



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

**TESE DE DOUTORADO**

Viabilidade celular de *Herbaspirillum* sp. e análise de genômica comparativa do gênero *Herbaspirillum*

ANA MARINA PEDROLO

Orientadora: Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi  
Coorientador: Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares

Florianópolis, 2022.

ANA MARINA PEDROLO

Viabilidade celular de *Herbaspirillum* sp. e análise de genômica comparativa do gênero *Herbaspirillum*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do Grau de Doutor em Ciências. Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Maisonnave Arisi

Orientadora: Dr(a). Ana Carolina Maisonnave Arisi  
Coorientador: Dr. Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares

FLORIANÓPOLIS

2022

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

Pedrolo, Ana Marina

Viabilidade celular de *Herbaspirillum* sp. e análise de genômica comparativa do gênero *Herbaspirillum* / Ana Marina Pedrolo ; orientadora, Ana Carolina Maisonnave Arisi, coorientador, Cláudio Roberto Fonseca Sousa Soares, 2023. 99 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal . 3. *Herbaspirillum* . 4. Genes nif. 5. PMA-qPCR. I. Arisi, Ana Carolina Maisonnave. II. Soares, Cláudio Roberto Fonseca Sousa . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

Ana Marina Pedrolo

Viabilidade celular de *Herbaspirillum* sp. e análise de genômica comparativa do gênero *Herbaspirillum*

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 09 de dezembro de 2022 pelos membros:

Prof.<sup>a</sup> Carolina Weigert Galvão, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Estadual de Ponta Grossa

Prof. Ricardo Mazzon, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Rosete Pescador, Dr.<sup>a</sup>  
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 Doutor(a) em Ciências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof.<sup>a</sup> Ana Carolina Maisonnave Arisi Dr.<sup>a</sup> Orientadora

Florianópolis, 2022.

Ao meu pai Carlos (*in memoriam*), minha mãe  
Roselene e minha avó Nair (*in memoriam*), por  
todo amor, carinho, dedicação e exemplo

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

A Deus e ao Universo, pela vida, proteção, luz, e força em todos os momentos dessa caminhada.

Agradeço a professora Ana Carolina Maissonave Arisi, orientadora desse trabalho, pelo conhecimento, pelos ensinamentos, pela oportunidade de cursar o doutorado junto ao Laboratório de Biologia Molecular, e pela confiança depositada.

Ao coorientador deste trabalho, professor Cláudio Roberto Fônsaca Sousa Soares, pela disposição, confiança e pelos ensinamentos.

Ao meu pai Carlos (*in memoriam*), que não pôde acompanhar essa jornada de perto, mas que em vida mostrou o exemplo de amor, caráter e bondade. Obrigada por ser minha luz guia durante todo esse caminho.

À minha mãe Roselene, por todo amor, carinho, apoio, força e dedicação e principalmente por me ensinar a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu namorado Diego pelo amor, carinho, paciência e incentivo.

À minha amiga Ana Carolina e à minha prima Bianca por toda amizade, companheirismo, carinho e incentivo. Obrigada por estarem sempre presentes.

À minha colega de laboratório e amiga Elisandra obrigada por toda ajuda, carinho, apoio e amizade. Obrigada pelas risadas, pelo ombro amigo nos momentos difíceis, pelos conselhos e segredos compartilhados.

Às minhas colegas de Laboratório Lorena, Lúcia, Tuany e Gabriela obrigada pelos ótimos momentos, pelos cafés com bolo e pelo conhecimento compartilhado. Obrigada aos estagiários Nicolle e Leonardo.

Ao bioinformata Filipe Matteoli pela parceria, por todos os conhecimentos e ensinamentos.

Gostaria de agradecer a Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela alta qualidade de ensino. Obrigada aos professores e funcionários com quem tive o privilégio de conviver e aprender.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Aos membros da banca avaliadora pela disponibilidade em avaliar o trabalho.

## RESUMO

Bactérias do gênero *Herbaspirillum* foram isoladas de diversos tipos de ambientes e localizações geográficas, e o gênero apresenta grande diversidade. *Herbaspirillum seropedicae* é a espécie mais estudada do gênero, principalmente devido seu potencial para ser utilizada como inoculante. Métodos confiáveis, de alto rendimento e econômicos são necessários para determinar a viabilidade bacteriana em formulações de inoculantes ou em plantas. O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver um ensaio de avaliação da viabilidade celular de *Herbaspirillum seropedicae* em raízes de milho utilizando a metodologia PMA-qPCR e comparar os genomas do gênero *Herbaspirillum* para estabelecer a diversidade gênica do gênero. *H. seropedicae* foi cultivada em meio de cultura e submetida a tratamento térmico a 48 °C por diferentes períodos de tempo. Raízes de milho foram inoculadas, cultivadas *in vitro* e coletadas sete dias após a inoculação. As células viáveis de bactérias foram quantificadas usando ensaios de qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa. Foram elaboradas curvas padrão e a eficiência obtida variou de 85 a 99%. O limite de detecção (LOD) foi de  $10^1$  cópias do genoma, correspondendo a 60,3 pg de DNA. As enumerações obtidas em culturas puras por qPCR, PMA-qPCR e contagem de placas foram  $8,85 \pm 0,16$ ,  $6,51 \pm 0,12$  e  $2,25 \pm 0,30$  log UFC.mL<sup>-1</sup> após tratamento térmico, respectivamente. Esses resultados mostraram que o PMA-qPCR é uma abordagem adequada para quantificar células viáveis e viáveis, mas não cultiváveis em inoculantes e plantas. O PMA-qPCR permitiu obter resultados confiáveis mais rapidamente do que os métodos dependentes de cultura. Em relação a comparação do genoma, usando uma filogenia robusta do genoma central, foi constatado que todas as espécies descritas do gênero *Herbaspirillum* estão bem delineadas, sendo a única exceção os clados das espécies *H. aquaticum* e *H. huttiense*. Também foi constatado que os genes *nif* são altamente prevalentes apenas em *H. rubrisubalbicans*; no entanto, independente da espécie, todos os genes *nif* compartilham o mesmo arranjo gênico com alta identidade proteica e estão presentes em apenas dois tipos principais, em fitas invertidas. Por meio de uma árvore filogenética NifHDKENB, foi observado que as sequências *nif* de *Herbaspirillum* podem ter sido adquiridas do último ancestral comum pertencente à ordem Nitrosomonadales.

