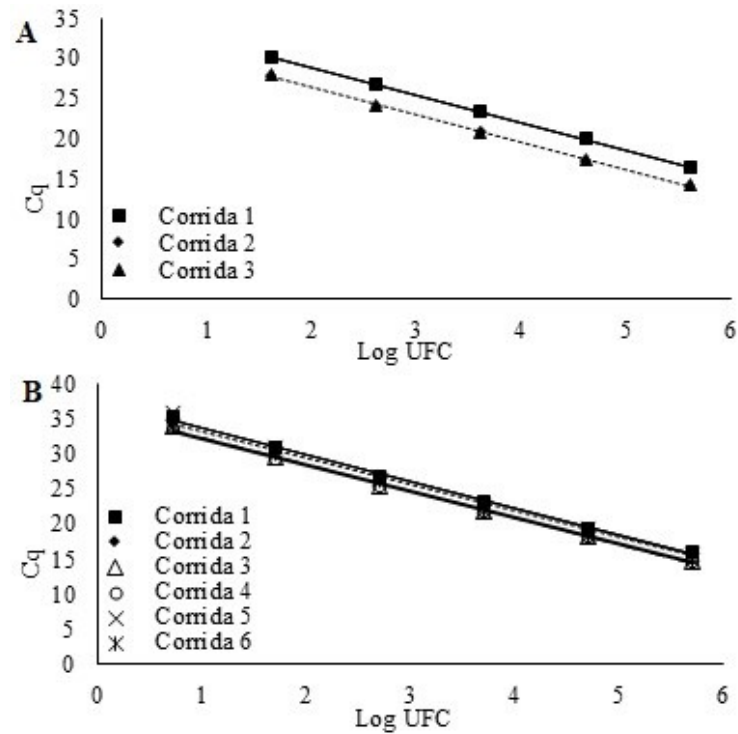
5 RESULTADOS

5.1 PARÂMETROS DE REAÇÃO DE qPCR PARA A QUANTIFICAÇÃO DE *A. brasilense* e *H. seropedicae* EM MILHO

Os parâmetros de reação (Eficiência, *Slope* e coeficiente de correlação) de qPCR para a quantificação de *A. brasilense* com os iniciadores AzoR2.1 foram determinados por meio de curvas padrão (três corridas independentes) obtidas a partir do DNA isolado das raízes de milho cultivadas *in vitro*, em casa de vegetação e de cultura pura. Para a quantificação de *H. seropedicae* foi utilizado o par de iniciadores HERBAS1, os parâmetros de reação foram determinados por meio de curvas padrão (seis corridas independentes) obtidas a partir do DNA isolado das raízes e folhas de milho cultivado *in vitro*, em casa de vegetação e de cultura pura 1 e 2. As curvas padrão foram obtidas a partir da diluição em série do DNA bacteriano extraído de cada cultura pura e os valores foram plotados em Cq versus log UFC (Figura 4).

As curvas padrão obtidas a partir da cultura pura de *A. brasilense* apresentaram valores de eficiência entre 95,43% e 96,35%, os valores de *Slope* (inclinação da curva) variaram entre -3,4125 e -3,4365 e o coeficiente de correlação (R^2) foi adequado para todas as curvas ($R^2 > 0,99$) (Tabela 4). Para as curvas padrão obtidas a partir de cultura pura de *H. seropedicae*, os valores de eficiência variaram entre 81,79% e 86,70%, os valores de *Slope* variaram de -3,6881 a -3,8525 e o R^2 apresentou valores adequados de 0,99 (Tabela 5).

Figura 4. Curvas padrão (Cq versus log UFC) para A) quantificação de *A. brasilense* utilizando DNA extraído de cultura pura utilizando iniciadores AzoR2.1. Quantificação realizada em três corridas independentes de qPCR em duplicata (n=6). B) quantificação de *H. seropedicae* utilizando DNA extraído de cultura pura utilizando iniciadores HERBAS1. Quantificação realizada em seis corridas independentes de qPCR em duplicata (n=12).



Fonte: Elaborada pela Autora (2020).

Tabela 4 – Parâmetros de qPCR obtidos das curvas padrão para a quantificação de *A. brasilense*, utilizando iniciadores AzoR2.1 e diluição em série de DNA obtido de cultura bacteriana pura.

Condição Experimental	<i>A. brasilense</i>		
	Eficiência (%)	Slope	R ²
<i>In vitro</i>	96,06	-3,4201	0,99
Casa de vegetação	96,35	-3,4125	0,99
Cultura pura	95,43	-3,4365	0,99

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Tabela 5 – Parâmetros de qPCR obtidos das curvas padrão para a quantificação de *H. seropedicae*, utilizando iniciadores Herbas1 e diluição em série de DNA obtido de cultura bacteriana pura.

Condição experimental	Tecido vegetal	<i>H. seropedicae</i>		
		Eficiência (%)	Slope	R ²
<i>In vitro</i>	Raiz	82,12	-3,8407	0,99
	Folha	84,75	-3,7513	0,99
Casa de vegetação	Raiz	82,79	-3,8174	0,99
	Folha	85,63	-3,7222	0,99
Cultura pura 1		86,70	-3,6881	0,99
Cultura pura 2		81,79	-3,8525	0,99

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

O limite de detecção (LOD) e o Limite de quantificação (LOQ) da qPCR com amostras de cultura pura de *A. brasilense* foi estabelecido em 10² cópias do genoma, correspondendo à 826 fg de DNA (Cq médio = 30,07). Para as amostras de cultura pura de *H. seropedicae* o LOD e o LOQ foram estabelecidos em 10¹ cópias do genoma, correspondendo a 60,4 fg de DNA (Cq médio = 34,52).

O desvio padrão da repetibilidade (% RSDr) e a veracidade (%Bias) dos valores de Cq foram calculados a partir de seis e doze reações de qPCR, para *A. brasilense* e *H. seropedicae*, respectivamente. Os valores variaram de 7,08 a 11,20% e -5,4 a 8,4% para *A. brasilense* (Tabela 6) e de 2,55 a 4,63% e -25,2 a 16,1% para *H. seropedicae* (Tabela 7).

Tabela 6 – Determinação da repetibilidade do ensaio de qPCR para quantificação de *A. brasilense*, por meio da média dos valores de Cq em três corridas independentes em duplicata (n=6), utilizando os iniciadores AzoR2.1. ^a Valores são média ± DP de duplicatas de qPCR em três corridas independentes realizadas em dias diferentes. ^b Desvio Padrão. ^c Desvio Padrão da Repetibilidade. ^d Veracidade.

Nº de cópias de DNA (diluição)	Quantidade de DNA (ng)	Cq médio ^a	DP ^b	%RSDr ^c	Número de cópias experimental	%Bias ^d
10 ⁶	8,26	16,36	1,83	11,20	959443	-4,1
10 ⁵	0,826	19,72	2,03	10,28	101668	1,7
10 ⁴	0,0826	23,20	2,04	8,80	9905	-0,9
10 ³	0,00826	26,52	2,10	7,92	1084	8,4
10 ²	0,000826	30,07	1,87	6,20	101	0,9

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Tabela 7 – Determinação da repetibilidade do ensaio de qPCR para quantificação de *H. seropedicae*, por meio da média dos valores de Cq obtidos em seis corridas independentes em duplicata (n=12), utilizando os iniciadores HERBAS1. ^a Valores são média ± DP de duplicatas de qPCR em seis corridas independentes realizadas em dias diferentes. ^b Desvio Padrão. ^c Desvio Padrão da Repetibilidade. ^d Veracidade.

Nº de cópias de DNA (diluição)	Quantidade de DNA (ng)	Cq médio ^a	DP ^b	%RSDr ^c	Número de cópias experimental	%Bias ^d
10 ⁶	6,04	15,47	0,72	4,63	748152	-25,2
10 ⁵	0,604	18,88	0,64	3,38	96374	-3,6
10 ⁴	0,0604	22,40	0,65	2,91	11609	16,1
10 ³	0,00604	26,27	0,67	2,55	1130	13,0
10 ²	0,000604	30,25	0,78	2,57	103	2,8
10 ¹	0,0000604	34,52	0,90	2,60	8	-21,1

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE *A. brasilense* E *H. seropedicae* POR qPCR EM MILHO CRESCIDO *IN VITRO*

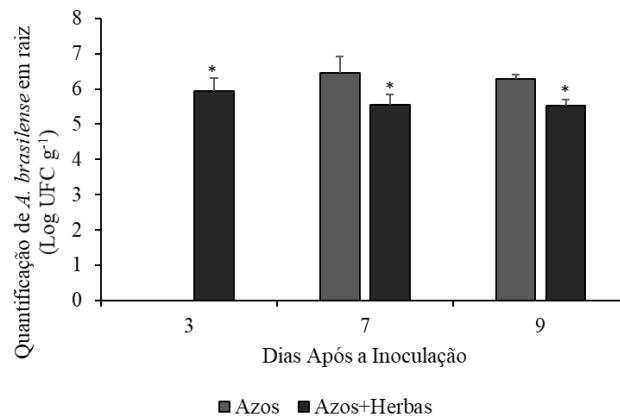
Para a quantificação de *A. brasilense* nas raízes, não foi detectado DNA da bactéria nas plantas controle em nenhum dos tempos de coleta. Para raízes de milho coletadas aos 3 D.A.I foram observadas ampliações apenas para amostras co-inoculadas (Azos+Herbas), sendo que a quantificação apresentou valores médios de $5,95 \pm 0,37$ log UFC g⁻¹. Aos 7 D.A.I os tratamentos Azos e co-inoculação (Azos+Herbas), corresponderam as médias $6,44 \pm 0,48$ e $5,54 \pm 0,31$ log UFC g⁻¹, respectivamente e aos 9 D.A.I, apresentaram os valores médios de $6,29 \pm 0,12$ e $5,53 \pm 0,17$ log UFC g⁻¹ (Figura 5). Não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos.

Para a quantificação de *H. seropedicae* em amostras de raízes de milho, aos 3 D.A.I foram observados valores de $7,19 \pm 0,72$ e $7,31 \pm 0,58$ log UFC g⁻¹ para as amostras inoculadas com Herbas e co-inoculadas (Azos+Herbas), respectivamente. Aos 7 D.A.I, foram observados valores médios de $7,27 \pm 0,22$ e $7,03 \pm 0,40$ log UFC g⁻¹ e aos 9 D.A.I, ocorreu amplificação de DNA em apenas uma das replicatas das amostras controle, apresentando valor de 4,09 log UFC g⁻¹, muito possivelmente sendo uma contaminação da amostra. As amostras inoculadas com Herbas apresentaram valores médios de $6,91 \pm 0,12$ log UFC g⁻¹ e as amostras co-inoculadas (Azos+Herbas) apresentaram valores médios de $7,55 \pm 0,67$ log UFC g⁻¹ (Figura 6).

Para a quantificação de *H. seropedicae* em folhas de milho (Figura 7), aos 3 D.A.I foram observados valores médios de $7,59 \pm 0,29$ e $5,75 \pm 0,58$ log UFC g⁻¹ para amostras

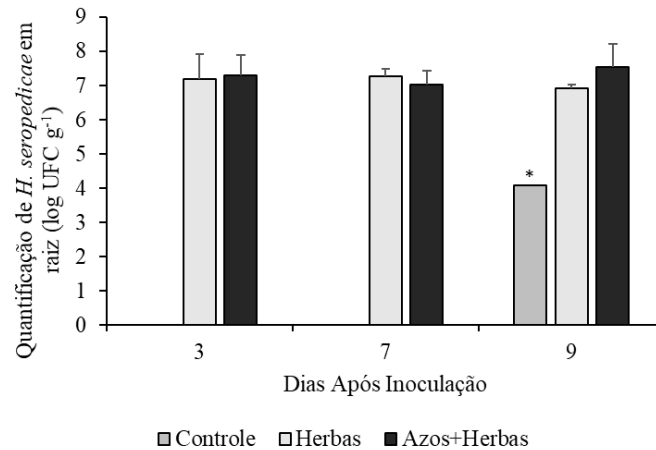
inoculadas com *H. seropedicae* (Herbas) e co-inoculadas (Azos+Herbas), respectivamente. Neste tempo de coleta foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos conforme teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), sendo que para as amostras inoculadas com *H. seropedicae* (Herbas) foi observado um maior número de cópias de DNA em relação às amostras controle ou co-inoculadas (Azos+Herbas). Aos 7 D.A.I não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que os valores de quantificação de amostras inoculadas com *H. seropedicae* (Herbas) ou co-inoculadas (Azos+Herbas) corresponderam as médias $7,43 \pm 0,64$ e $7,01 \pm 0,59$ log UFC g⁻¹, respectivamente. Aos 9 D.A.I, ocorreu à amplificação de uma de seis replicatas das amostras controle ($4,76$ log UFC g⁻¹), muito possivelmente sendo uma contaminação da amostra. Para as amostras inoculadas com *H. seropedicae* e co-inoculado a quantificação ficou em torno de $6,85 \pm 0,58$ e $6,91 \pm 0,45$ Log UFC g⁻¹ respectivamente.

Figura 5 – Quantificação em log UFC g⁻¹ de *A. brasilense* (Azos) em raízes de milho cultivar DKB 390, crescidas *in vitro*. Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de triplicata biológica e duplicata técnica (n=6) para tratamentos inoculados e duplicata biológica e técnica para controle (n=4). * Amplificação foi observada somente em duas replicatas.



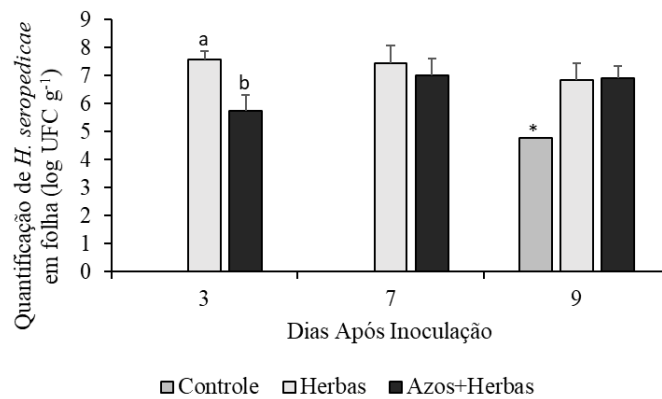
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 6 – Quantificação em log UFC g⁻¹ de *H. seropedicae* (Herbas) em raízes de milho cultivar DKB 390, crescidas *in vitro*. Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de triplicata biológica e duplicata técnica (n=6) para tratamentos inoculados e duplicata biológica e técnica para controle (n=4). * Amplificação foi observada somente em uma replicata.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 7 – Quantificação em log UFC g⁻¹ de *H. seropedicae* (Herbas) em folha de milho, cultivar DKB 390, crescidas *in vitro*. Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de triplicata biológica e duplicata técnica (n=6) para tratamentos inoculados e duplicata biológica e técnica para controle (n=4). * Amplificação foi observada somente em uma replicata. Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

5.3 DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) DAS BACTÉRIAS *A. brasilense* E *H. seropedicae* ASSOCIADAS COM MILHO CRESCIDO *IN VITRO*

Analisando o tecido radicular (Tabela 8), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para os resultados obtidos no meio de cultura específico de cada bactéria. Para as amostras controle a contagem bacteriana de *A. brasilense* foi menor que o LOD de 4,95 log UFC g⁻¹ nos tempos 3, 7 e 9 D.A.I. Para o tratamento inoculado com *A. brasilense* (Azos), a contagem bacteriana apresentou valores abaixo do LOD nos tempos 3 e 9, entretanto, para as amostras de milho co-inoculado (Azos+Herbas) foi possível fazer a contagem em todos os tempos, representando médias de 5,27 ± 1,31; 5,97 ± 0,85; 5,33 ± 0,11 log UFC g⁻¹, respectivamente aos 3, 7 e 9 D.A.I.