Palavras-chave: *Herbaspirillum seropedicae*; PCR quantitativa; PMA-qPCR; Filogenômica; Nitrogenase; Diazotrofia; NifHDKENB

## ABSTRACT

Bacteria of the genus *Herbaspirillum* were isolated from different types of environments and geographic locations, and the genus presents high diversity. *Herbaspirillum seropedicae* is the most studied species of the genus, mainly due to its potential to be used as an inoculant. Reliable, high-throughput, and cost-effective methods are needed to determine bacterial viability in inoculant formulations or on plants. The general objective of this work was to develop an assay to evaluate the cellular viability of *Herbaspirillum seropedicae* in maize roots using the PMA-qPCR methodology and to compare the genomes of the genus *Herbaspirillum* to establish the genetic diversity of the genus. *H. seropedicae* was cultivated in culture medium and subjected to heat treatment at 48 °C for different periods of time. Maize roots were inoculated, grown in vitro and collected seven days after inoculation. Viable bacterial cells were quantified using qPCR, PMA-qPCR assays and plate counting. Standard curves were prepared and the efficiency obtained ranged from 85 to 99%. The limit of detection (LOD) was  $10^1$  genome copies, corresponding to 60.3 pg of DNA. The enumeration obtained in pure cultures by qPCR, PMA-qPCR and plate counts were  $8.85 \pm 0.16$ ,  $6.51 \pm 0.12$  and  $2.25 \pm 0.30$  log CFU.mL<sup>-1</sup> after heat treatment, respectively. These results showed that PMA-qPCR is an adequate approach to quantify viable and viable but non-culturable cells in inoculants and plants. PMA-qPCR allowed the achievement of reliable results much faster than culture-dependent methods. Concerning genome comparison, using a robust phylogeny of the central genome, it was found that all described species of the genus *Herbaspirillum* are well delineated, with the only exception being the clades of the species *H. aquaticum* and *H. huttiense*. It was also found that *nif* genes are highly prevalent only in *H. rubrisubalbicans*; however, regardless of species, all *nif* genes share the same gene arrangement with high protein identity and are present in only two main types, in inverted strands. Through a phylogenetic tree NifHDKENB, it was observed that the *nif* sequences of *Herbaspirillum* may have been acquired from the same last common ancestor belonging to the order Nitrosomonadales.

Key-words: *Herbaspirillum seropedicae*; Quantitative PCR; PMA-qPCR; Phylogenomics · Plant microbiology, Nitrogenase · Diazotroph · NifHDKENB



## Lista de Figuras

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Tamanho e distribuição do mercado global de bioinoculantes em milhões de dólares e taxa de crescimento. Adaptado de: Global Biofertilizers Market, (2021) e Basu *et al.* (2020). ..... 20

Figura 2 - Interação entre raízes de plantas e bactérias promotoras de crescimento vegetal, conforme o nicho de colonização: endofítica, simbiótica ou associativa. Fonte: Adaptado de Souza *et al.* (2015). ..... 21

Figura 3 - Colonização de plantas por *Herbaspirillum seropedicae*. Fonte: Adaptado de Monteiro *et al.* (2012a). ..... 26

Figura 4 - Procedimentos e mecanismos para o diagnóstico de PMA-qPCR. Fonte: Adaptado de Gao *et al.* (2020). ..... 42

### CAPÍTULO I

Figura 1 - Mapa de calor de porcentagem de proteínas conservadas de 62 genomas de *Herbaspirillum*. ..... 52

Figura 2 - Dendrograma baseado na distância da identidade média de nucleotídeos (ANI) de 58 genomas de *Herbaspirillum*. ..... 53

Figura 3 - Estimativa do tamanho do pangenoma do gênero *Herbaspirillum*. .. 54

Figura 4 - A matriz de presença/ausência do pangenoma *Herbaspirillum* mapeou na árvore filogenética de máxima verossimilhança do genoma central. .... 55

Figura 5 - A distribuição do cluster no gênero *Herbaspirillum*. ..... 57

Figura 6 - Os dois arranjos gênicos do cluster *nif* em genomas de *Herbaspirillum*. ..... 58

Figura 7 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança não enraizada de sequências de proteínas concatenadas NifHDKENB de 205 estirpes da classe Betaproteobacteria. .... 59

## CAPÍTULO II

Figura 1 - Representação diluição seriada e plaqueamento por drop plate da cultura bacteriana nos ensaios de temperatura para *H. seropedicae* SmR1. Fonte: Autora, 2022. .... 68

Figura 2 - Enumeração da bactéria *H. seropedicae* SmR1 (log UFC.mL<sup>-1</sup>) obtida por contagem em placa de amostras submetidas a tratamento térmico por diferentes períodos de tempo. .... 73

Figura 3 - Log número de cópias de DNA de *H. seropedicae* estirpe SmR1 estimado por qPCR (quadrado) e PMA-qPCR (triângulos) em quatro corridas independentes. .... 75

Figura 4 - Comparação da contagem de *H. seropedicae* SmR1 (log UFC.g<sup>-1</sup>) obtida por qPCR e PMA-qPCR de amostras de raízes de milho coletadas aos 7 dias. .... 77

## Lista de Tabelas

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Principais aplicações de corantes de viabilidade para quantificação de células viáveis em plantas.....	44
---	----

### CAPÍTULO II

Tabela 1 - Parâmetros da qPCR de curvas padrão para quantificação de <i>H. seropedicae</i> SmR1. O DNA foi extraído de <i>H. seropedicae</i> cultivado em meio de cultura.....	74
--	----

Tabela 2 - Repetibilidade do ensaio qPCR HERBAS1 usando diluições em série de DNA extraído de <i>H. seropedicae</i> . .....	74
---	----

Tabela 3 - Comparação da contagem de <i>H. seropedicae</i> SmR1 (log CFU.mL <sup>-1</sup> ) obtida por qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa de amostras de cultura tratadas termicamente (48 °C). .....	75
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANI: Identidade média de nucleotídeos (do inglês *Average Nucleotide Identity*)

ANPIL: Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

BPCV: Bactérias promotoras de crescimento vegetal

*Cluster*: agrupamento de genes

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

DDH: Hibridização DNA-DNA (do inglês *DNA-DNA hybridization*)

*Draft Genome*: genoma “rascunho” versão incompleta da sequência de um genoma

FBN: Fixação Biológica de Nitrogênio

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

POCP: Porcentagem de proteínas conservadas (do inglês *Percentage of Conserved Proteins*)

qPCR: PCR quantitativa

*Query*: sequência submetida a um banco de dados para comparação

SSH: Hibridização subtrativa por supressão (do inglês *Suppression Subtractive Hybridization*)

UFC: Unidades formadoras de colônia

USDA: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (do inglês *U.S. Department Of Agriculture*)