As contagens bacterianas de *H. seropedicae* no tecido radicular (Tabela 8) não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. Para o tempo de coleta aos 3 D.A.I a contagem ficou abaixo do LOD para as amostras controle e para as amostras co-inoculadas (Azos+Herbas). Em todos os demais tempos de coleta foi possível observar a contagem de células bacterianas variando entre 5,17 a 5,79 log UFC g⁻¹ entre os tempos. As contagens bacterianas de *H. seropedicae* no tecido foliar (Tabela 8) para as amostras inoculadas com *H. seropedicae* (Herbas) e amostras co-inoculadas (Azos+Herbas) apresentaram valores em todos os tempos de coleta. Para as amostras controle as contagens bacterianas dos tempos de coleta 3 e 7 D.A.I ficaram abaixo do LOD. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Tabela 8 – Contagem em placa de *A. brasilense* e *H. seropedicae* (log UFC g⁻¹) das raízes e parte aérea de milho cultivar DKB 390 crescidas *in vitro*. Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam médias ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). LOD = 4,95 log UFC g⁻¹.

D.A.I	Raiz (log UFC g ⁻¹)					
	Controle		Azos	Herbas	Azos+Herbas	
	Azos	Herbas			Azos	Herbas
3	<LOD	<LOD	<LOD	5,67 ± 0,77	5,27 ± 1,31	<LOD
7	<LOD	5,17 ± 0,18	5,15 ± 0,77	5,79 ± 0,32	5,97 ± 0,85	5,48 ± 0,84
9	<LOD	5,26 ± 0,10	<LOD	5,67 ± 1,048	5,33 ± 0,11	5,16 ± 0,85
Folha (log UFC g ⁻¹)						
3	-	<LOD	-	5,03 ± 0,74	-	5,04 ± 0,68
7	-	<LOD	-	7,29 ± 1,44	-	6,37 ± 1,15
9	-	5,08 ± 0,14	-	5,57 ± 1,30	-	6,75 ± 1,25

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

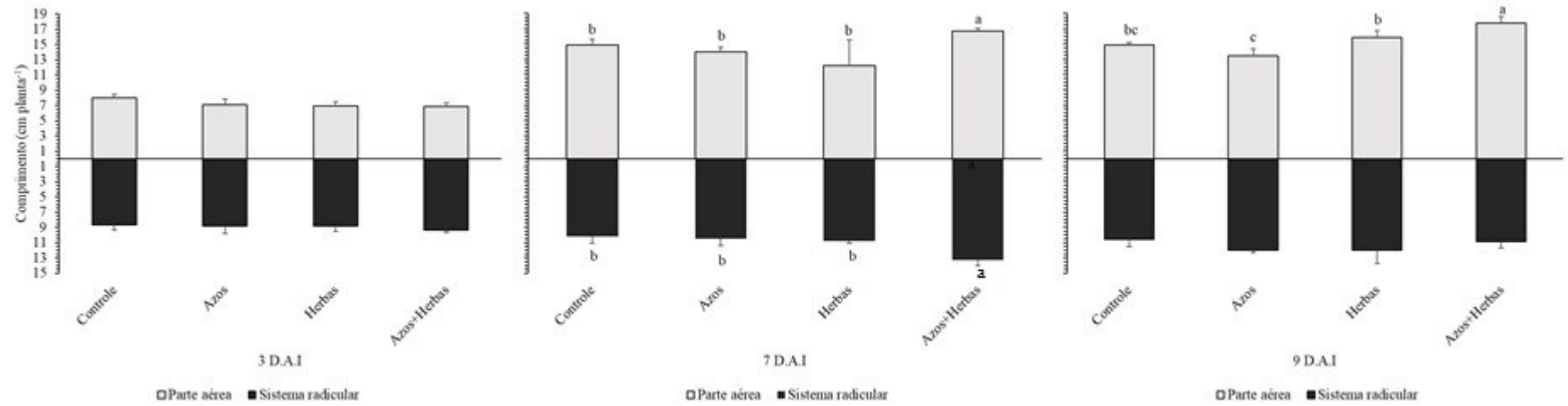
5.4 AVALIAÇÃO DE VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO VEGETAL DE MILHO CRESCIDO *IN VITRO*

Para o comprimento radicular e a parte aérea do milho (Figura 8) das plantas submetidas aos quatro tratamentos, no tempo de coleta 3 D.A.I, não foram observadas diferenças significativas. Aos 7 D.A.I o crescimento radicular das plantas que receberam a co-inoculação foi maior (13,03 ± 0,73 cm), denotando diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) em relação às plantas controle (10,21 ± 0,88 cm) e às plantas inoculadas com *H. seropedicae* (10,83 ± 0,29 cm) e com *A. brasilense* (10,51 ± 0,89 cm). Considerando o comprimento da parte aérea da planta, as plantas co-inoculadas apresentaram valores maiores (16,66 ± 0,38 cm) e significativamente diferentes em relação às plantas controle (14,84 ± 0,8 cm), inoculadas com *A. brasilense* (14 ± 0,58 cm) e inoculadas com *H. seropedicae* (12,14 ± 3,41 cm).

Para o tempo de coleta 9 D.A.I (Figura 8) as médias observadas para o comprimento radicular não apresentaram diferença significativa para as plantas submetidas aos quatro tratamentos. Para a parte aérea, as plantas que receberam o tratamento de co-inoculação apresentaram diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) com média superior em comparação aos demais tratamentos aplicados.

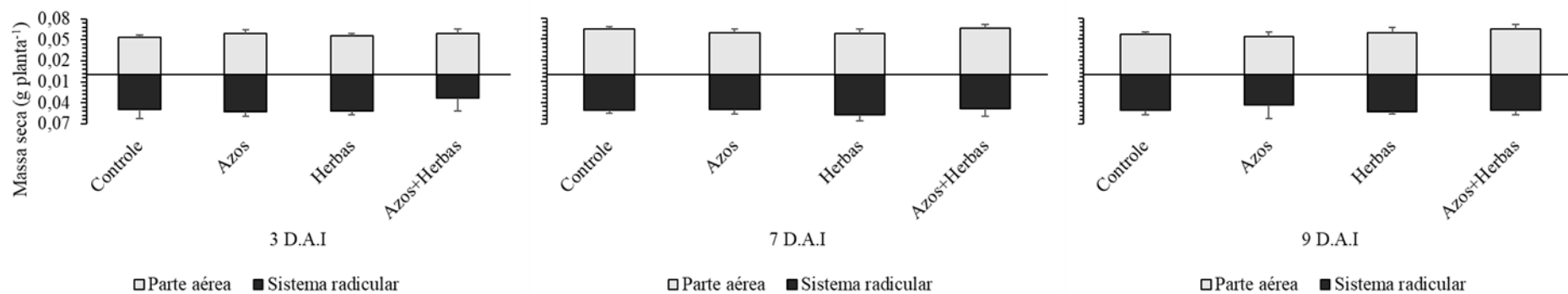
Para os valores de massa seca radicular e parte aérea (Figura 9) não foram observadas diferenças significativas para as plantas submetidas aos quatro tratamentos. As médias observadas de massa seca para o sistema radicular variaram entre 0,05 a 0,06 g planta⁻¹ e para a parte aérea 0,05 a 0,07 g planta⁻¹.

Figura 8 – Comprimento radicular e parte aérea do milho cultivar DKB 390, crescidas *in vitro*. Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 9 – Massa seca radicular do milho cultivar DKB 390, crescidas *in vitro*. Amostras coletadas aos 3, 7 e 9 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4).



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

5.5 QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE *A. brasilense* E *H. seropedicae* POR qPCR EM MILHO CULTIVADO EM CASA DE VEGETAÇÃO

A quantificação de DNA considerando o tecido radicular (Tabela 9), apresentou valores abaixo do LOD (<LOD) para as amostras submetidas aos quatro tratamentos e em todos os tempos de coleta. Para o tecido foliar (Tabela 10), valores acima do LOD foram detectados em uma das seis replicatas para as amostras inoculadas com *H. seropedicae* (Herbas) e co-inoculadas (Azos+Herbas) coletadas aos 14 D.A.I sendo os valores de 4,52 e 6,19 log UFC g⁻¹ respectivamente. No tempo de coleta de 21 D.A.I. para as amostras controle, as amplificações apresentaram valores abaixo do LOD.

Tabela 9 – Quantificação em log UFC g⁻¹ de *A. brasilense* (Azos) e *H. seropedicae* (Herbas) em raiz de milho, cultivar DKB 390, cultivadas em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média somente dos valores detectados acima do limite de detecção (>LOD) de 10 cópias (n=4 para amostras controle, n=6 para amostras inoculadas).

Raiz										
D.A.I	>LOD/n	DNA bacteriano (log UFC g ⁻¹)	>LOD/n	DNA bacteriano (log UFC g ⁻¹)	>LOD/n	DNA bacteriano (log UFC g ⁻¹)	>LOD/n	DNA bacteriano (log UFC g ⁻¹)	>LOD/n	DNA bacteriano (log UFC g ⁻¹)
Controle Azos		Controle Herbas			Azos		Herbas		Azos+Herbas	
14	0/4	<LOD	0/4	<LOD	0/6	<LOD	0/6	<LOD	0/6	<LOD
21	0/4	<LOD	0/4	<LOD	0/6	<LOD	0/6	<LOD	0/6	<LOD

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Tabela 10 – Quantificação em log UFC g⁻¹ de *H. seropedicae* (Herbas) em folha de milho, cultivar DKB 390, cultivadas em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14, 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média somente dos valores detectados acima do limite de detecção (>LOD) de 10 cópias (n=4 para amostras controle, n=6 para amostras inoculadas).

Folha						
D.A.I	>LOD/n	DNA bacteriano (log UFC g ⁻¹)	>LOD/n	DNA bacteriano (log UFC g ⁻¹)	>LOD/n	DNA bacteriano (log UFC g ⁻¹)
Controle		Herbas		Azos+Herbas		
14	0/4	<LOD	1/6	4,52	1/6	6,19
21	0/4	<LOD	0/6	<LOD	0/6	<LOD

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

5.6 DETERMINAÇÃO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) DAS BACTÉRIAS *A. brasilense* E *H. seropedicae* ASSOCIADAS COM MILHO CULTIVADO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Como apresentado no item 4.3.1, para o tecido radicular (Tabela 11) foi realizada a contagem de UFC no meio de cultivo específico de *A. brasilense* e *H. seropedicae*. Para as plantas do tratamento controle, a contagem de *A. brasilense* no tempo de coleta 21 D.A.I, apresentou valores abaixo do LOD (4,95 log UFC g⁻¹). Para as amostras de plantas inoculadas ou co-inoculadas, foi possível realizar a quantificação para os tempos de coleta 14 e 21 D.A.I. Para a contagem de *H. seropedicae*, as amostras não foram avaliadas. Para o tecido foliar (Tabela 11) as amostras de todos os tempos de coletas apresentaram valores abaixo do LOD.

Tabela 11 – Contagem em placa de *A. brasilense* (Azos) e *H. seropedicae* (Herbas) (log UFC g⁻¹) em amostras de folha e raiz de milho cultivar DKB 390 cultivadas em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média ± desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). LOD = 4,95 log UFC g⁻¹.

D.A.I	Raiz (log UFC g ⁻¹)					
	Controle		Azos	Herbas	Azos+Herbas	
	Azos	Herbas			Azos	Herbas
14	6,2 ± 0,4	-	5,5 ± 1,1	5,8 ± 1,0	5,9 ± 0,5	6,1 ± 0,4
21	<LOD	-	5,9 ± 0,4	6,1 ± 0,4	5,3 ± 0,8	5,4 ± 0,6
Folha (log UFC g ⁻¹)						
14	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD
21	-	<LOD	-	<LOD	-	<LOD

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

5.7 VARIÁVEIS DE CRESCIMENTO VEGETAL DE MILHO CULTIVADO EM CASA DE VEGETAÇÃO

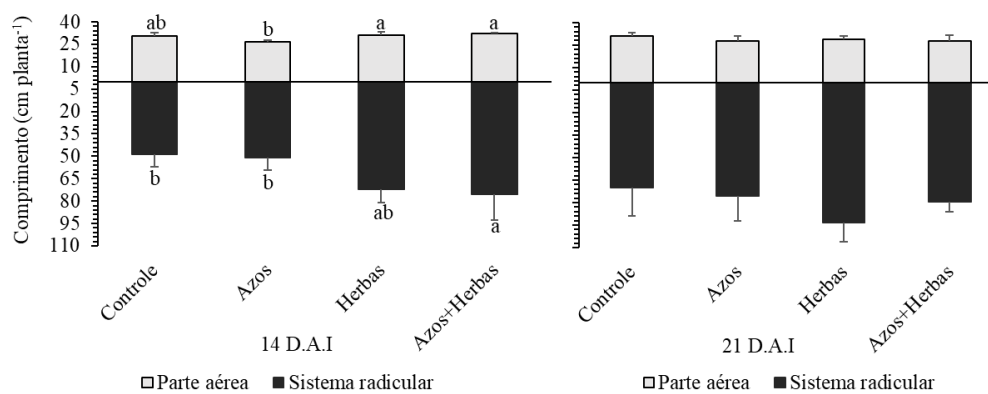
5.7.1 Variáveis de crescimento vegetal avaliadas em plantas de milho obtidas em primeiro ensaio (ano 2018)

Observou-se que o comprimento radicular (Figura 10) aos 14 D.A.I foi maior para plantas co-inoculadas (75,6 ± 17,3 cm) em relação às plantas controle (48,4 ± 8,6 cm) e

inoculadas com *A. brasilense* ($50,8 \pm 8,6$ cm). Porém, em relação às plantas inoculadas com *H. seropedicae* ($72,1 \pm 8,9$ cm) não foram observadas diferenças significativas. As plantas co-inoculadas alcançaram valores de comprimento radicular 56,19% maiores em relação às plantas controle.

Para a parte aérea da planta de milho (Figura 10) aos 14 D.A.I observou-se que as plantas inoculadas com *H. seropedicae* ($31 \pm 2,3$ cm) e co-inoculadas ($32,3 \pm 0,6$ cm) apresentaram diferenças significativas ($\alpha = 0,05$) em relação às plantas inoculadas com *A. brasilense* ($26,4 \pm 1,5$ cm) mas não em relação às plantas controle ($30,4 \pm 2,5$ cm). Em relação ao comprimento da parte aérea, foi observado incremento de 21,96% nas plantas co-inoculadas em relação as plantas inoculadas com *A. brasilense*. Para o tempo de coleta 21 D.A.I não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos quando analisados comprimento de raízes e parte aérea da planta.

Figura 10 – Comprimento da parte aérea e radicular do milho, cultivar DKB 390, cultivadas em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14, 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.