PMA: propídio monoazida associado a PCR quantitativa

PMA-qPCR: corante intercalante de DNA propídio monoazida associado a PCR quantitativa

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>7</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>8</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Introdução geral</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>17</b>
2.1. Uso de fertilizantes na agricultura.....	17
2.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).....	18
2.3. Gênero <i>Herbaspirillum</i> .....	22
2.3.1. Descrição do gênero.....	22
2.3.2. Estrutura filogenética do gênero <i>Herbaspirillum</i> .....	24
2.3.3. Espécie <i>H. seropedicae</i> .....	25
2.3.4. Espécie <i>H. rubrisubalbicans</i> .....	29
2.4. Genômica comparativa .....	30
2.4.1. Genômica comparativa no gênero <i>Herbaspirillum</i> .....	32
2.5. O uso de inoculantes na cultura do milho .....	33
2.6. Viabilidade das bactérias presentes nos inoculantes .....	35
2.7. Métodos de enumeração de populações microbianas.....	37
2.7.1. Enumeração de microrganismos por PCR quantitativa (qPCR) .....	38
2.7.2. Enumeração de células viáveis de microrganismo por qPCR combinada com corantes de viabilidade .....	41
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>45</b>
3.1. Objetivo geral.....	45
3.2. Objetivos específicos .....	45
<b>4. A genômica comparativa revela alta conservação e distribuição escassa de genes <i>nif</i> de fixação de nitrogênio no gênero <i>Herbaspirillum</i> associado a plantas</b> .....	<b>46</b>
4.1. Resumo.....	46
4.1. Introdução.....	47
4.2. Material e Métodos .....	48

4.3.	Resultados.....	51
4.4.	Discussão .....	59
<b>5.</b>	<b>Enumeração de células viáveis de <i>Herbaspirillum seropedicae</i> utilizando propidio monoazida associado a PCR quantitativa.....</b>	<b>64</b>
5.1.	Resumo .....	64
5.2.	Introdução.....	65
5.3.	Material e Métodos .....	67
5.4.	Resultados.....	72
5.5.	Discussão .....	77
<b>6.</b>	<b>Considerações Finais.....</b>	<b>81</b>
<b>7.</b>	<b>Referências .....</b>	<b>83</b>
<b>8.</b>	<b>Apêndices.....</b>	<b>99</b>

## 1. Introdução geral

Plantas e microrganismos interagem naturalmente no solo formando uma estreita e complexa rede de comunicação. Essas interações podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao crescimento das plantas (DO AMARAL *et al.*, 2016; OLDROYD, 2013). Quando se trata de interações benéficas, as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) estão ganhando crescente destaque (DO AMARAL *et al.*, 2014).

As BPCV são capazes de promover benefícios através da: fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN), solubilização de fosfatos, produção e modulação dos níveis de fitohormônios, produção de sideróforos, produção de antibióticos e enzimas líticas, competição com microrganismos fitopatogênicos e indução do sistema de defesa contra doenças e estresses abióticos (GLICK, 2012; SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

A utilização de BPCV como inoculantes é empregada na produção agrícola tanto de leguminosas quanto de gramíneas. Uma das associações entre planta-BPCV mais conhecida e explorada é a que ocorre entre o gênero *Bradyrhizobium* e plantas da família Fabaceae, principalmente a soja (*Glycine max*). Além da associação com leguminosas, existem gêneros de BPCV, como o *Herbaspirillum*, que são capazes de fazer associação com gramíneas, dentre as quais, destaca-se o milho (*Zea mays*), uma das principais culturas utilizadas na produção de alimentos (OLIVARES *et al.*, 2017).

Nos últimos anos as técnicas de sequenciamento genômico se tornaram mais acessíveis. Os genomas de diferentes espécies de BPCV foram sequenciados, ofertando um grande volume de dados que possibilitou o desenvolvimento de muitos estudos (PEDROSA *et al.*, 2011; SIQUEIRA *et al.*, 2014; STRAUB *et al.*, 2013a; WEILHARTER *et al.*, 2011; WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2012), dentre os quais, destacam-se as análises de genômica comparativa. Fazer a comparação de genomas de espécies de um mesmo gênero ajuda a: compreender os mecanismos de interação com a planta; encontrar o potencial biotecnológico de cada estirpe; compreender a evolução do grupo; e a aprimorar a classificação taxonômica dentro do gênero baseado na sequência

genômica e no seu conteúdo gênico (PALMER *et al.*, 2018; STRAUB *et al.*, 2013a).

Um dos pré-requisitos para que ocorra uma fitoestimulação efetiva exercida pelas BPCV é a sobrevivência da bactéria presente no inoculante em número suficiente para estabelecer uma colonização satisfatória. A viabilidade das bactérias presentes nos inoculantes pode ser afetada antes, durante e após sua aplicação em resposta aos fatores bióticos e abióticos, sendo assim dependente das condições ambientais (BERNINGER *et al.*, 2018).

Entre diversas metodologias existentes para monitoramento de populações bacterianas, destaca-se a utilização de ferramentas moleculares que se baseiam na amplificação de DNA. Estas são técnicas analíticas rápidas e acuradas que permitem a identificação, monitoramento efetivo e enumeração de células em plantas colonizadas (COUILLEROT *et al.*, 2010). A PCR quantitativa (qPCR) tem sido uma das técnicas mais utilizadas para quantificação de populações de rizosferas, pois proporciona alta especificidade, sensibilidade e velocidade (SØRENSEN *et al.*, 2009). Entretanto, a qPCR pode superestimar o número de células viáveis ou apresentar resultados falso-positivos, visto que esta não é capaz de diferenciar células viáveis e não viáveis (NOCKER; CAMPER, 2006).

Uma alternativa promissora para resolver este problema é o pré-tratamento das células com corantes intercalantes de DNA, como monoazida de propídio (PMA) e monoazida de etídio (EMA). Estes corantes são capazes de intercalar-se na fita dupla de DNA de células com membranas celulares injuriadas, tornando o DNA insolúvel e impossibilitando a amplificação do fragmento durante a qPCR (NOCKER; CAMPER, 2006; NOGVA *et al.*, 2003). Dessa forma, essa técnica pode ser uma ferramenta importante no monitoramento da viabilidade de inoculantes utilizados em plantas.

Diante do exposto os objetivos deste trabalho são avaliar a viabilidade celular de *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 em cultura pura e em raízes de milho utilizando a metodologia PMA-qPCR, e explorar a diversidade e conservação de genes *nif* no gênero *Herbaspirillum* por meio de comparações genômicas, pangenoma, genes centrais e genes *nif*.

Na perspectiva de Recursos Genéticos Vegetais, os trabalhos descritos nesta tese estão diretamente relacionados ao estudo da interação dos recursos



genéticos vegetais com outros organismos por meio de tecnologias que visam a conservação e o uso sustentável da biodiversidade. A utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal na produção de alimentos é uma alternativa sustentável para mitigar o uso de fertilizantes químicos, aumentando assim a eficiência no uso dos nutrientes, e reduzindo os custos ambientais e financeiros da produção agrícola. Isso porque esses microrganismos são encontrados naturalmente no ambiente e/ou associados com plantas, o que feito é explorar o potencial que os mesmos têm de gerar benefícios às plantas.

O presente trabalho de tese está dividido da seguinte forma: referencial teórico; capítulo I; e capítulo II. No capítulo I foi desenvolvido um trabalho *in silico* de genômica comparativa e filogenia de genes *nif* do gênero *Herbaspirillum* em parceria com o bioinformata Dr Filipe Pereira Matteoli. Esse estudo começou a ser desenvolvido durante o período de isolamento devido a pandemia causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 e recentemente foi publicado na revista *Microbial Ecology*. No capítulo II foi desenvolvido um estudo para quantificar a células viáveis de *H. seropedicae* SmR1 utilizando o corante intercalante de DNA propídio monoazida (PMA) associado a tecnologia de PCR em tempo real (qPCR).

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Uso de fertilizantes na agricultura

O crescimento contínuo da população e conseqüentemente do consumo está impondo uma grande demanda aos recursos naturais e à agricultura. Um dos grandes desafios do setor agrícola é aumentar a produção de alimentos causando o menor impacto possível ao solo, água e biodiversidade (MENQUER; SPEROTTO; RICACHENEVSKY, 2017; RAMAKRISHNA; YADAV; LI, 2019). No atual sistema de produção agrícola uma das principais formas de promover o aumento do rendimento das culturas é o uso de insumos e defensivos químicos, como os fertilizantes, principalmente à base de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) (MAHANTY; BHATTACHARJEE; GOSWAMI, 2016; SOUMARE *et al.*, 2020).

Entre os fertilizantes aplicados, destacam-se os fertilizantes nitrogenados. O nitrogênio (N) é um elemento essencial para as plantas, sendo requerido em grandes quantidades e, por esse motivo, considerado o nutriente mais limitante para o rendimento das culturas. Isso porque, o N é fundamental na síntese de moléculas primordiais (enzimas, proteínas, clorofila, DNA e RNA) nos processos biológicos (OLEŃSKA *et al.*, 2020; SOUZA *et al.*, 2019).

Segundo dados da Associação Internacional de Fertilizantes (IFA), estima-se que até 2021 foram utilizados mundialmente aproximadamente 189 milhões de toneladas de fertilizantes (IFA, 2020). No Brasil, os últimos levantamentos disponíveis na base de dados da *World Development Indicator*, mostram que em 2018 foram aplicados em média 304 kg de fertilizantes por hectare de terra arável (WDI, 2021). Entretanto, a aplicação de fertilizantes químicos não é uma prática de manejo barata. Nas lavouras brasileiras a aplicação de fertilizantes pode representar até 30% dos custos finais de produção. Isso porque a maior parte dos fertilizantes utilizados no país é importada, cotada em dólar e chegam aos agricultores com um preço elevado (OLIVARES *et al.*, 2017).

A maior parte do território brasileiro é coberta por solos com características físicas e químicas que requerem uma grande quantidade de fertilizantes (CAMARGO *et al.*, 1988). Entretanto, nessas condições de solo,

esses insumos têm baixa eficiência e grande parte dos fertilizantes aplicados não são absorvidos pelas plantas e acabam sendo perdidos (MAHANTY; BHATTACHARJEE; GOSWAMI, 2016; OLIVARES *et al.*, 2017). Além do prejuízo econômico, o excesso de fertilizante não absorvido pode acarretar problemas ambientais, como a contaminação de águas subterrâneas e superficiais, a eutrofização de ecossistemas aquáticos além de contribuir com a emissão de gases de efeito estufa (GUPTA *et al.*, 2015; SAVCI, 2012).

Diversas pesquisas estão sendo realizadas visando o desenvolvimento de formas alternativas para produzir alimentos de maneira sustentável causando menos impactos ao ambiente (THONAR *et al.*, 2017). A utilização de abordagens biológicas como a aplicação de inoculantes formulados a partir de bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) é uma alternativa sustentável para mitigar o uso de fertilizantes químicos, aumentando a eficiência no uso dos nutrientes, e reduzindo os custos ambientais e financeiros da produção agrícola (BASU *et al.*, 2021; SOUMARE *et al.*, 2020).

No Brasil a utilização de BPCV do gênero *Bradyrhizobium* na cultura da soja é um exemplo do impacto positivo que o uso de insumos biológicos pode ter na economia e nos serviços ambientais. Com o desenvolvimento dessa tecnologia foi possível abolir, quase que completamente, a necessidade de aplicação de fertilizantes nitrogenados na cultura da soja (ADESEMOYE; TORBERT; KLOEPPER, 2009). Além da associação com leguminosas, existem gêneros de BPCV capazes de associação com plantas não leguminosas como arroz, trigo, milho e cana-de-açúcar, as principais culturas utilizadas na produção de alimentos e bioenergia (OLIVARES *et al.*, 2017).

## **2.2. Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV)**

As plantas interagem naturalmente com uma gama diversificada de microrganismos presentes no solo. Essas interações podem ser benéficas, neutras ou prejudiciais ao crescimento das plantas (DO AMARAL *et al.*, 2016; OLDROYD, 2013). Quando se trata de interações benéficas, as BPCV ganham crescente destaque pela capacidade que esse grupo de microrganismos possui de contribuir para o aumento do crescimento das plantas. A inoculação com

BPCV é empregada na produção agrícola tanto de leguminosas quanto de gramíneas com o objetivo de aumentar o crescimento, elevar a produção e a tolerância a estresses (DO AMARAL, *et al.*, 2014).

As BPCV fazem parte de um grupo heterogêneo e benéfico de microrganismos, podendo ser encontradas na rizosfera (região do solo que circunda aproximadamente dois milímetros as raízes, onde os processos mediados por microrganismos são especificamente influenciados pelo sistema radicular), na superfície das raízes, ou ainda associadas a estas (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

O potencial do uso das BPCV no aumento da produtividade faz com que o mercado global de bioinoculantes cresça a uma taxa estimada de aproximadamente 10% ao ano (OWEN *et al.*, 2015). O setor de bioinoculantes (BPCV, fungos micorrízicos e outros microrganismos) é significativo em todos os continentes e segundo a *Global Biofertilizers Market* em 2018 foi avaliado em 1,57 bilhões de dólares.