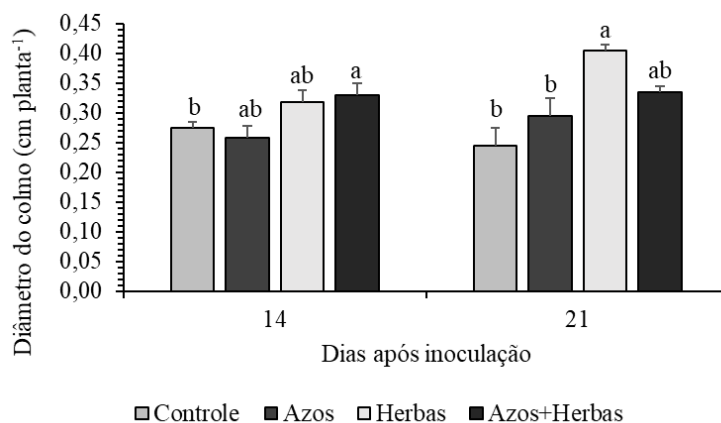
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Para o diâmetro do colmo (Figura 11) aos 14 D.A.I as plantas controle ($0,28 \pm 0,01$ cm) não diferiram das plantas inoculadas com *A. brasilense* ($0,26 \pm 0,02$ cm) e inoculadas com *H. seropedicae* ($0,32 \pm 0,02$ cm), mas diferiram significativamente das plantas co-inoculadas ($0,33 \pm 0,02$ cm). Os valores médios de diâmetro do colmo observados para as plantas co-inoculadas não foram estatisticamente diferentes das plantas inoculadas com as bactérias isoladas. Quando comparados os valores obtidos para as plantas co-inoculadas em relação às plantas controle, observa-se uma diferença de 20%.

Aos 21 D.A.I os valores médios de diâmetro do colmo para as plantas controle ($0,24 \pm 0,03$ cm), inoculadas com *A. brasilense* ($0,29 \pm 0,03$ cm) e co-inoculadas ($0,34 \pm 0,01$ cm) não foram estatisticamente diferentes. Contudo as médias observadas para as plantas inoculadas com *H. seropedicae* foram 65,89% maiores ($0,40 \pm 0,01$ cm) em relação às plantas controle, sendo igual estatisticamente somente em relação às plantas co-inoculadas.

Para o índice SPAD não foram observadas diferenças significativas no teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) entre os grupos tratados, mas observou-se que os valores obtidos foram decrescendo com os tempos de coletas (14 e 21 D.A.I.), sendo que os valores médios das avaliações entre os tratamentos aos 14 D.A.I foi de $25,6 \pm 2,3$ e aos 21 D.A.I de $21,8 \pm 1,9$ índice SPAD.

Figura 11 – Diâmetro do colmo do milho, cultivar DKB 390, cultivada em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

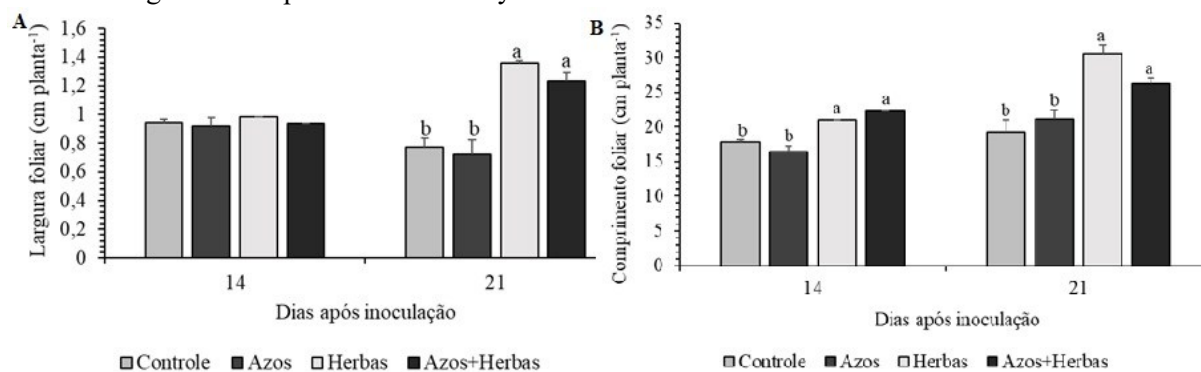


Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Para a largura foliar (Figura 12A) aos 21 D.A.I foram observadas diferenças significativas no teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) entre os valores médios obtidos para as plantas controle ($0,8 \pm 0,1$ cm) e inoculadas com *A. brasilense* ($0,7 \pm 0,1$ cm), diferindo das plantas inoculadas com *H. seropedicae* ($1,4 \pm 0,1$ cm) e das plantas co-inoculadas ($1,2 \pm 0,1$ cm), sendo que estas últimas foram as que apresentaram maior média. O incremento da largura foliar das plantas co-inoculadas em relação às plantas controle foi de 60,77%. Para tempo de coleta 14 D.A.I não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Observou-se para as plantas inoculadas com *H. seropedicae* e co-inoculadas o mesmo padrão de comportamento para a variável comprimento foliar (Figura 12B) aos 14 D.A.I ($21 \pm 1,4$ e $22,3 \pm 0,9$ cm) e 21 D.A.I ($30,4 \pm 3,0$ e $26,2 \pm 2,7$ cm). Para estes dois grupos foram observados os valores médios mais altos de comprimento foliar, que foram estatisticamente diferentes dos valores observados para as plantas controle e plantas inoculadas com *A. brasilense* (Azos), cujos valores foram de $17,7 \pm 1,8$; $16,4 \pm 1,2$ cm aos 14 D.A.I e $19,3 \pm 2,1$; $21,2 \pm 1,3$ cm aos 21 D.A.I, respectivamente. Os incrementos observados foram de 25,8% aos 14 D.A.I e de 36,24% aos 21 D.A.I para as plantas co-inoculadas em relação às plantas controle.

Figura 12 – A) Largura foliar. B) Comprimento da folha do milho, cultivar DKB 390, cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

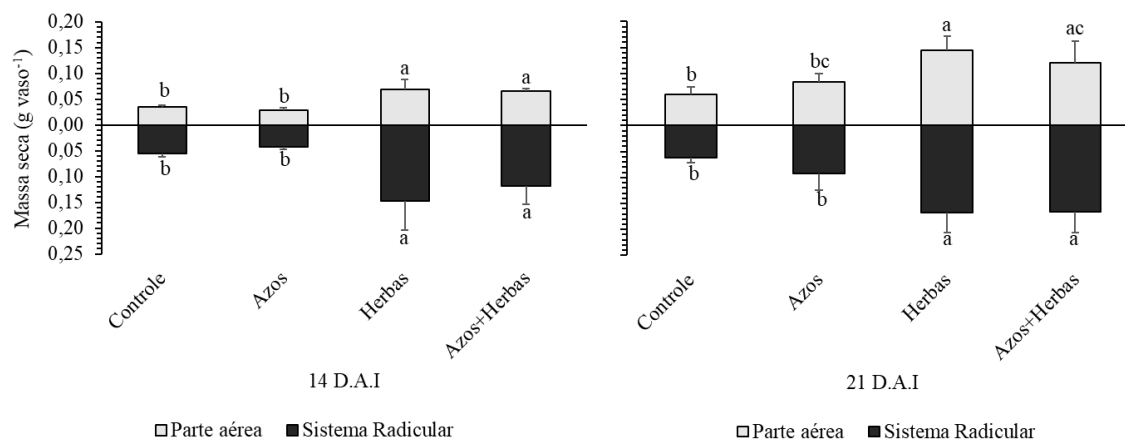
Para a variável massa seca de parte aérea (Figura 13) aos 14 D.A.I, observou-se que as plantas inoculadas com *H. seropedicae* ($0,07 \pm 0,02$ g) e co-inoculadas ($0,06 \pm 0,01$ g) apresentaram valores médios maiores em relação às plantas controle ($0,03 \pm 0,01$ g) e inoculadas com *A. brasilense* ($0,03 \pm 0,01$ g). Ao comparar os valores de massa seca da parte aérea, observou-se que as plantas co-inoculadas apresentaram um incremento de 87,57% em relação às plantas controle.

Aos 21 D.A.I os mesmos grupos de plantas (inoculadas com *H. seropedicae* e co-inoculadas) apresentaram os maiores valores médios de massa seca em relação às plantas controle e plantas inoculadas com *A. brasilense*. Os valores observados de massa seca de parte aérea para plantas inoculadas com *H. seropedicae* ($0,14 \pm 0,03$ g) foram significativamente diferentes dos valores observados para plantas controle ($0,06 \pm 0,01$ g) e inoculadas com *A. brasilense* ($0,08 \pm 0,01$ g). Os valores observados para as plantas co-inoculadas ($0,12 \pm 0,04$ g)

foram diferentes apenas das plantas controle, apresentando um incremento de massa seca de 103% em relação às mesmas.

Para a variável massa seca de raízes (Figura 13), aos 14 D.A.I observou-se que os valores médios obtidos para as plantas inoculadas com *H. seropedicae* ($0,15 \pm 0,1$ g) e co-inoculadas ($0,12 \pm 0,03$ g) foram maiores do que os observados para plantas controle ($0,06 \pm 0,01$ g) e inoculadas com *A. brasilense* ($0,04 \pm 0,01$ g) apresentando diferença significativa pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$). Aos 21 D.A.I, o mesmo comportamento foi observado, sendo os valores médios obtidos de massa seca de raízes para plantas inoculadas com *H. seropedicae* ($0,17 \pm 0,4$ g) e co-inoculadas ($0,17 \pm 0,4$ g) maiores do que os valores observados para as plantas controle ($0,6 \pm 0,1$ g) e inoculadas com *A. brasilense* ($0,9 \pm 0,3$ g). O incremento da biomassa seca aos 14 e 21 D.A.I para as plantas co-inoculadas em relação ao controle, foram de 113,38% e 170,45% respectivamente.

Figura 13 – Massa seca da parte aérea e radicular do milho, cultivar DKB 390, cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

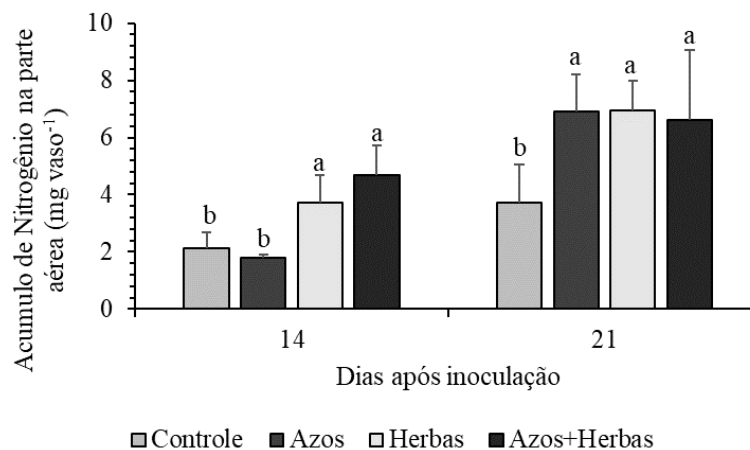


Fonte: Elaborada pela autora (2020).

As amostras de folhas das plantas co-inoculadas ($4,7 \pm 1,0$ mg) e inoculadas com *H. seropedicae* ($3,7 \pm 1,0$ mg) apresentaram maior acúmulo de nitrogênio (Figura 14) aos 14 D.A.I e foram diferentes em nível de significância pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), aos 14 D.A.I em relação as plantas controle ($2,1 \pm 0,6$ mg) e inoculadas com *A. brasilense* ($1,8 \pm 0,1$ mg). As plantas co-inoculadas denotaram incremento de 123,80% no acúmulo de nitrogênio em relação

às plantas controle. Aos 21 D.A.I, os valores médios obtidos para as plantas inoculadas com *A. brasilense* ($6,9 \pm 1,3$ mg), inoculadas com *H. seropedicae* ($6,9 \pm 1,1$ mg) e co-inoculadas ($6,6 \pm 2,4$ mg) foram significativos em relação aos valores obtidos para as plantas controle ($3,7 \pm 1,3$ mg). As plantas co-inoculadas apresentaram incremento de 78,37% em relação as plantas controle. Os teores de nitrogênio aos 14 D.A.I variaram entre 23,9 e 30,3 mg vaso⁻¹ e aos 21 D.A.I entre 20 e 31,2 mg vaso⁻¹.

Figura 14 – Acúmulo de nitrogênio na parte aérea do milho, cultivar DKB 390, cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 14 e 21 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

5.7.2 Variáveis de crescimento vegetal avaliadas em plantas de milho obtidas em segundo ensaio (ano 2020)

Para a variável comprimento (Figura 15) da parte aérea, as médias dos tratamentos não diferiram entre eles nos quatro tempos de coleta. Para o comprimento radicular, os valores médios dos tratamentos também não diferiram estatisticamente entre eles nos tempos de coletas 7, 14 e 28 D.A.I. Aos 21 D.A.I as plantas controle ($78,6 \pm 9,5$ cm) diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) das plantas co-inoculadas ($60,8 \pm 7,3$ cm) e das inoculadas com *A. brasilense* ($63,9 \pm 6,4$ cm).

Os valores do índice SPAD obtidos não foram significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) entre os tratamentos, apesar de que os valores obtidos para as plantas co-inoculadas e inoculadas com *A. brasilense* terem sido maiores aos 28 D.A.I, na ordem de $21,4 \pm 1,4$ e $20,4$

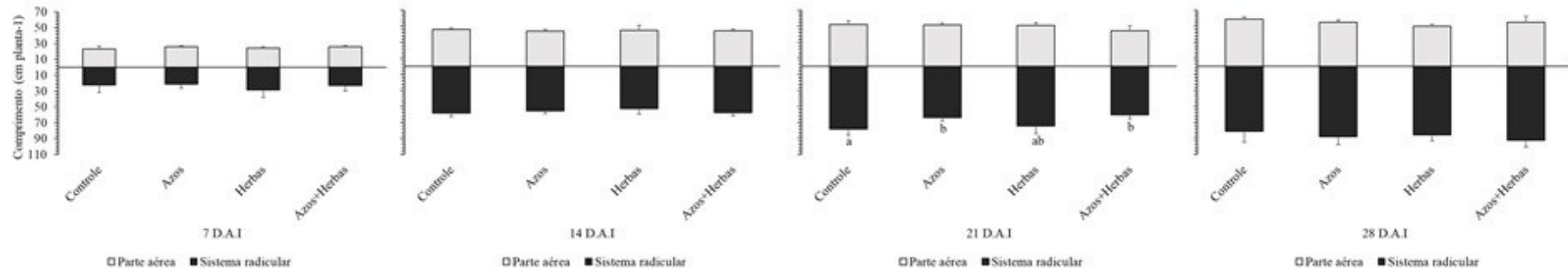
$\pm 1,6$ índice SPAD respectivamente e as plantas controle terem apresentado valores de $19,2 \pm 0,8$ índice SPAD.

Quando comparados os valores obtidos para o diâmetro do colmo (Figura 16), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. As plantas controle ($0,55 \pm 0,02$ cm) apresentaram os maiores valores de diâmetro em relação aos demais tratamentos e as plantas co-inoculadas ($0,53 \pm 0,04$ cm) e inoculadas com *H. seropedicae* ($0,52 \pm 0,00$ cm) apresentaram os menores valores aos 28 D.A.I.