A América do Norte é responsável por 27,7% do total de bioinoculantes produzido. A Europa, mais especificamente a Alemanha, Reino Unido, Itália e França ocupam o segundo lugar em termos de produção. A terceira maior região produtora de bioinoculantes é a Ásia-Pacífico. A América do Sul é a quarta no *rankig* de produção de bioinoculantes, sendo o Brasil responsável por metade desse mercado. Na África a produção de inoculantes ainda é pequena. A África do Sul, Egito e países da África Oriental (Uganda, Quênia, Tanzânia e Sudão) são os que mais produzem esse insumo no continente africano (Figura 1) (GLOBAL BIOFERTILIZERS MARKET, 2021).

Em termos de consumo, a Europa e a América Latina são atualmente os maiores consumidores de bioinoculantes, seguidos da China e da Índia. Os bioinoculantes fixadores de nitrogênio representam 79% do mercado global, seguido pelos solubilizantes de fosfato com 14%. Os outros tipos de bioinoculantes detêm os 7% restantes (GLOBAL BIOFERTILIZERS MARKET, 2021). No Brasil, dados da Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII) mostram que em 2018 foram comercializadas 73 milhões de doses de inoculantes.

## MERCADO GLOBAL DE BIOINOCULANTES

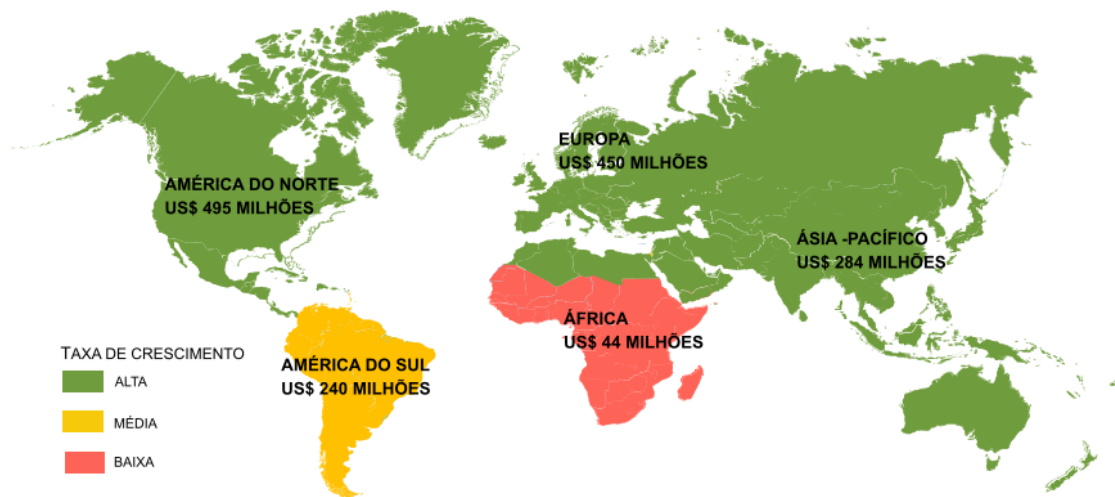


Figura 1 - Tamanho e distribuição do mercado global de bioinoculantes em milhões de dólares e taxa de crescimento. Adaptado de: Global Biofertilizers Market, (2021) e Basu et al. (2020).

As BPCV são capazes de promover benefícios diretos, através da: absorção de nutrientes pela fixação biológica de nitrogênio atmosférico (FBN) e solubilização de fosfatos; produção e modulação dos níveis dos fitohormônios auxina, giberelina, citocinina e etileno e produção de sideróforos. Já indiretamente, as BPCV podem beneficiar as plantas através da: produção de antibióticos e enzimas líticas; competição com microrganismos fitopatogênicos; indução do sistema de defesa contra doenças e estresses abióticos (GLICK, 2012; SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

Embora as BPCV sejam capazes de proporcionar muitos benefícios para as plantas, o número de espécies de bactérias utilizadas para formulação de bioinoculantes ainda é relativamente baixo considerando a biodiversidade natural existente. Até o momento cerca de 30 gêneros já foram utilizados, incluindo: *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (OLIVARES et al., 2017).

A forma de colonização das plantas pelas BPCV pode variar, conforme o microrganismo e a planta envolvidos na associação. Então, considerando o nicho de colonização, as interações entre o microrganismo e o vegetal podem ocorrer através de processos simbióticos, endofíticos ou associativos com

distintos níveis de proximidade com as raízes e o solo no entorno destas (Figura 2) (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

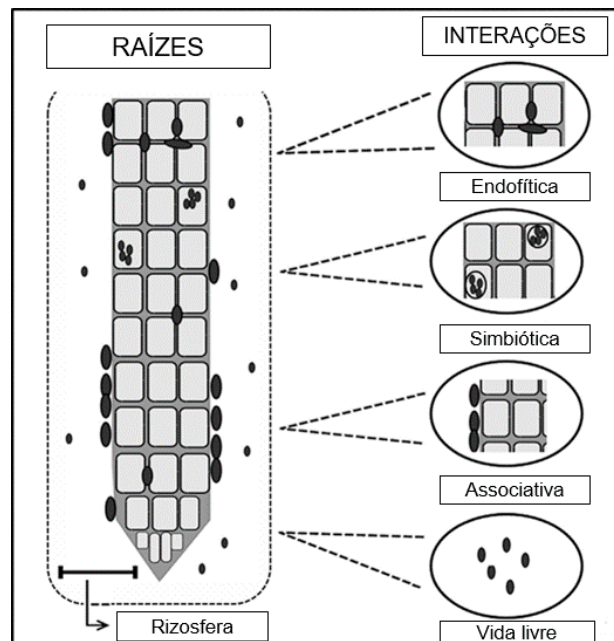


Figura 2 - Interação entre raízes de plantas e bactérias promotoras de crescimento vegetal, conforme o nicho de colonização: endofítica, simbiótica ou associativa. Fonte: Adaptado de Souza et al. (2015).

O tipo de interação mais bem estudado até o momento é a relação simbiótica que ocorre entre bactérias diazotróficas (microrganismos com capacidade de fixar nitrogênio atmosférico) dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, com plantas da família Leguminosae. Nesse tipo de interação, as bactérias são endossimbiontes e durante a associação há a formação nas raízes de estruturas diferenciadas chamadas de nódulos. A principal função do nódulo é proporcionar um ambiente adequado para que a FBN ocorra (OLDROYD, 2013).