Em relação os valores obtidos para largura foliar (Figura 17A), observaram-se diferenças somente aos 14 D.A.I. As plantas controle apresentaram os menores valores de largura, diferindo significativamente pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$) dos valores dos demais tratamentos.

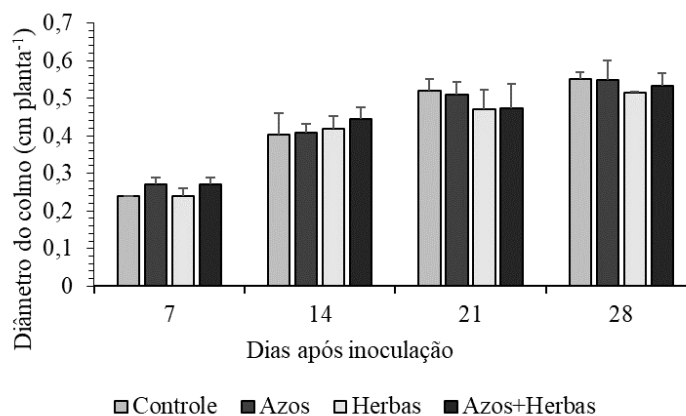
Para a variável comprimento foliar (Figura 17B) os valores médios obtidos foram significativamente diferentes apenas aos 28 D.A.I, sendo que as plantas controle ($30,9 \pm 0,1$ cm) apresentaram maior desenvolvimento foliar, seguido das plantas inoculadas com *A. brasilense* ($29,6 \pm 0,1$ cm) e co-inoculadas ($26,3 \pm 1,5$ cm).

Figura 15 – Comprimento radicular e da parte aérea do milho, cultivar DKB 390 cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.



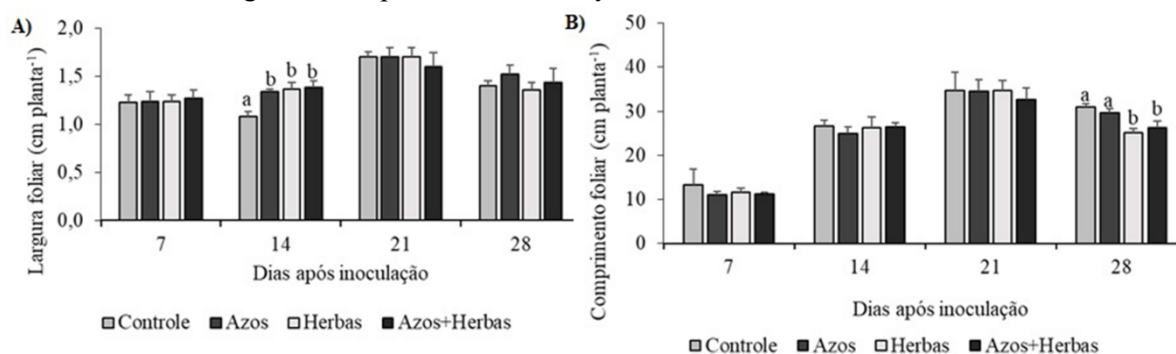
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 16 – Diâmetro do colmo do milho, cultivar DKB 390, cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4).



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Figura 17– A) Largura foliar. B) Comprimento da folha do milho, cultivar DKB 390, cultivado em casa de vegetação. Amostras coletadas aos 7, 14, 21 e 28 dias após inoculação (D.A.I). Os dados representam média \pm desvio padrão de quadruplicata biológica (n=4). Médias não seguidas de mesma letra diferem ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

6 DISCUSSÃO

Para utilizar novas combinações de microrganismos a fim de potencializar os benefícios oferecidos às plantas associadas, é importante considerar que a eficiência da co-inoculação está intimamente relacionada à seleção adequada das cepas, à concentração celular de cada bactéria, aos métodos de inoculação e ao genótipo da planta (HELMAN; BURDMAN; OKON, 2011; SANTOS *et al.*, 2019). Estudos voltados para a co-inoculação bacteriana, a fim de melhorar seu uso e explorar os diferentes conjuntos bacterianos para que possa ser aplicada de forma eficiente no campo, são altamente relevantes para o aprimoramento desta tecnologia agrícola (GOSWAMI *et al.*, 2016). Portanto, os efeitos da interação foram analisados em plantas de milho cultivadas *in vitro* e em solo de baixa fertilidade natural em casa de vegetação.

Vários estudos têm mostrado que a quantificação bacteriana para plantas co-inoculadas se torna uma análise importante para a compreensão do comportamento da bactéria, possibilitando o monitoramento do processo de colonização (HELMAN; BURDMAN; OKON, 2011; VICARIO *et al.*, 2016). Porém, nos últimos dez anos menos de 25% dos artigos publicados com inoculação de BPCV utilizaram métodos de quantificação bacteriana (RILLING *et al.*, 2019). Desta forma, a quantificação por qPCR e contagem em placa foram realizadas neste trabalho para avaliar a colonização de *A. brasilense* e *H. seropedicae* em milho, co-inoculados ou inoculados separadamente.

Para obtenção de resultados de quantificação por qPCR de forma confiável, os parâmetros de reação foram definidos usando curvas-padrão obtidas a partir do DNA isolado de culturas bacterianas puras. Requisitos para que a curva padrão seja confiável foram estabelecidos, desta forma, os valores de R^2 devem ser superiores a 0,95, para o *slope* os valores devem variar entre -3,6 e -3,1 correspondendo a eficiência de 90 a 110%, além dos parâmetros de %RSDr e Bias os valores devem ser menores ou igual a 25% (HOUGS; GATTO; ŽEL, 2017). Zhang; Fang (2006) consideraram aceitáveis valores de R^2 superiores a 0,95, valores para *slope* de -3,9 a -3,0, com eficiência de qPCR entre 80 e 115%.

Os resultados encontrados neste trabalho para os parâmetros coeficiente de correlação (R^2), *slope*, eficiência (Tabela 4), %RSDr e bias (Tabela 6) na quantificação de *A. brasilense* estão de acordo com os requisitos estabelecidos anteriormente (HOUGS; GATTO; ŽEL 2017). O LOD e o LOQ para *A. brasilense* usando os iniciadores Azor2.1 foi estabelecido em 10^2 cópias do genoma, considerando o C_q médio de 30,07. Cunha *et al.* (2020), que utilizou também

o par de iniciadores AzoR2.1, encontrou valores de Cq médio de 31,94 e estabeleceu em 10^2 cópias do genoma, apresentando resultados próximos.

Para a quantificação de *H. seropedicae*, R^2 , *slope*, eficiência (Tabela 5), %RSDr e bias (Tabela 7) estão de acordo com os requisitos estabelecidos anteriormente (ZHANG; FANG, 2006; HOUGS; GATTO; ŽEL, 2017). Para *H. seropedicae* o LOD e o LOQ utilizando os iniciadores HERBAS1 foram determinados em 10^1 cópias do genoma, apresentando Cq médio de 34,52, valores semelhantes aos encontrados por Pereira *et al.* (2014) quando utilizados os mesmos iniciadores (10^1 cópias do genoma e Cq médio de 32,15). À vista disso, os parâmetros de reação para quantificação obtidos a partir das curvas-padrão apresentaram baixa variação e grau de precisão adequado para o ensaio das duas bactérias, tanto na condição *in vitro* quanto em casa de vegetação.

A quantificação por qPCR das bactérias *A. brasilense* e *H. seropedicae* inoculadas em raízes e folhas de milho crescido na condição *in vitro*, demonstrou que quando co-inoculadas o número de cópias de DNA bacteriano expresso em \log UFC g^{-1} (Figura 6 e 7) diminuiu no caso de *A. brasilense* (Figura 5) ou se manteve no caso da *H. seropedicae*, quando comparado com a quantificação bacteriana em plantas inoculadas com as bactérias isoladas ao longo do período de crescimento do milho (3, 7 e 9 D.A.I). Para contagem em placa por *drop plate* (Tabela 8), onde são determinadas as UFC (NOCKER; CAMPER, 2009), observou-se o mesmo comportamento indicado pela quantificação molecular para *H. seropedicae*, mostrando uma ligeira diminuição ou manutenção ao longo do período de crescimento da planta.

Para a condição de cultivo de milho *in vitro*, a quantificação molecular demonstrou que as bactérias colonizaram efetivamente os tecidos vegetais. Embora tenha sido realizada a inoculação de *H. seropedicae* nas radículas das sementes pré-germinadas, foi possível quantificar o DNA de *H. seropedicae* tanto na raiz quanto na folha. Este resultado reforça os estudos de que a bactéria coloniza os tecidos vegetais internos (MONTEIRO *et al.*, 2012; AMARAL *et al.*, 2016).

Considerando que a inoculação para ambas bactérias foi realizada na raiz no experimento *in vitro*, a presença de *H. seropedicae* em maior concentração nas amostras de plantas co-inoculadas em relação à quantidade de *A. brasilense*, reforça que o comportamento endofítico característico do gênero *Herbaspirillum* favorece a colonização dos tecidos quando existe competição pelo mesmo nicho (CARVALHO *et al.*, 2014). Até onde sabemos este é o

primeiro estudo avaliando a co-inoculação entre *A. brasilense* e *H. seropedicae* por meio de ferramentas moleculares, permitindo evidenciar a quantidade de cada bactéria nos tecidos colonizados e trazendo um resultado inicial do comportamento delas em conjunto nas raízes de milho sob condições laboratoriais.

A especiação de nicho possivelmente favoreceu a co-inoculação, devido a isso, espécies microbianas podem coexistir na rizosfera ocupando subconjuntos de espaços das raízes e consumindo diferentes conjuntos de recursos derivados de plantas e solo (WEI *et al.*, 2020). Essa especiação favoreceu a co-inoculação por *A. brasilense* e *H. seropedicae*, sendo que *A. brasilense* colonizou a superfície das raízes e *H. seropedicae* os tecidos internos vegetais.

Para o primeiro ensaio conduzido em casa de vegetação em condição de solo com baixa fertilidade natural e avaliado nos tempos 14 e 21 D.A.I, não foram observadas ampliações das amostras em valores acima do LOD determinado para a qPCR (Tabela 9 e 10). Desta forma, não é possível afirmar que a inoculação ocorreu de forma efetiva.

Os resultados de contagem bacteriana por *drop plate* obtidos do primeiro ensaio em casa de vegetação, apresentaram valores médios de 5,8 log UFC g⁻¹ para *H. seropedicae* e 5,6 log UFC g⁻¹ para *A. brasilense*, considerando o tecido das raízes no tratamento de co-inoculação (Tabela 11). Resultados semelhantes foram observados por Botta *et al.* (2013) ao avaliar a co-inoculação entre *A. brasilense* e *H. seropedicae* em plantas de tomate, onde o experimento foi conduzido em casa de vegetação com uso de solo não estéril, quando avaliadas as contagens bacterianas de raízes, observou-se comportamento similar ao deste estudo (5,5 log UFC g⁻¹ para *H. seropedicae* e 6,5 log UFC g⁻¹ para *A. brasilense*).

Apesar de ser um método clássico para enumeração de população microbiana, técnicas dependentes de cultivo como a contagem bacteriana em placa podem apresentar algumas desvantagens na sua utilização, como custo alto para o desenvolvimento da análise e a possibilidade de contagem inespecífica de outros microrganismos. Este risco é ainda maior devido ao uso de solo não estéril para o cultivo das plantas nos experimentos conduzidos em casa de vegetação (NOCKER; CAMPER, 2009; ACHILLEOS; BERTHIER, 2013).

Apesar de não ter sido possível quantificar a presença das bactérias em plantas cultivadas em casa de vegetação no primeiro ensaio, devido à ausência de amplificação das amostras, os resultados das avaliações das variáveis de crescimento vegetal indicam incremento nos tratamentos inoculados. A avaliação das variáveis comprimento radicular e de parte aérea (Figura 10), diâmetro do colmo (Figura 11), largura e comprimento foliar (Figura 12), massa

seca radicular e parte aérea (Figura 13) e acúmulo de nitrogênio (Figura 14), mostraram que as plantas que receberam os tratamentos de co-inoculação e de inoculação com *H. seropedicae* (Herbas), foram as que obtiveram maior acréscimo dos valores de crescimento. Os trabalhos de Gholami *et al.* (2012); Amaral *et al.* (2016); Molina-Romero *et al.* (2017) e Puente *et al.* (2019) co-inocularam *Azotobacter*+*Azospirillum*, *Azospirillum*+*Herbaspirillum*, *Sphingomonas*+*Azospirillum*+*Acinetobacter* e *Azospirillum*+*Bradyrhizobium* respectivamente e confirmam incrementos substanciais em plantas quando associadas com as BPCV em co-inoculação.

Os gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* fazem a biossíntese e/ou modulação de fitormônios em todas as fases do desenvolvimento vegetal. Devido a essa característica os benefícios nas plantas já podem ser observados nos primeiros dias ou meses após a inoculação. Possivelmente os principais hormônios modulados no primeiro ensaio em casa de vegetação foram as auxinas e citocininas, as quais são responsáveis pelo desenvolvimento e crescimento das raízes e pela expansão foliar, resultando em aumento dessas variáveis de crescimento nas plantas. A fitoestimulação do *Azospirillum* por meio da biossíntese de IAA é extremamente importante nos estágios iniciais de crescimento (germinação e crescimento inicial da muda) e é considerada complementar a outros mecanismos em estágios mais avançados de crescimento da planta (ZEFFA *et al.* 2019).

A inoculação de *A. brasilense* na semente possivelmente atuou nos estágios iniciais do desenvolvimento da planta de milho e a inoculação de *H. seropedicae* na parte aérea em estágio fenológico V2 aonde o estabelecimento do número máximo de grãos está sendo definido, tem um ótimo potencial para aumentar a produção de grãos no final do ciclo da planta, sendo que a fitoestimulação de *A. brasilense* nos estágios iniciais e a promoção de crescimento vegetal da *H. seropedicae* se complementam, resultando em uma resposta sinérgica no desenvolvimento da planta. Essa característica das bactérias pode explicar os acréscimos nas avaliações morfométricas nas plantas de milho co-inoculadas, no primeiro ensaio conduzido em casa de vegetação (GLICK, 2014; MURAI, 2014).

Vale ressaltar o resultado do nosso primeiro estudo em casa de vegetação com solo de fertilidade natural, que obteve o maior acúmulo de nitrogênio nas plantas de milho co-inoculadas em relação às plantas controle, resultado que afirma a ação da FBN realizada pelas bactérias *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SmR1. Pankievicz *et al.* (2015) estudaram a co-

inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* na *Setaria viridi*, em um experimento conduzido em condições *in vitro* utilizando substrato com baixo teor de nitrogênio (0,5 mM KNO₃) ou sem adição de nitrogênio. Em resposta a co-inoculação, obteve-se aumento na massa seca da parte aérea em 82,2%, comprimento da raiz em 28,6%, número de raízes laterais em 39,6% e maior rendimento na produção de sementes. Além disso, a FBN ocorreu em nível necessário para fornecer a taxa diária de N da planta em condições laboratoriais. Dessa forma os dois estudos que utilizaram a co-inoculação de *A. brasilense* e *H. seropedicae* confirmaram a FBN em condições *in vitro* e em casa de vegetação para milho e setaria.

A literatura ressalta que diversas condições ambientais ocorrem em ambientes semi-controlados e podem contribuir para o não sucesso da colonização bacteriana nas plantas, desta forma, algumas hipóteses podem ser consideradas para justificar a não detecção das bactérias por qPCR nos tecidos vegetais (raiz e parte aérea) no primeiro ensaio e os resultados não substanciais encontrados para o segundo ensaio em casa de vegetação. Bashan; Holguin; Bashan (2004) e Martinez-Viveros *et al.* (2010) afirmam que o sucesso da interação depende de vários fatores, como a concentração das bactérias nos tecidos, motilidade ativa, sobrevivência bacteriana, adsorção às partículas do solo, bem como da competição com outros microrganismos presentes na rizosfera.

Os solos utilizados nos ensaios em casa de vegetação não foram esterilizados, portanto poderiam conter uma alta variedade de microrganismos competindo pelo mesmo nicho de colonização. Este fator pode explicar as diferenças observadas em experimentos conduzidos em laboratório onde os substratos normalmente são esterilizados, já em casa de vegetação e no campo o inoculante encontra competição de nicho, tornando os resultados de inoculação com BPCV mais inconsistentes (MARTINEZ-VIVEROS *et al.*, 2010). Outros microrganismos presentes no solo também poderiam estar liberando compostos antagonistas na região da rizosfera, e isso viria a impedir a sobrevivência de *A. brasilense* no solo resultando em baixa colonização pelo inoculante.

Ferreira *et al.* (2013) e Costa *et al.* (2014) comprovaram que a fertilidade do solo também influencia na associação simbiótica da planta-bactéria. O solo utilizado no segundo ensaio em casa de vegetação foi corrigido nutricionalmente e cultivado soja como primeiro cultivo, e após, no segundo cultivo foi cultivado milho sem correção nutricional. No entanto, sabe-se que a soja inoculada com BPCV fixa nitrogênio além da sua necessidade, deixando uma contribuição residual de nitrogênio no solo de cerca de 30 kg N ha⁻¹ para a cultura seguinte

(HUNGRIA, 2011). Zeffa *et al.* (2018) demonstram forte influência dos níveis de nitrogênio no solo sob a eficiência da inoculação, sendo que o aumento da eficiência bacteriana foi observado em solos com baixo teor de nitrogênio. O teor residual de nitrogênio no solo do segundo ensaio em casa de vegetação pode ter influenciado nos resultados observados.

Além do estabelecimento das BPCV ser afetado pelas características químicas do solo, a FBN e o comportamento bacteriano também são influenciados. Zeffa *et al.* (2019) observaram que a FBN aumentou sob condições limitantes de nitrogênio no solo. Costa *et al.* (2014), em seu estudo identificaram um comportamento mais endofítico do gênero *Herbaspirillum* quando o solo é de baixa fertilidade. Essas características podem explicar a ausência de respostas substanciais no segundo ensaio em casa de vegetação, pois devido ao solo ter maior disponibilidade de nutrientes, reduzindo a necessidade da interação com as cepas bacterianas diazotróficas. Dessa forma, as plantas não utilizaram todo o potencial dos benefícios da interação planta-bactéria (BODDEY *et al.*, 2003).

Fernández-Calviño; Bååth (2010) ressaltam que solo ácido pode ser um fator limitante na colonização e crescimento bacteriano. A análise de pH do solo utilizado para o primeiro ensaio, indicou pH de 4,4 tornando o solo ácido, fator que pode ter afetado a sobrevivência da *A. brasilense* FP2 nas raízes do milho, não sendo possível a quantificação bacteriana após 14 dias de inoculação.

A inoculação foliar é uma forma fácil e prática para introduzir microrganismos benéficos a campo, com resultados semelhantes ou maiores do que os outros métodos mais praticados, como inoculação na semente e no sulco (SILVA; OLIVARES; CANELLAS, 2017). No entanto, alguns fatores podem ocorrer, diminuindo a eficácia do inoculante. A forma de aplicação bacteriana via foliar está diretamente exposta a fatores deletérios como a incidência de luz UV, dessecação e altas temperaturas, estes fatores podem dificultar a sobrevivência das células bacterianas no tecido vegetal (GUIMARÃES *et al.*, 2018). O estudo feito por Fukami *et al.* (2017) demonstra que em condições de casa de vegetação, 48 horas após aplicação via foliar de *A. brasilense*, não foi possível detectar células vivas, contudo, foi observado incremento no crescimento vegetal, sugerindo que os metabólitos produzidos foram responsáveis pelo crescimento foliar e não as células vivas inoculadas, fator que pode ter contribuído para os resultados encontrados neste estudo.

A interação entre o genótipo utilizado e a linhagem bacteriana inoculada pode ser um fator determinante na colonização bacteriana (ARAUJO *et al.*, 2013; SANTI; BOGUSZ; FRANCHE, 2013). A fim de determinar a influência deste fator neste estudo, foi realizado o ensaio de co-inoculação em condições *in vitro*, o qual mostrou que a colonização por *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SmR1 na cultivar de milho DKB 390 foi efetiva. Estes resultados indicam que o insucesso da colonização em condições de casa de vegetação no segundo ensaio provém de outra fonte, que não a incompatibilidade da linhagem bacteriana com o genótipo do milho.

Embora no trabalho de Guimarães *et al.* (2014) não tenham encontrado efeito positivo nas características morfométricas do milho (cv. DKB 390) co-inoculado na semente com *A. brasilense* Ab-V5 e *H. seropedicae* SmR1 em quatro diferentes solos (Argissolo Distrófico, Cambissolo Eutrófico, Eutrófico Latossolo e Argissolo Eutrófico), nosso estudo confirma os benefícios da co-inoculação com *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SmR1 em milho da mesma cultivar, com co-inoculação nas sementes em um ensaio *in vitro* e co-inoculação em diferentes órgãos da planta no ensaio conduzido em casa de vegetação com solo Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico de fertilidade natural. Esses resultados confirmam que a interação entre as linhagens, a cultivar e o tipo de solo são fatores de extrema importância quando se considera a co-inoculação bacteriana.

Fica evidente com os resultados encontrados na literatura e evidenciados no estudo, que o sucesso da inoculação depende de fatores bióticos e abióticos. Por isso os esforços para compreender cada etapa da interação e o sucesso ou não da co-inoculação é de suma importância. Os estudos nesta linha de pesquisa são necessários, uma vez que conhecer como ocorre a interação entre as bactérias torna possível a aplicação de novos consórcios bacterianos que promovam o crescimento vegetal.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Têm-se observado que a co-inoculação de microrganismos é uma estratégia eficaz, pois combina diferentes microrganismos benéficos (MOLINA-ROMERO *et al.*, 2017). Para se obter inoculantes bacterianos eficazes de co-inoculação requer um entendimento profundo dos modos de interação, adesão e colonização bacteriana aos tecidos vegetais inoculados (MOLINA-ROMERO *et al.*, 2017), sendo necessários estudos que explorem esta tecnologia (HELMAN; BURDMAN; OKON, 2011). A partir dos estudos que certificam os benefícios e o sucesso da inoculação de BPCV, a co-inoculação de diferentes microrganismos traz uma estratégia promissora para o campo, além de ser uma abordagem que cumpre com os paradigmas da sustentabilidade (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015).

O presente trabalho demonstrou que a co-inoculação de *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SmR1 em milho (cv. DKB 390) sob condições *in vitro* foi efetiva. Neste ensaio também foi possível quantificar o DNA bacteriano por qPCR. Nas plantas co-inoculadas (Azos+Herbas) a quantidade de *H. seropedicae* SmR1 se manteve em relação a quantidade de *A. brasilense* FP2, que diminuiu com o passar do tempo de coleta (3, 7 e 9 D.A.I). Além disso também foi observado que as plantas co-inoculadas apresentaram incremento no comprimento radicular e da parte aérea em relação aos demais tratamentos.

No estudo do primeiro ensaio conduzido em casa de vegetação, não foi possível quantificar o DNA bacteriano por meio da qPCR, apesar disso, encontrou-se resultados substanciais em relação ao crescimento e desenvolvimento do milho, com incrementos nas variáveis: comprimento radicular e da parte aérea, diâmetro do colmo, largura e comprimento foliar, massa seca e acúmulo de nitrogênio em plantas submetidas aos tratamentos de co-inoculação (Azos+Herbas) e inoculadas com *H. seropedicae* (Herbas). Esses resultados demonstram um efeito inicial da co-inoculação em condições semi-controladas.

No segundo ensaio em casa de vegetação, os resultados das avaliações morfométricas e acúmulo de nitrogênio não foram substanciais, muito provavelmente devido ao solo com correção nutricional e com residual de nitrogênio deixado pela soja que foi cultivada anteriormente ao cultivo do milho. Confirmando que em solos nutricionalmente corrigidos ou com boa fertilidade, a planta não utiliza todo o potencial das bactérias diazotróficas inoculadas.

O presente trabalho contribui com a análise dos efeitos da interação das BPCV *A. brasilense* FP2 e *H. seropedicae* SmR1 em plantas de milho, cultivadas em solo com baixa fertilidade natural e em solo com correção nutricional. Embora exista uma vasta gama de trabalhos com as BPCV, a co-inoculação em plantas não leguminosas apresenta aspectos dessa associação que precisam ser elucidados.

Devido a notoriedade que as BPCV apresentam é importante dar continuidade neste longo caminho para elucidar os detalhes da interação e explorar as diversas possibilidades que o uso destes microrganismos oferecem na cultura do milho.

REFERÊNCIAS

- ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 286–295, 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S074000201300138X>. Acesso em: 03 set. 2020.
- AHMADI-RAD, S. *et al.* Foliar application of nitrogen fixing bacteria increases growth and yield of canola grown under different nitrogen regimes. **Rhizosphere**, v. 2, p. 34–37, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.08.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2452219816300490>. Acesso em: 03 set. 2020.
- ALEXANDRE, G. Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors. **Microbiology**, v. 156, n. 8, p. 2283–2293, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.039214-0>. Disponível em: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.039214-0#tab2>. Acesso em: 03 set. 2020.
- ALVES, G. C. *et al.* Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, n. 1–2, p. 307–321, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-014-2295-2>. Acesso em: 03 set. 2020.
- AMARAL, F. P. *et al.* Differential growth responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. **Plant Molecular Biology**, p. 689–697, 2016. DOI: 10.1007/s11103-016-0449-8. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11103-016-0449-8>. Acesso em: 03 set. 2020.
- AMARAL, F. P. *et al.* Gene expression analysis of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **Symbiosis**, v. 62, n. 1, p. 41–50, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13199-014-0270-6>. Acesso em: 03 set. 2020.
- ANDA. **Estatísticas-Macro indicadores**. Disponível em: <http://anda.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 03 set. 2020.
- ANPII. **Estatística**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 03 set. 2020.
- ANPII. **Haverá grande expansão de inoculantes no Brasil**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/agrolink-havera-grande-expansao-de-inoculantes-no-brasil/>. Acesso em: 03 set. 2020.

ARAÚJO, É. DE O. *et al.* Co-inoculation with rhizobacteria in association with humic acid and nitrogen on common bean development. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 21, p. 1908–1913, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.10824>. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-full-text/14AC98058711>. Acesso em: 03 set. 2020.

ARAUJO, F. F. *et al.* Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1043–1054, 2013. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n3p1043. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/5c11/342ffc3e16f895a24c4006b99626dee3404c.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

ARIF, M. S. *et al.* Nitrogen-enriched compost application combined with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) improves seed quality and nutrient use efficiency of sunflower. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 180, n. 4, p. 464–473, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/jpln.201600615>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jpln.201600615>. Acesso em: 03 set. 2020.

ARTUZO, F. D. *et al.* Gestão de custos na produção de milho e soja. **Revista Brasileira de Gestao de Negocios**, v. 20, n. 2, p. 273–294, 2018. DOI: <https://doi.org/10.7819/rbgn.v20i2.3192>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1806-48922018000200273&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 03 set. 2020.

ASKARY, M. *et al.* Influence of the co-inoculation *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium meliloti* plus 2,4-D on grain yield and N, P, K content of *Triticum aestivum* (Cv. Baccros and Mahdavi). **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 5, n. 3, p. 296–307, 2009. Disponível em: <https://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.520.7966&rep=rep1&type=pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

AUNG, T. T. *et al.* Co-inoculation effects of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum* sp. on competitive nodulation and rhizosphere eubacterial community structures of soybean under rhizobia-established soil conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 20, p. 2850–2862, 2013. Disponível em: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/131269>. Acesso em: 03 set. 2020.

BALDANI, J. I. *et al.* a Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86–93, 1986. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/608404/characterization-of-herbaspirillum-seropedicae-gen-nov-sp-nov-a-root-associated-nitrogen-fixing-bacterium>. Acesso em: 03 set. 2020.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0001-37652005000300014>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652005000300014. Acesso

em: 03 set. 2020.

BALDOTTO, L. E. B.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. Structural interaction between gfp-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* ram10 and pineapple plantlets “vitória”. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 114–125, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100015>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822011000100015. Acesso em: 03 set. 2020.

BALSANELLI, E. *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* *rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 2233–2244, 2010. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02187.x. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21966916/>. Acesso em: 03 set. 2020.

BALSANELLI, E. *et al.* Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343–2356, 2016. DOI: 10.1111/1462-2920.12887. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25923055/>. Acesso em: 03 set. 2020.

BANO, A.; FATIMA, M. Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 4, p. 405–413, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-008-0344-9>. Acesso em: 03 set. 2020.

BARBIERI, M. K. F. **INTERAÇÃO ENTRE MILHO (*Zea mays*), A BACTÉRIA *Azospirillum brasilense* E O FUNGO FITOPATOGÊNICO *Colletotrichum graminicola***. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2018.

BARROS, I. DE *et al.* Nitrogênio para a cultura do milho nos tabuleiros costeiros: Desempenho produtivo e econômico. **Embrapa Tabuleiros Costeiros**, p. 20, 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/152252/1/BP-109.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

BASHAN, Y. *et al.* Evidence that fibrillar anchoring is essential for *Azospirillum brasilense* Cd attachment to sand. **Plant and Soil**, v. 132, n. 1, p. 73–83, 1991. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00011014>. Acesso em: 03 set. 2020.

BASHAN, Y.; BASHAN, L. E. DE. **How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 108.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521–577, 2004. DOI: 10.1139/w04-035. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15467782/>. Acesso em: 03 set. 2020.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 591–608, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1139/m90-105>. Disponível em: <https://cdnsiencepub.com/doi/10.1139/m90-105>. Acesso em: 03 set. 2020.

BATISTA, F. DE C. *et al.* Potencial de microrganismos rizosféricos e endofíticos de milho em solubilizar o fosfato de ferro e produzir sideróforos. **Embrapa Milho e Sorgo**, p. 3–24, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/183975/1/bol-166.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

BATTISTUS, A. G. *et al.* Synergistic action of *Azospirillum brasilense* combined with thiamethoxam on the physiological quality of maize seedlings. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 49, p. 4501–4507, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB2014.14059>. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text/0C75A1348918>. Acesso em: 03 set. 2020.