As BPCV são classificadas como associativas quando colonizam as superfícies externas das raízes (rizoplano), mais especificamente pelos radiculares, zonas de alongação e regiões de fissuras formadas durante a formação das raízes laterais. *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter* sp., e algumas estirpes de *A. brasilense* são exemplos de BPCV associativas (CARVALHO et al., 2014, 2016).

As bactérias endofíticas exploram os tecidos internos das raízes, como cilindro vascular e xilema. Em alguns casos as BPCV endofíticas podem ser translocadas para outras partes da planta através do xilema (REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011). Esse grupo de BPVC coloniza mais especificamente os espaços intercelulares e o apoplasto. A principal diferença entre a relação endofítica e a endossimbiótica é que os microrganismos endossimbiontes colonizam os espaços intracelulares de células vivas e desencadeiam a formação de nódulos. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* spp., *Herbaspirillum* spp., e algumas estirpes de *Azospirillum brasilense* são exemplos de BPCV endofíticas (CARVALHO *et al.*, 2014; REINHOLD-HUREK; HUREK, 2011).

### **2.3. Gênero *Herbaspirillum***

#### **2.3.1. Descrição do gênero**

O gênero *Herbaspirillum* faz parte da classe das Beta-proteobactérias, ordem Burkholderiales, família Oxalobacteraceae (SCHOCH *et al.*, 2020). As espécies que compõem esse gênero são cosmopolitas, possuem diferentes capacidades metabólicas e podem ou não estarem associadas a plantas (MONTEIRO *et al.*, 2014). As bactérias do gênero *Herbaspirillum* são Gram negativas, aeróbicas, geralmente com formato vibrióide, com motilidade por meio de 1 a 5 flagelos. A faixa de temperatura de crescimento é entre 20 e 37°C, algumas espécies toleram até 40°C. O pH para o crescimento é de 5 a 8 (BALDANI *et al.*, 2014).

As primeiras espécies descritas do gênero *Herbaspirillum* foram isoladas de plantas. A espécie de referência do gênero é a *H. seropedicae* que foi isolada de raízes de gramíneas. Essa bactéria é promotora de crescimento vegetal, endofítica e diazotrófica (BALDANI *et al.*, 1986). A segunda espécie do gênero a ser descrita foi a *H. rubrisubalbicans*, que também tem capacidade de promover o crescimento de plantas e fixar nitrogênio, mas em algumas variedades suscetíveis de cana-de-açúcar e sorgo pode causar as doenças da estria mosqueada e da estria vermelha, respectivamente (BALDANI *et al.*, 1996). A terceira espécie descrita do gênero foi a *H. frisingense* uma bactéria

diazotrófica isolada de folhas e raízes de plantas forrageiras (KIRCHHOF *et al.*, 2001). A capacidade de fixar nitrogênio dessas três espécies despertou o interesse de usá-las como biofertilizantes na produção agrícola (BALDANI; BALDANI, 2005; REIS *et al.*, 2008)

No decorrer dos anos novas espécies do gênero *Herbaspirillum* isoladas de plantas e outras fontes ambientais foram descritas. A espécie *H. lusitanum* foi isolada de nódulos de raízes de feijão (VALVERDE *et al.*, 2003). *H. autotrophicum* tem a capacidade de fixar carbono e foi encontrada em um lago eutrófico (DING; YOKOTA, 2004). A espécie *H. huttiense* foi isolada de amostras de água subterrânea e água destilada (DING; YOKOTA, 2004). *H. chlorophenolicum* tem a habilidade de degradar 4-clorofenol e foi obtida de sedimentos oriundos de uma região industrial (IM *et al.*, 2004). A espécie *H. hiltneri* tem a capacidade de se associar com plantas e foi isolada de raízes de trigo (*Triticum aestivum* var. Naxos) (ROTHBALLER *et al.*, 2006). *H. rhizosphaera* foi encontrada na rizosfera de uma espécie de cebola selvagem (*Allium victorialis*) (JUNG *et al.*, 2007). A espécie *H. aquaticum* foi isolada de amostras de água deionizada (DOBRITSA; REDDY; SAMADPOUR, 2010). *H. robiniae* foi obtida a partir de nódulos radiculares da planta *Robinia pseudoacacia* que estava crescendo em uma mina de chumbo e zinco (FAN *et al.*, 2018).

Algumas espécies de *Herbaspirillum* identificadas em associação com plantas ou isoladas de amostras de solo e água também podem ser patógenos humanos. Bactérias do gênero já foram isoladas de amostras de feridas, urina, fezes, e infecções pulmonares, oculares e faríngeas (FAORO *et al.*, 2019). Um estudo feito por Spilker *et al.* (2008) identificou em amostras de escarro de pacientes com fibrose cística 28 isolados do gênero *Herbaspirillum*. Utilizando análise de sequência do gene 16S rRNA os isolados foram classificados como *H. seropedicae*, *H. huttiense*, *H. frisingense* e os que não puderam ser classificados foram denominados linhagens 1, 2 e 3.



### 2.3.2. Estrutura filogenética do gênero *Herbaspirillum*

Atualmente o gênero *Herbaspirillum* é composto por 11 espécies descritas (FAORO *et al.*, 2019). Análises filogenéticas baseadas nas sequências do gene 16S rRNA mostrou que o gênero *Herbaspirillum* não é formado por um grupo monofilético, sendo possível identificar cinco grupos. Os dois grupos compostos por espécies que até o momento presente, se mantêm no gênero *Herbaspirillum* são uma combinação de espécies com capacidade de se associar com plantas e espécies livres no ambiente. As espécies: *H. hiltneri*, *H. lusitanum*, *H. rhizosphaerae* e *H. autotrophicum* formam um grupo. E as outras sete espécies: *H. huttiense*, *H. aquaticum*, *H. chlorophenolicum*, *H. frisingense*, *H. seropedicae*, *H. rubrisubalbicans* e *H. robiniae* formam outro grupo (CARRO *et al.*, 2012; FAN *et al.*, 2018).

O fato do gênero *Herbaspirillum* ser parafilético foi um dos motivos que justificou a criação de novos gêneros dentro do complexo (ANANDHAM *et al.*, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2014). As bactérias *Herbaspirillum canariense*, *Herbaspirillum aurantiacum*, *Herbaspirillum soli* e *Herbaspirillum psychrotolerans*, inicialmente descritas como pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* formam um grupo separado das demais espécies. Dessa forma, foram reclassificadas e transferidas para o novo gênero *Noviherbaspirillum* que também contém a espécie *Noviherbaspirillum massiliense* e a espécie de referência *Noviherbaspirillum malthae*, que formam um quarto grupo filogenético (LIN *et al.*, 2013). O quinto grupo é formado pela espécie *Paraherbaspirillum soil* (ANANDHAM *et al.*, 2013).

Baseado na análise de sequências do gene 16S rRNA as 11 espécies do gênero *Herbaspirillum* possuem um alto grau de similaridade entre si (97,0 – 99,9%) (BALDANI *et al.*, 2014; FAN *et al.*, 2018). Considerando apenas as semelhanças do gene 16S rRNA no gênero *Herbaspirillum*, novas espécies não podem ser descritas. Por exemplo, as espécies *H. lusitanum* e *H. hiltneri* tem uma similaridade de sequência do gene 16S rRNA de 98,9 a 99% com esse grau de semelhança não é possível concluir que se tratam de duas espécies distintas. Entretanto, quando comparadas por hibridização DNA-DNA (HDD), a similaridade entre elas é de 14 a 32% (ROTHBALLER *et al.*, 2006).

Já o alto grau de similaridade de sequência dos genes 16S e 23S rRNA (99,9% e 99,7%, respectivamente), e da comparação por HDD (96%) entre as estirpes de referência das espécies *H. putei* e *H. huttiense* evidenciou que ambas as estirpes são representantes de espécies diferentes. O genoma da estirpe de referência de *H. huttiense* é 0,9 Mb menor que o genoma da estirpe de referência de *H. putei*, essa diferença reduziu o valor de HDD para 72%. Esse valor está muito próximo ao limite utilizado para delinear novas espécies bacterianas, então foi proposto a descrição de duas subespécies a *H. huttiense* subsp. *putei* e *H. huttiense* subsp. *huttiense* (DOBRITSA; REDDY; SAMADPOUR, 2010).

### **2.3.3. Espécie *H. seropedicae***

Entre as espécies do gênero *Herbaspirillum* capazes de estabelecer associação com plantas, a espécie *H. seropedicae* é uma das mais estudadas (MONTEIRO *et al.*, 2012a). Essa espécie foi isolada em 1984, a partir da rizosfera, de raízes lavadas e da superfície estéril de raízes de arroz, milho e sorgo. Inicialmente, *H. seropedicae* foi denominada como *Azospirillum seropedicae* devido a similaridades fisiológicas e morfológicas com o gênero *Azospirillum*, mas estudos posteriores demonstraram que em alguns aspectos a nova espécie se diferenciava, então em 1986 foi proposto um novo gênero e *A. seropedicae* foi renomeada para *Herbaspirillum seropedicae* (BALDANI *et al.*, 1986).

*H. seropedicae* é capaz de estabelecer associações principalmente com plantas da família Poaceae e já foi isolada de culturas de interesse econômico como: arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), cana-de-açúcar (híbridos interespecíficos de *Saccharum*), sorgo (*Sorghum bicolor*), e de espécies tropicais como a bananeira (*Musa spp.*) e abacaxizeiro (*Ananas comosus*) (MONTEIRO *et al.*, 2012a). A estirpe mais bem estudada de *H. seropedicae* é a SmR1, um mutante espontâneo da estirpe Z78 e resistente ao antibiótico estreptomicina (ATCC 35893) (BALDANI *et al.*, 1986; PEDROSA *et al.*, 2011).

O genoma da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* foi sequenciado e anotado pelo Programa Genoma do Estado do Paraná (GENOPAR) e está

disponível no GenBank com o número de acesso NC\_014323.1. O genoma da SmR1 é composto por um único cromossomo circular com 5.513.887 pares de base, 4.804 genes, 4.735 ORF's (*Open Read Frame* - fase de leitura aberta) que codificam 3.108 proteínas com funções atribuídas, 497 com predição de função geral e 1.130 ainda sem função conhecida (PEDROSA *et al.*, 2011).

*H. seropedicae* apresenta um comportamento endofítico de colonização, ou seja, tem a habilidade de penetrar nos tecidos internos de plantas sem causar prejuízos a sua hospedeira (JAMES *et al.*, 1997; OLIVARES *et al.*, 1996). O mecanismo de colonização de *H. seropedicae* em plantas de milho foi demonstrado por Monteiro *et al.* (2012a) (Figura 3).

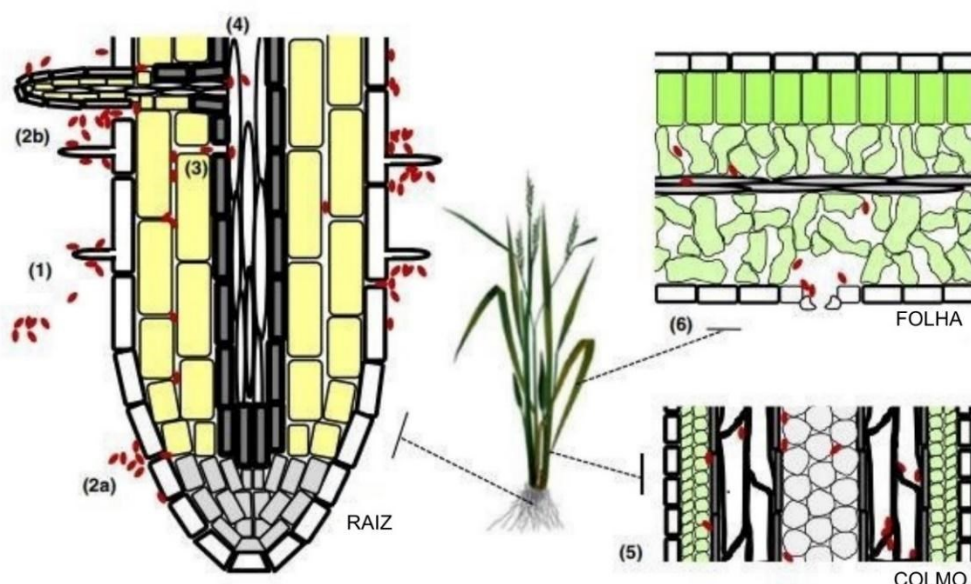


Figura 3 - Colonização de plantas por *Herbaspirillum seropedicae*. A associação de *Herbaspirillum seropedicae* (pontos vermelhos) com plantas hospedeiras em condições de laboratório inicia-se com quimiotaxia da bactéria até a raiz da planta e fixação na superfície das raízes preferencialmente na zona dos pelos radiculares (1). A maioria das bactérias permanece nas superfícies radiculares, mas algumas penetram através de discontinuidades da epiderme, como a zona de alongamento (2a) e rachaduras radiculares laterais (2b), e 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 através do xilema (4), eventualmente colonizando o colmo (5) e folhas (6), onde podem espalhar-se em espaços intercelulares e cavidades subestomais. Fonte: Adaptado de Monteiro *et al.* (2012a).