BENITES, V. DE M.; POLIDORO, J. C.; RESENDE, Á. V. **Oportunidades para a inovação tecnológica no setor de fertilizantes no Brasil**, 2010. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48087/1/Oportunidades-inovacao.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

BERGAMASCHI, H.; MATZENAUER, R. **O milho e o clima**. Porto Alegre, RS: Emater/RS, 2014. Disponível em: http://www.emater.tcche.br/site/arquivos/milho/O_Milho_e_o_Clima.pdf. Acesso em: 03 set. 2020.

BHARDWAJ, D. *et al.* Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014. DOI: 10.1186/1475-2859-13-66. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24885352/>. Acesso em: 03 set. 2020.

BODDEY, R. M. *et al.* Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: Present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 139–149, 2003. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1024152126541>. Acesso em: 03 set. 2020.

BOTTA, A. L. *et al.* In vitro and in vivo inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. **New Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 666–674, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.01.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1871678413000046?via%3Dihub>. Acesso em: 03 set. 2020.

BOURKE, S. A. *et al.* Comparison of continuous core profiles and monitoring wells for assessing groundwater contamination by agricultural nitrate. **Groundwater Monitoring and Remediation**, v. 35, n. 1, p. 110–117, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1111/gwmr.12104>. Disponível em: <https://ngwa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/gwmr.12104>. Acesso em: 03 set. 2020.

BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e

- Abastecimento. Brasília, 2009. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise_sementes.pdf. Acesso em: 03 set. 2020.
- BREDA, F. A. *et al.* Modulation of nitrogen metabolism of maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 4, p. 547–558, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-018-1594-z>. Acesso em: 03 set. 2020.
- BREDA, F. A. D. F.; ALVES, G. C.; REIS, V. M. Produtividade de milho na presença de doses de N e de inoculação de *Herbaspirillum seropedicae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 1, p. 45–52, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1039080/produtividade-de-milho-na-presenca-de-doses-de-n-e-de-inoculacao-de-herbaspirillum-seropedicae>. Acesso em: 03 set. 2020.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C. *et al.* Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 113–125, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-011-1044-z>. Acesso em: 03 set. 2020.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. *et al.* Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Plos One**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174576>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0174576>. Acesso em: 03 set. 2020.
- BULEGON, L. G. *et al.* Enzymatic activity, gas exchange and production of soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense*. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 7, p. 888–896, 2017. DOI: 10.21475/ajcs.17.11.07.pne575. Disponível em: http://www.cropj.com/bulgeon_11_7_2017_888_896.pdf. Acesso em: 03 set. 2020.
- BURDMAN, S.; KIGEL, J.; OKON, Y. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 516, p. 923–929, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(96\)00222-2](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(96)00222-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071796002222>. Acesso em: 03 set. 2020.
- CALZAVARA, A. K. *et al.* Associative bacteria influence maize (*Zea mays* L.) growth, physiology and root anatomy under different nitrogen levels. **Plant Biology**, v. 20, n. 5, p. 870–878, 2018. DOI: 10.1111/plb.12841. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29762883/>. Acesso em: 03 set. 2020.
- CAMILIOS-NETO, D. *et al.* Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2014. DOI: 10.1186/1471-2164-15-378. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24886190/>. Acesso em: 03 set. 2020.

CÂNDIDO, A. C. T. F. *et al.* Nitrogen rates and residual effect of co-inoculation of soybean on maize plants. **Revista Caatinga**, v. 33, n. 3, p. 633–643, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/1983-21252020v33n306rc>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1983-21252020000300633&tlng=en. Acesso em: 03 set. 2020.

CANELLAS, L. P. *et al.* A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant and Soil**, v. 366, n. 1–2, p. 119–132, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-012-1382-5>. Acesso em: 03 set. 2020.

CANELLAS, L. P. *et al.* Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 13, n. 1, p. 131–138, 2015.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. *et al.* European Journal of soil biology identification of six differentially accumulated proteins of *Zea mays* seedlings (DKB240 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense*. **European Journal of Soil Biology**, v. 58, p. 45–50, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2013.06.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1164556313000605>. Acesso em: 03 set. 2020.

CARDOZO, A. M. **Inoculação de *Azospirillum brasilense*: efeito sobre crescimento de *Zea mays* em solo não estéril e quantificação de DNA bacteriano**. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

CARVALHO, G. A. B.; FERREIRA, E.; HUNGRIA, M. A importância do controle de qualidade dos inoculantes. **Jornada Acadêmica da Embrapa Soja**, v. V, p. 3, 2010. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/859226/a-importancia-do-controle-de-qualidade-dos-inoculantes>. Acesso em: 03 set. 2020.

CARVALHO, T. L. G. *et al.* Nice to meet you: genetic, epigenetic and metabolic controls of plant perception of beneficial associative and endophytic diazotrophic bacteria in non-leguminous plants. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 561–574, 1 abr. 2016. DOI: 10.1007/s11103-016-0435-1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26821805/>. Acesso em: 03 set. 2020.

CARVALHO, T. L. G. *et al.* Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 19, p. 5631–5642, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/eru319>. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/65/19/5631/2877458>. Acesso em: 03 set. 2020.

CHAVES, V. A. *et al.* Desenvolvimento inicial de duas variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 39, n. 6, p. 1595–1602, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/01000683rbcs20151144>. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100->

06832015000601595&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 03 set. 2020.

CHI, F. *et al.* Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7271–7278, 2005. DOI: 10.1128/AEM.71.11.7271-7278.2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287620/>. Acesso em: 03 set. 2020.

CHIBEBA, A. M. *et al.* Co-inoculation of soybean with *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* promotes early nodulation. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. June, p. 1641–1649, 2015. DOI: 10.4236/ajps.2015.610164. Disponível em: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=57586>. Acesso em: 03 set. 2020.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira. **Companhia Nacional de Abastecimento**, v. 5, n. 4, p. 1–113, 2019.

CORTIVO, C. *et al.* Increased root growth and nitrogen accumulation in common wheat following PGPR inoculation: Assessment of plant-microbe interactions by ESEM. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 247, n. July, p. 396–408, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.07.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167880917303055>. Acesso em: 03 set. 2020.

COSTA, P. B. DA *et al.* A model to explain plant growth promotion traits: A multivariate analysis of 2,211 bacterial isolates. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. 1–25, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116020>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0116020>. Acesso em: 03 set. 2020.

CUNHA, E. T. *et al.* *Azospirillum brasilense* viable cells enumeration using propidium monoazide-quantitative PCR. **Archives of Microbiology**, 2020. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-020-01877-0>. Acesso em: 03 set. 2020.

CURÁ, J. A. *et al.* Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. bacteria increases the tolerance of maize to drought stress. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 41, 2017. DOI: 10.3390/microorganisms5030041. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5620632/>. Acesso em: 03 set. 2020.

DALL’ASTA, P. *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* promotes maize growth but fails to control the maize leaf anthracnose. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, n. 1, p. 167–176, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12298-018-0616-2>. Acesso em: 03 set. 2020.

DALL’ASTA, P. *et al.* Tools to evaluate *Herbaspirillum seropedicae* abundance and *nifH* and *rpoC* expression in inoculated maize seedlings grown in vitro and in soil. **Plant Growth Regulation**, v. 83, n. 3, p. 397–408, 2017. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s10725-017-0306-z>. Acesso em: 03 set. 2020.

DARTORA, J. *et al.* Co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, p. 545–550, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n6p545-550>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662016000600545&lng=en&tlng=en. Acesso em: 03 set. 2020.

DEEPADEVI, M.; BASU, M. J.; SANTHAGURU, K. Response of *Sorghum bicolor* (L.) monech to dual inoculation with *Glomus fasciculatum* and *Herbaspirillum seropedicae*. **General and applied plant physiology**, v. 36, p. 176–182, 2010. Disponível em: http://www.bio21.bas.bg/ipp/gapbfiles/v-36/GAPP_v36_3-4_176-182.pdf. Acesso em: 03 set. 2020.

DEFEZ, R.; ANDREOZZI, A.; BIANCO, C. The overproduction of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in endophytes upregulates nitrogen fixation in both bacterial cultures and inoculated rice plants. **Microbial Ecology**, v. 74, n. 2, p. 441–452, 2017. DOI: 10.1007/s00248-017-0948-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-017-0948-4>. Acesso em: 03 set. 2020.

DESSAUX, Y.; GRANDCLÉMENT, C.; FAURE, D. Engineering the rhizosphere. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 3, p. 266–278, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1360138516000030>. Acesso em: 03 set. 2020.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrmicro954>. Acesso em: 03 set. 2020.

DUTTA, S.; PODILE, A. R. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): The bugs to debug the root zone. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 232–244, 2010. DOI: 10.3109/10408411003766806. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20635858/>. Acesso em: 03 set. 2020.

EGENER, T.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Endophytic expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. strain BH72 in rice roots. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 9, p. 813–819, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.9.813>. Disponível em: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI.1999.12.9.813>. Acesso em: 03 set. 2020.

EMBRAPA. Inoculante para milho. **Embrapa Agrobiologia**, p. 1–2, 2012. Disponível em: <https://www.embrapa.br/documents/1355054/1527012/4e+-+Inoculante+para+milho.pdf/6af01c83-ea34-4e8e-b1a0-dd6e82e695a0>. Acesso em: 03 set. 2020.

ESPINDULA, E. *et al.* *Azospirillum brasilense* FP2 modulates respiratory burst oxidase gene expression in maize seedlings. **Indian Society for Plant Physiology**, v. 22, p. 316–323, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40502-017-0311-2>. Acesso em: 03 set. 2020.

FACHINELLI, R.; CECCON, G. Co-inoculação com *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* na soja em sucessão ao milho-safrinha em solo arenoso e argiloso. **Acta Iguazu**, p. 99–108, 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/215572/1/37067.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

FALEIRO, A. C. *et al.* Real time PCR detection targeting *nifA* gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, p. 125–133, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13199-013-0262-y>. Acesso em: 03 set. 2020.

FALEIRO, A. C. *et al.* Microscopic and proteomic analysis of *Zea mays* roots (P30F53 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 2015, n. 10, p. 63–71, 2015. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12892-014-0061-x>. Acesso em: 03 set. 2020.

FAO. **Save and Grow in practice**. Roma, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4009e.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

FAOSTAT. **Fertilizers by Product**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RFB/visualize>. Acesso em: 03 set. 2020.

FAOSTAT. **Crops-Maize**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acesso em: 03 set. 2020.

FASCIGLIONE, G. *et al.* *Azospirillum* inoculation effects on growth, product quality and storage life of lettuce plants grown under salt stress. **Scientia Horticulturae**, v. 195, p. 154–162, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423815301795?via%3Dihub>. Acesso em: 03 set. 2020.

FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D.; BÅÅTH, E. Growth response of the bacterial community to pH in soils differing in pH. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 73, n. 1, p. 149–156, 2010. DOI: [10.1111/j.1574-6941.2010.00873.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00873.x). Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/20455934>. Acesso em: 03 set. 2020.

FERRARI, C. S. *et al.* Expressed proteins of *Herbaspirillum seropedicae* in maize (DKB240) roots-bacteria interaction revealed using proteomics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 2267–2277, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-014-1197-3>. Acesso em: 03 set. 2020.

FERREIRA, A. S. *et al.* Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 103–108, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.020>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139313001649>. Acesso em: 03 set. 2020.

FERREIRA, E. P. B. *et al.* Agronomical performance of upland rice cultivars inoculated with

- Azospirillum brasilense* depends on the plant genotype. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 46, n. 14, p. 1751–1762, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103624.2015.1043456>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00103624.2015.1043456>. Acesso em: 03 set. 2020.
- FERRI, G. C.; BRACCINI, A. L.; CAIUBI, L. Effects of associated co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* with *Azospirillum brasilense* on soybean yield and growth. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 1, p. 6–11, 2017. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.11711>. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/32CC5CC62225>. Acesso em: 03 set. 2020.
- FONTANA, C. A. *et al.* Genome sequence of *Azospirillum brasilense* REC3, isolated from strawberry plants. **Genome Announcements**, v. 6, n. 8, p. 1–2, 2018. DOI: [10.1128/genomeA.00089-18](https://doi.org/10.1128/genomeA.00089-18). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5823996/>. Acesso em: 03 set. 2020.
- FOUZIA, A. *et al.* Plant growth promoting and antagonistic traits of indigenous fluorescent *Pseudomonas* spp. isolated from wheat rhizosphere and a halimus endosphere. **European Scientific Journal**, v. 11, n. 24, p. 129–148, 2015. Disponível em: <https://ejournal.org/index.php/esj/article/view/6104>. Acesso em: 03 set. 2020.
- FOWLER, D. *et al.* The global nitrogen cycle in the twentyfirst century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1621, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164>. Disponível em: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.2013.0164>. Acesso em: 03 set. 2020.
- FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 35–59, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11104-008-9833-8>. Acesso em: 03 set. 2020.
- FUKAMI, J. *et al.* Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016. DOI: [10.1186/s13568-015-0171-y](https://doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y). Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140653/1/13568-2015-Article-171.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.
- FUKAMI, J. *et al.* Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v. 7, n. 1, 2017. DOI: [10.1186/s13568-017-0453-7](https://doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5514007/>. Acesso em: 03 set. 2020.
- FUKAMI, J. *et al.* Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. **Functional Plant Biology**, v. 45, n. 3, p. 328–339, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1071/FP17167>. Disponível em: <https://www.publish.csiro.au/FP/FP17167>. Acesso em: 03 set. 2020.
- FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond

- biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/189968/1/Fukami-73.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.
- GALINDO, F. S. *et al.* Corn yield and foliar diagnosis affected by nitrogen fertilization and inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 40, p. 1–18, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20150364>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-06832016000100526&script=sci_arttext&tlng=en. Acesso em: 03 set. 2020.
- GALINDO, F. S. *et al.* Technical and economic viability of co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars in the Cerrado. **Revista Brasileira de Engenharia Agricola e Ambiental**, v. 22, n. 1, p. 51–56, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n1p51-56>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662018000100051. Acesso em: 03 set. 2020.
- GHOLAMI, A. *et al.* Growth promotion of maize (*Zea mays* L.) by plant-growth-promoting rhizobacteria under field conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 43, n. 9, p. 1263–1272, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1080/00103624.2012.666302>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00103624.2012.666302>. Acesso em: 03 set. 2020.
- GHORCHIANI, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Improvement of growth and yield of maize under water stress by co-inoculating an arbuscular mycorrhizal fungus and a plant growth promoting rhizobacterium together with phosphate fertilizers. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 258, n. February, p. 59–70, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2018.02.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167880918300835>. Acesso em: 03 set. 2020.
- GLICK, B. R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. **Microbiological Research**, v. 169, n. 1, p. 30–39, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450131300150X>. Acesso em: 03 set. 2020.
- GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, p. 15, 2012. DOI: <https://doi.org/10.6064/2012/963401>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/scientifica/2012/963401/>. Acesso em: 03 set. 2020.
- GONZALEZ, A. J.; LARRABURU, E. E.; LLORENTE, B. E. *Azospirillum brasilense* increased salt tolerance of jojoba during in vitro rooting. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 41–48, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.06.017>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669015301874>. Acesso em: 03 set. 2020.

GONZALEZ-LOPEZ, J. *et al.* Root exudates of maize and production of auxins, gibberellins, cytokinins, amino acids and vitamins by *Azotobacter chroococcum* in chemically-defined media and dialysed-soil media. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 33, n. 1–2, p. 69–78, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1080/02772249109357748>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02772249109357748>. Acesso em: 03 set. 2020.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N.; DHANDHUKIA, P. C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23311932.2015.1127500>. Acesso em: 03 set. 2020.

GOUDA, S. *et al.* Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. **Microbiological Research**, v. 206, p. 131–140, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501317303415>. Acesso em: 03 set. 2020.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 395–412, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.08.030>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071704003608>. Acesso em: 03 set. 2020.

GROPPIA, M. D.; ZAWOZNIK, M. S.; TOMARO, M. L. Effect of co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on soybean plants. Effet de la co-inoculation du soja par *Bradyrhizobium* et *Azospirillum*. **European Journal of Soil Biology**, v. 34, p. 75–80, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(99\)90004-3](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(99)90004-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1164556399900043>. Acesso em: 03 set. 2020.

GUERRERO-MOLINA, M. F.; WINIK, B. C.; PEDRAZA, R. O. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 205–212, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139311002307?via%3Dihub>. Acesso em: 03 set. 2020.

GUIMARÃES, V. F. *et al.* Bactérias promotoras de crescimento: da FBN à regulação hormonal, possibilitando novas aplicações. In: **CIÊNCIAS AGRÁRIAS: ética do cuidado, legislação e tecnologia na agropecuária**. 2018.

GUIMARÃES, V. F. *et al.* Morphophysiological characteristics of maize inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* as seed treatment, cultivated in different types of soil. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, p. 2919–2924, 2014. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJAR2014.8692>. Disponível em: <https://academicjournals.org/journal/AJAR/article-abstract/11C555147525>. Acesso em: 03 set. 2020.

HADI, F.; BANO, A. Effect of diazotrophs (*Rhizobium* and *Azatebactor*) on growth of maize (*Zea mays* L.) and accumulation of lead (Pb) in different plant parts. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 6, p. 4363–4370, 2010. Disponível em:

<https://pdfs.semanticscholar.org/43a1/7d041f08d155c1c82f7fd5fab971ab7f3b1b.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

HARTMANN, A.; SCHMID, M. Plant-driven selection of microbes. **Plant Soil**, p. 235–257, 2009. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-008-9814-y> Acesso em: 03 set. 2020.

HEDDEN, P.; PHILLIPS, A. L. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 12, p. 523–530, 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01790-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01790-8). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11120474/>. Acesso em: 03 set. 2020.

HELMAN, Y.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Plant growth promotion by rhizosphere bacteria through direct effects. In: **Beneficial Microorganisms in Multicellular life forms**. Israel, p. 343, 2011.

HOSEINZADE, H. *et al.* Rice (*Oryza sativa* L.) nutrient management using mycorrhizal fungi and endophytic *Herbaspirillum seropedicae*. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15, n. 6, p. 1385–1394, 2016. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61241-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61241-2).

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095311915612412>. Acesso em: 03 set. 2020.

HOUGS, L.; GATTO, F.; ŽEL, J. **Verification of analytical methods for GMO testing when implementing interlaboratory validated methods**. Version 2. Luxembourg: ENGL, 2017. DOI: 10.2760/645114. Disponível em:

<https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/verification-analytical-methods-gmo-testing-when-implementing-interlaboratory-validated-methods>. Acesso em: 03 set. 2020.

HUNGRIA, M. *et al.* Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-009-0262-0>. Acesso em: 03 set. 2020.

HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja**, 2011. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/29676/1/Inoculacao-com-azospirillum.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C. A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. **Embrapa Soja**, p. 80, 2007. Disponível em:

<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/564908/a-importancia-do-processo-de-fixacao-biologica-do-nitrogenio-para-a-cultura-da-soja-componente-essencial-para-a-competitividade-do-produto-brasileiro>. Acesso em: 03 set. 2020.

- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: Strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791–801, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00374-012-0771-5>. Acesso em: 03 set. 2020.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A new biotechnological tool to improve yield and sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, n. 06, p. 811–817, 2015. DOI: 10.4236/ajps.2015.66087. Disponível em: <https://www.scirp.org/journal/paperinformation.aspx?paperid=55340>. Acesso em: 03 set. 2020.
- IFA, I. F. A. Fertilizer Outlook 2019-2023. p. 26–28, 2019.
- IFA, I. F. A. Increasing yields and improving soil health organic and mineral fertilizer: differences and similarities organic and mineral fertilizers are the same to plants. **Integrated plant nutrient management**, p. 1–9, 2018.
- ILHA, E. C. *et al.* Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 597–606, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13213-015-1137-7>. Acesso em: 03 set. 2020.
- JAVAID, A. Beneficial microorganisms for sustainable agriculture. In: **Sustainable Agriculture Reviews 4: Genetic engineering, biofertilisation, soil quality and organic farming**. v. 11p. 347–369. Disponível: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-8741-6_12. Acesso em: 03 set. 2020.
- JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3–14, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304423815301850>. Acesso em: 03 set. 2020.
- KAMAL, R.; GUSAIN, Y. S.; KUMAR, V. Interaction and symbiosis of AM fungi, Actinomycetes and plant growth promoting rhizobacteria with plants: Strategies for the improvement of plants health and defense system. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 7, p. 564–585, 2014.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Diversity and importance of diazotrophic bacteria to agricultural sustainability in the tropics. In: **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. p. 1–439, 2017. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-55804-2_12. Acesso em: 03 set. 2020.
- KIM, K.-Y. *et al.* Effect of *Brevibacterium iodinum* RS16 and *Methylobacterium oryzae* CBMB20 inoculation on seed germination and early growth of maize and sorghum-sudangrass hybrid seedling under different salinity levels. **Korean Journal of Soil Science and Fertilizer**, v. 45, n. 1, p. 51–58, 2012.
- KLASSEN, G. *et al.* Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum*

seropedicae SMRI. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 891, p. 887–891, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1139/m97-129>. Disponível em: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/m97-129#.X1JAqXIKjIU>. Acesso em: 03 set. 2020.

KOBAYASHI, T.; NISHIZAWA, N. K. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 131–152, 2012. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105522. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042811-105522>. Acesso em: 03 set. 2020.

KUAN, K. B. *et al.* Plant growth-promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth, nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. **Plos One**, v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016. DOI: 10.1371/journal.pone.0152478. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0152478>. Acesso em: 03 set. 2020.

KUNDAN, R. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria: mechanism and current prospective. **Journal of Fertilizers & Pesticides**, v. 06, n. 02, 2015. DOI: 10.4172/2471-2728.1000155. Disponível em: <https://www.longdom.org/open-access/plant-growth-promoting-rhizobacteria-mechanism-and-current-prospective-jbfbp-1000155.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

LACERDA, J. J. J. *et al.* Adubação, produtividade e rentabilidade da rotação entre soja e milho em solo com fertilidade construída. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, n. 9, p. 769–778, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000900005>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-204X20150009000769&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 03 set. 2020.

LEE, G. W.; LEE, K. J.; CHAE, J. C. *Herbaspirillum* sp. strain GW103 alleviates salt stress in *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*. **Protoplasma**, v. 253, n. 3, p. 655–661, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00709-015-0872-8>. Acesso em: 03 set. 2020.

LIU, H. *et al.* Inner plant values: Diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02552/full>. Acesso em: 03 set. 2020.

LOVAISA, N. C.; MOLINA, M. F. G.; SALAZAR, S. M. Response of strawberry plants inoculated with *Azospirillum* and *Burkholderia* at field conditions. **Revista agronómica del noroeste argentino**, v. 35, n. 1, p. 33–36, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ranar/v35n1/v35n1a04.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

LPSN. **Genus:** *Azospirillum*. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/azospirillum>. Acesso em: 03 set. 2020a.

LPSN. **Genus:** *Herbaspirillum*. Disponível em: <https://lpsn.dsmz.de/genus/herbaspirillum>.

Acesso em: 03 set. 2020b.

MACHADO, H. B. *et al.* Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549–553, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1139/m91-092>. Disponível em: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/m91-092#.X1IkYHIKjIU>. Acesso em: 03 set. 2020.

MADHAIYAN, M. *et al.* Effect of co-inoculation of methylotrophic *Methylobacterium oryzae* with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice. **Plant and Soil**, v. 328, n. 1, p. 71–82, 2010. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-009-0083-1>. Acesso em: 03 set. 2020.

MAGALHÃES, C. P.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da Produção de Milho**. 2006. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/19620/1/Circ_76.pdf. Acesso em: 03 set. 2020.

MALINICH, E. A.; BAUER, C. E. The plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean). **Symbiosis**, v. 76, n. 2, p. 97–108, 2018. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13199-018-0539-2>. Acesso em: 03 set. 2020.

MANUAL. Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina. p. 400, 2004. Disponível em: http://www.sbcs-nrs.org.br/docs/manual_de_adubacao_2004_versao_internet.pdf. Acesso em: 03 set. 2020.

MAPA. **Instrução normativa da nº 13, de 24 de março de 2011**, [2011]. Disponível em: <http://www.ctpconsultoria.com.br/pdf/Instrucao-Normativa-13-de-24-03-2011.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

MARTINEZ-VIVEROS, O. *et al.* Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 293–319, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>. Disponível em: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-95162010000100006. Acesso em: 03 set. 2020.

MATSUOKA, Y. *et al.* A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6080–6084, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.052125199>. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/99/9/6080>. Acesso em: 03 set. 2020.

MEHNAZ, S. *et al.* Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 10, p. 1848–1856, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.07.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071710002506>. Acesso em: 03 set. 2020.

MEIRELLES, A. F. M.; BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B. Produtividade da alface (*Lactuca sativa* L.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas, em condições de campo. **Revista Ceres**, v. 64, n. 5, p. 553–556, 2017. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1590/0034-737x201764050014>. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-737X2017000500553.

Acesso em: 03 set. 2020.

MELO, A. DA P. *et al.* Mixed rhizobia and *Herbaspirillum seropedicae* inoculations with humic acid-like substances improve water-stress recovery in common beans. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2017. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1186%2Fs40538-017-0090-z>. Acesso em: 03 set. 2020.

MIRANSARI, M. Soil microbes and plant fertilization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 875–885, 2011. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-011-3521-y>. Acesso em: 03 set. 2020.

MIRJANA JARAK. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 27, p. 5683–5690, 2012.

Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20123285075>. Acesso em: 03 set. 2020.

MOHIUDDIN, M.; MOHAMMED, M. K. Influence of fungicide (Carbendazim) and herbicides (2,4-D and Metribuzin) on non-target beneficial soil microorganisms of rhizospheric soil of tomato crop. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 5, n. 1, p. 47–50, 2013. Disponível em:

https://pdfs.semanticscholar.org/eff4/b990d36529de9e18f05bcb19432719823080.pdf?_ga=2.94300509.1768804697.1599170315-1170948643.1586439211. Acesso em: 03 set. 2020.

MOLINA-ROMERO, D. *et al.* Compatible bacterial mixture, tolerant to desiccation, improves maize plant growth. **Plos One**, v. 12, n. 11, p. 1–21, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187913>. Disponível em:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0187913>. Acesso em: 03 set. 2020.

MOLLA, A. H. *et al.* Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 4–5, p. 457–463, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00186-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00186-3). Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071700001863>. Acesso em: 03 set. 2020.

MOLLA, A. H.; SHAMSUDDIN, Z. H.; SAUD, H. M. Mechanism of root growth and promotion of nodulation in vegetable soybean by *Azospirillum brasilense*. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 32, n. 13–14, p. 2177–2187, 2006. DOI:

<https://doi.org/10.1081/CSS-120000276>. Disponível em:

<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/CSS-120000276>. Acesso em: 03 set. 2020.

MONTEIRO, R. A. *et al.* *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 175–196, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-012-1125-7>. Acesso em: 03 set. 2020.

MOREIRA, H. *et al.* Mine land valorization through energy maize production enhanced by the application of plant growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 7, p. 6940–6950, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-015-5914-4>. Acesso em: 03 set. 2020.

MUKHERJEE, T. *et al.* *Azospirillum brasilense* chemotaxis depends on two signaling pathways regulating distinct motility parameters. **Journal of Bacteriology**, v. 198, n. 12, p. 1764–1772, 2016. DOI: 10.1128/JB.00020-16. Disponível em: <https://jb.asm.org/content/198/12/1764#skip-link>. Acesso em: 03 set. 2020.

MURAI, N. Review: Plant growth hormone cytokinins control the crop seed yield. **American Journal of Plant Sciences**, v. 05, n. 14, p. 2178–2187, 2014. Disponível em: <https://m.scirp.org/papers/47554>. Acesso em: 03 set. 2020.

MUTHUKUMARASAMY, R. *et al.* N-fertilizer saving by the inoculation of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* sp. in micropropagated sugarcane plants. **Microbiological Research**, v. 161, n. 3, p. 238–245, 2006. DOI: 10.1016/j.micres.2005.08.007. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501305000960?via%3Dihub>. Acesso em: 03 set. 2020.

NAKAO, A. H. *et al.* Intercropping *Urochloa brizantha* and sorghum inoculated with *Azospirillum brasilense* for silage. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 49, n. 3, p. 501–511, 2018. DOI: <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20180057>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-66902018000300501. Acesso em: 03 set. 2020.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. **FEMS Microbiology Letters**, v. 291, n. 2, p. 137–142, 2009. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01429.x. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/291/2/137/501646>. Acesso em: 03 set. 2020.

NUSS, E. T.; TANUMIHARDJO, S. A. Maize: A paramount staple crop in the context of global nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 417–436, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00117.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1541-4337.2010.00117.x>. Acesso em: 03 set. 2020.

OLIVARES, F. L. *et al.* Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. **Scientia Horticulturae**, v. 183, p. 100–108, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423814006323>. Acesso em: 03

set. 2020.

OLIVARES, F. L. *et al.* Plant growth promoting bacteria and humic substances : crop promotion and mechanisms of action. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, p. 1–13, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40538-017-0112-x>. Acesso em: 03 set. 2020.

OLIVEIRA, I. J; FONTES, J. R. A; BARRETO, J. F; PINHEIRO, J. O. C. Recomendações técnicas para o cultivo do milho no Amazonas. **Embrapa. Circular Técnica 68**, p. 28, 2018. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/183368/1/12018-Final.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

OLIVEIRA, A. L. M. *et al.* Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 106–113, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.09.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1164556308001076>. Acesso em: 03 set. 2020.

OWEN, D. *et al.* Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 41–54, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139314002698>. Acesso em: 03 set. 2020.

PAIVA, C. A. DE O. *et al.* Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus megaterium* na cultura do milho. Recomendação agrônômica de cepas de *Bacillus subtilis* e *Bacillus*. **Embrapa Milho e Sorgo**, p. 1–19, 2020. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1120362/1/Circ-Tec.-260.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

PANDE, A.; PANDEY, P.; KAUSHIK, S. Co-inoculation of and enhances plant growth of maize (*Zea mays*) under green house and field condition. **Korean Journal of Agricultural Science**, v. 44, n. 2, p. 196–210, 2017. Disponível em: <http://www.koreascience.or.kr/article/JAKO201721241151300.pub>. Acesso em: 03 set. 2020.

PANKIEVICZ, V. C. S. *et al.* Robust biological nitrogen fixation in a model grass-bacterial association. **Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907–919, 2015. DOI: 10.1111/tpj.12777. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25645593/>. Acesso em: 03 set. 2020.

PECHANOVA, O. *et al.* Maize proteomics: An insight into the biology of an important cereal crop. **Proteomics**, v. 13, n. 3–4, p. 637–662, 2013. DOI: 10.1002/pmic.201200275. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23197376/>. Acesso em: 03 set. 2020.

PEDROSA, F. O. *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **Plos Genetics**, v. 7, n. 5, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002064>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosgenetics/article?id=10.1371/journal.pgen.1002064>. Acesso em:

03 set. 2020.

PEDROSA, F. O. *et al.* The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-019-04124-8>. Acesso em: 03 set. 2020.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, n. 1, p. 95–101, 1984. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1984.tb01042.x>. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsle/article/23/1/95/511714>. Acesso em: 03 set. 2020.

PENNA, C. *et al.* A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. **AMB Express**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2011. DOI: 10.1186/2191-0855-1-21. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3222313/>. Acesso em: 03 set. 2020.

PEREG, L.; BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil**, v. 399, n. 1–2, p. 389–414, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-015-2778-9>. Acesso em: 03 set. 2020.

PEREIRA, T. P. *et al.* Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 7, p. 660–670, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12033-014-9742-4>. Acesso em: 03 set. 2020.

PERES, A. R. *et al.* Co-inoculation of *Rhizobium tropici* and *Azospirillum brasilense* in common beans grown under two irrigation depths. **Revista Ceres**, v. 63, n. 2, p. 198–207, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201663020011>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0034-737X2016000200198&script=sci_arttext. Acesso em: 03 set. 2020.

PII, Y. *et al.* Modulation of Fe acquisition process by *Azospirillum brasilense* in cucumber plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 130, p. 216–225, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.06.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0098847216301253>. Acesso em: 03 set. 2020.

PUENTE, M. L. *et al.* The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. **Symbiosis**, v. 76, p. 41–49, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13199-017-0536-x>. Acesso em: 03 set. 2020.

PUENTE, M. L. *et al.* Improvement of soybean grain nutritional quality under foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Az39. **Symbiosis**, v. 77, n. 1, p. 41–47, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13199-018-0568-x>. Acesso em: 03 set. 2020.

RAMEGOWDA, V.; SENTHIL-KUMAR, M. The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen

combination. **Journal of Plant Physiology**, v. 176, p. 47–54, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.11.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0176161714003447?via%3Dihub>. Acesso em: 03 set. 2020.

RAMIREZ, K. S.; CRAINE, J. M.; FIERER, N. Consistent effects of nitrogen amendments on soil microbial communities and processes across biomes. **Global Change Biology**, v. 18, n. 6, p. 1918–1927, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02639.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2486.2012.02639.x>. Acesso em: 03 set. 2020.

RAMÍREZ-MATA, A. *et al.* The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. **Research in Microbiology**, v. 167, n. 3, p. 190–201, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.12.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250815002041?via%3Dihub>. Acesso em: 03 set. 2020.

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, p. 105–12, 2014. DOI: 10.1111/nyas.12396. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24650320/>. Acesso em: 03 set. 2020.

REIS, V. M. *et al.* Recomendação de inoculante para cultura de milho utilizando a bactéria *Herbaspirillum seropedicae*, estirpe BR 11417. **Embrapa**, p. 1–2, 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/42756/1/COT119-09.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 989–996, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.111.175448>. Disponível em: <http://www.plantphysiol.org/content/156/3/989>. Acesso em: 03 set. 2020.

RILLING, J. I. *et al.* Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth–promoting bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 130, n. November 2018, p. 205–219, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.012>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003807171830422X>. Acesso em: 03 set. 2020.

RODRIGUES, A. C. *et al.* *Azospirillum* sp. as a challenge for Agriculture. **Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem**, v. 12, n. February 2017, p. 337–349, 2015.

RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N.; DARDANELLI, M. S.; RUÍZ-SAÍNIZ, J. E. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 272, n. 2, p. 127–136, 2007. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2007.00761.x. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/17521360>. Acesso em: 03 set. 2020.

ROJAS-TAPIAS, D. F.; BONILLA, R.; DUSSÁN, J. Effect of inoculation and co-inoculation of *Acinetobacter* sp. RG30 and *Pseudomonas putida* GN04 on growth, fitness, and copper accumulation of maize (*Zea mays*). **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 225, n. 12, 2014. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-014-2232-2>. Acesso em: 03 set. 2020.

RONCATO-MACCARI, L. D. B. *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, n. 1, p. 39–47, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00108-9). Disponível em: <https://academic.oup.com/femsec/article/45/1/39/534146>. Acesso em: 03 set. 2020.

RUEDA, D. *et al.* Effect of *Azospirillum* spp. and *Azotobacter* spp. on the growth and yield of strawberry (*Fragaria vesca*) in hydroponic system under different nitrogen levels. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 1, p. 048–054, 2016. DOI: 10.7324/JAPS.2016.600108. Disponível em: https://japsonline.com/admin/php/uploads/1747_pdf.pdf. Acesso em: 03 set. 2020.

SAHA, R. *et al.* Microbial siderophores: A mini review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 303–317, 2013. DOI: 10.1002/jobm.201100552. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/22733623>. Acesso em: 03 set. 2020.

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111, n. 5, p. 743–767, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mct048>. Disponível em: <https://academic.oup.com/aob/article/111/5/743/193622>. Acesso em: 03 set. 2020.

SANTOS, C. L. DOS R. *et al.* Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 96–106, 2017a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.02.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139317301531>. Acesso em: 03 set. 2020.

SANTOS, F. *et al.* A novel interaction between plant-beneficial rhizobacteria and roots: Colonization induces corn resistance against the root herbivore *diabrotica speciosa*. **Plos One**, v. 9, n. 11, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113280>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0113280>. Acesso em: 03 set. 2020.

SANTOS, H. G. S. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5. ed. Brasília, 2018. Disponível em: <https://www.embrapa.br/solos/sibcs>. Acesso em: 03 set. 2020.

SANTOS, K. F. D. N. *et al.* Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, n. 1–2, p. 245–255, 2017b. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-016-3140-6>. Acesso em: 03 set. 2020.

SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial

- bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-019-0932-0>. Acesso em: 03 set. 2020.
- SILVA, E. R. *et al.* Can co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* alleviate adverse effects of drought stress on soybean (*Glycine max* L. Merrill.)? **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 3, p. 325–335, 2019. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00203-018-01617-5>. Acesso em: 03 set. 2020.
- SILVA, S. F.; OLIVARES, F. L.; CANELLAS, L. P. The biostimulant manufactured using diazotrophic endophytic bacteria and humates is effective to increase sugarcane yield. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2017. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40538-017-0106-8>. Acesso em: 03 set. 2020.
- SOARES, L. H. B. Tecnologias de Aplicação e Formulações: Estágio tecnológico da produção de inoculantes no país. **Anais da XIX RELARE**. 2018. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1098167/1/DOC3102019.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.
- SOUZA, J. E. B.; FERREIRA, E. P. DE B. Improving sustainability of common bean production systems by co-inoculating rhizobia and azospirilla. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 237, p. 250–257, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.12.040>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167880916306296>. Acesso em: 03 set. 2020.
- SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401–419, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572015000400401&lng=en&tlng=en. Acesso em: 03 set. 2020.
- SOUZA, R. DE *et al.* The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. **Plant and Soil**, v. 366, n. 1–2, p. 585–603, 2013. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-012-1430-1>. Acesso em: 03 set. 2020.
- STAR, L. *et al.* The *Vicia sativa* spp. nigra - *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae symbiotic interaction is improved by *Azospirillum brasilense*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 165–174, 2012. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-010-0713-7>. Acesso em: 03 set. 2020.
- STETS, M. I. *et al.* Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700–6709, 2015. DOI: 10.1128/AEM.01351-15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26187960/>. Acesso em: 03 set. 2020.
- SUN, L. *et al.* Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **microbial ecology**, p. 415–424, 2008. Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00248-007-9287-1>. Acesso em: 03 set. 2020.

SURESHBABU, K.; AMARESAN, N.; KUMAR, K. Amazing multiple function properties of plant growth promoting rhizobacteria in the rhizosphere soil. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 2, p. 661–683, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.502.074>. Disponível em: <https://www.ijcmas.com/5-2-2016/K.%20Sureshbabu,%20et%20al.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBERAINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, 1978. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/600745/1/AtaxonomicstudyoftheSpirillumlipoferumgroup.pdf>. Acesso em: 03 set. 2020.

TEDESCO, M. J. *et al.* **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2^a ed, 1995.

TORTORA, M. L.; DÍAZ-RICCI, J. C.; PEDRAZA, R. O. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 4, p. 275–286, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00203-010-0672-7>. Acesso em: 03 set. 2020.

TROPICOS. *Zea mays* L. Disponível em: <http://legacy.tropicos.org/Name/25510055>. Acesso em: 03 set. 2020.

ULLOA-OGAZ, A.; MUNOZ-CASTELLANOS, L.; NEVAREZ-MOORILLON, G. Biocontrol of phytopathogens: antibiotic production as mechanism of control. **The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs, Edition: 1st**, n. January, p. 305–309, 2015.

VARGAS, L. *et al.* Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: A transcriptomic view of hormone pathways. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. 1–37, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114744>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0114744>. Acesso em: 03 set. 2020.

VEJAN, P. *et al.* Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—A review. **Molecules**, p. 1–17, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/5/573>. Acesso em: 03 set. 2020.

VERSTRAETEN, N. *et al.* Living on a surface: swarming and biofilm formation. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 496–506, 2008. DOI: 10.1016/j.tim.2008.07.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18775660/>. Acesso em: 03 set. 2020.

VICARIO, J. C. *et al.* Promotion of peanut growth by co-inoculation with selected strains of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 35, n. 2, p. 413–419, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00344-015-9547-0>. Acesso em: 03 set. 2020.

VURUKONDA, S. S. K. P. *et al.* Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, p. 13-24, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.12.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501315300380?via%3Dihub>. Acesso em: 03 set. 2020.

WANG, K. *et al.* Maize centromeres expand and adopt a uniform size in the genetic background of oat. **Genome Research**, v. 24, n. 1, p. 107–116, 2014. DOI: 10.1101/gr.160887.113. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24100079/>. Acesso em: 03 set. 2020.

WANG, X. *et al.* The dual inoculation of endophytic fungi and bacteria promotes seedlings growth in *Dendrobium catenatum* (*Orchidaceae*) under in vitro culture conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 126, n. 3, p. 523–531, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11240-016-1021-6>. Acesso em: 03 set. 2020.

WEI, Z. *et al.* Rhizosphere immunity: Targeting the underground for sustainable plant health management. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, v. 7, n. 3, p. 317–328, 2020. DOI: <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2020346>. Disponível em: <http://journal.hep.com.cn/fase/EN/10.15302/J-FASE-2020346>. Acesso em: 03 set. 2020.

WISNIEWSKI-DYÉ, F. *et al.* *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. **Plos Genetics**, v. 7, n. 12, 2011. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002430. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3245306/>. Acesso em: 03 set. 2020.

WORDELL FILHO, J. A.; CHIARADIA, L. A. A cultura do milho em Santa Catarina. **Embrapa Soja**, p. 398, 2016.

WORDELL FILHO, J. A.; ELIAS, H. T. **A cultura do milho em Santa Catarina**. 2. ed. Florianópolis: Epagri, 2012.

YAZDANI, M. *et al.* Effect of phosphate solubilization microorganisms and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components of corn. **Scientia Agriculturae**, v. 18, n. 3, p. 50–52, 2009. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IR2011005195>. Acesso em: 03 set. 2020.

ZEFFA, D. M. *et al.* The influence of topdressing nitrogen on *Azospirillum* spp. Inoculation in maize crops through meta-analysis. **Bragantia**, v. 77, n. 3, p. 493–500, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4499.2017273>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0006-87052018000300493. Acesso em: 03 set. 2020.

ZEFFA, D. M. *et al.* *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **Plos One**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0215332>. Acesso em: 03 set.

2020.

ZHANG, R.; VIVANCO, J. M.; SHEN, Q. The unseen rhizosphere root–soil–microbe interactions for crop production. **Current Opinion in Microbiology**, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369527417300012>. Acesso em: 03 set. 2020.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 3, p. 281–289, 2006. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-006-0333-6>. Acesso em: 03 set. 2020.

APÊNDICE A – Tabela de gêneros bacterianas co-inoculados em milho

Tabela 12 - Co-inoculação com BPCV inoculadas em plantas de milho.

Co-inoculação com BPVC	Benefícios	Referência
<i>A. brasilense; R. tropici</i>	Proteção contra os efeitos negativos do estresse salino.	(FUKAMI <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. brasilense; H. seropedicae</i>	Incremento de 12% de quantidade de fósforo na folha.	(DARTORA <i>et al.</i> , 2016)
<i>Azotobacter corooococum; A. brasilense; P. putida; B. lentus.</i>	Aumento do número da linha e de grãos por linha; Rendimento de grãos.	(YAZDANI <i>et al.</i> , 2009)
<i>Azotobacter Azospirillum</i>	Aumento significativo do peso seco total da planta.	(GHOLAMI <i>et al.</i> , 2012)
<i>Burkholderia cepacia; Alcaligenes aquatilis</i>	Maior teor de fósforo solúvel no meio de cultivo; Aumento na altura da parte aérea; Peso seco da parte aérea; Comprimento da raiz; Peso seco das raízes; Comprimento das folhas. Aumento no comprimento da espiga; Número de grãos/espiga; Peso dos grãos.	(PANDE; PANDEY; KAUSHIK, 2017)
<i>Brevibacterium iodinum; Methylobacterium oryzae</i>	Aumento da germinação das sementes; Mitigou o estresse de salinidade; Promoveu o comprimento da raiz.	(KIM <i>et al.</i> , 2012)
<i>Chryseobacterium humi; P. reactans</i>	Aumento da biomassa das raízes e brotações; Alongamento da brotação; Melhorou substancialmente o acúmulo de P nas raízes.	(MOREIRA <i>et al.</i> , 2016)

<i>Acinetobacter sp.</i> ; <i>P. putida</i>	Aumento da condutividade do solo e liberar Cu do solo; O efeito da inoculação no crescimento das plantas foi maior no solo contaminado do que no não contaminado, aliviou o estresse causado pelo Cu; Melhorou a extração de Cu pelo milho.	(ROJAS-TAPIAS; BONILLA; DUSSÁN, 2014)
<i>P. putida</i> ; <i>Sphingomonas sp.</i> <i>A. brasilense</i> e <i>Acinetobacter sp.</i>	Aumento do peso seco da parte aérea e da raiz, altura e diâmetro da planta.	(MOLINA-ROMERO <i>et al.</i> , 2017)
<i>Pseudomonas sp.</i> ; <i>Bacillus sp.</i>	Aumento da altura e peso seco das plantas.	(MIRJANA JARAK, 2012)
<i>Azotobacter chroococcum</i> ; <i>R. leguminosarum</i>	Aumento do crescimento e a biomassa seca da planta em solo poluído com Pb; A translocação do Pb para as folhas.	(HADI; BANO, 2010)
<i>Rhizobium</i> ; <i>Pseudomonas</i>	A tolerância ao sal da inoculação foi geralmente mediada por reduções no vazamento de eletrólitos e no potencial osmótico; Aumento na produção de osmoregulantes (prolina); Manutenção do teor relativo de água das folhas e absorção seletiva de íons K.	(BANO; FATIMA, 2009)

Fonte: Elaborado pela autora (2020).