A associação entre a bactéria e a planta inicia-se quando o microrganismo é atraído até as raízes por meio da liberação de exsudatos pelas plantas, os quais irão servir, principalmente, como fonte de carbono para a bactéria. Esse processo já pode ser observado 30 minutos após a

inoculação. Em seguida ocorre a adesão da bactéria à superfície das raízes, preferencialmente nos pontos de emergência das raízes laterais. A penetração ocorre através dos pontos de descontinuidade e/ou fissuras da epiderme radicular. Após a penetração superficial nos tecidos da planta, a bactéria é capaz de se espalhar rapidamente pelos tecidos internos ocupando espaços intercelulares das células da raiz movendo-se para parte aérea através do xilema (JAMES; OLIVARES, 1997; MONTEIRO et al., 2012a).

Após estabelecida a associação entre a bactéria e a planta hospedeira o *H. seropedicae* pode promover o crescimento diferencial da planta através de alguns fatores como: a fixação biológica de nitrogênio, produção e secreção dos hormônios vegetais e produção de sideróforos (JAMES; OLIVARES, 1997; MONTEIRO et al., 2012a).

No sequenciamento do genoma do *H. seropedicae* SmR1 foram identificados genes de fixação de nitrogênio (*nif*), incluindo *nifA*, *nifB*, *nifZ*, *nifZ1*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifQ*, *nifW*, *nifV*, *nifU* e *nifS* em uma região de 37.547 pb., evidenciando a capacidade que essa espécie tem de realizar o processo de FBN (PEDROSA et al., 2011). A FBN proporcionada pela interação entre *H. seropedicae* com milho, trigo, arroz e sorgo foi acompanhada utilizando uma linhagem contendo uma fusão *nifH::gusA* e visualizada utilizando microscopia de fluorescência. Os resultados demonstraram que este mutante colonizou as superfícies das raízes e tecidos internos das quatro espécies de gramíneas testadas e expressou o gene *nifH*, o que indica a atividade de FBN (RONCATO-MACCARI et al., 2003). Ferrari et al. (2014) analisando o perfil proteico de raízes de milho inoculadas com *H. seropedicae* identificaram a proteína dinitrogenase redutase NifH. Essa proteína também foi identificada em raízes de arroz inoculadas com *H. seropedicae* (ALBERTON et al., 2013), confirmando que a bactéria expressou genes *nif* e tem capacidade de fixar nitrogênio durante a associação com gramíneas.

*H. seropedicae* também promove o crescimento das plantas através de produção e secreção de hormônios vegetais. O ácido indol-3-acético (AIA), é a principal auxina capaz de regular o ciclo da célula vegetal, assim como o tropismo, a dominância apical e a senescência, além disso é capaz de alterar a morfologia e proliferação de raízes e aumentar sua biomassa. O AIA também

afeta a fotossíntese, a biossíntese de metabólitos e outros hormônios vegetais como citocininas e giberelinas (MEHNAZ, 2015).

A síntese de AIA em bactérias depende da presença de precursores em exsudatos radiculares. Entre os vários exsudatos, o L-triptofano foi identificado como o principal precursor para a rota da biossíntese de AIA em bactérias. A caracterização de compostos intermediários levou à identificação de diferentes vias que usam o L-triptofano como precursor principal. As diferentes vias da síntese do AIA em bactérias apresentam um alto grau de similaridade com vias de biossíntese em plantas (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; REMANS, 2007). No genoma de *H. seropedicae* SmR1 existem quatro vias possíveis para a produção de AIA, a partir do triptofano (PEDROSA et al., 2011).

O etileno é um hormônio vegetal gasoso produzido endogenamente e participa da regulação de todos os processos de crescimento, desenvolvimento e senescência das plantas (SALEEM *et al.*, 2007). Esse hormônio também atua em situações de estresse abióticos e bióticos. Nessas condições, há um aumento significativo na sua produção o que afeta negativamente o crescimento das plantas (SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

Um dos mecanismos identificados com a capacidade de reduzir os níveis de etileno nas plantas depende da atividade da enzima bacteriana 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) deaminase. A ACC deaminase regula a produção de etileno pelas plantas através da metabolização de ACC (o precursor imediato da biossíntese de etileno em plantas superiores) em ácido alfa-cetobutírico e amônia. Uma quantidade significativa de ACC da planta pode ser excretada através das raízes. Posteriormente, esse composto pode ser absorvido pelos microrganismos do solo sendo hidrolisado pela enzima ACC deaminase, diminuindo assim a quantidade de ACC no ambiente. Isso acontece, pois, a ACC deaminase compete com a ACC oxidase (enzima que converte o ACC em etileno), modulando os níveis de etileno nas plantas, diminuindo a resposta ao estresse promovida por esse hormônio vegetal, permitindo assim o crescimento das plantas sob condições de estresse (GLICK, 2012).

Quando associadas às raízes das plantas, as bactérias com atividade de ACC deaminase podem ter melhor crescimento do que outros microrganismos livres, pois, usam o ACC como fonte de nitrogênio (MONTEIRO et al., 2012a;

SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015). Pedrosa *et al.* (2011) identificaram no genoma do *H. seropedicae* um gene que codifica a ACC deaminase.

Sideróforos são moléculas de baixo peso (entre 500 e 1500 Da) que possuem uma grande afinidade e seletividade para ligar e complexar o Fe (III). Essas moléculas são produzidas por microrganismos, como bactérias e fungos, assim como por algumas plantas, como uma estratégia para obter ferro do ambiente (FERREIRA; SOARES; SOARES, 2019; GLICK, 2012). A produção de sideróforos é outro mecanismo pelo qual as BPCV podem promover o crescimento de plantas. *H. seropedicae* tem pelo menos 27 genes envolvidos no transporte e metabolismo do ferro (PEDROSA *et al.*, 2011).

#### **2.3.4. Espécie *H. rubrisubalbicans***

*H. rubrisubalbicans* é uma espécie endofítica, fixadora de nitrogênio, de modo geral, capaz de se associar com plantas de forma benéfica. Entretanto, para algumas cultivares de cana-de-açúcar e sorgo suscetíveis, essa espécie pode ser considerada um patógeno (MONTEIRO, *et al.*, 2012a). Inicialmente, foi classificada como *Pseudomonas rubrisubalbicans*, mas após análises baseadas em homologia DNA:RNA e características fisiológicas a espécie passou a fazer parte do gênero *Herbaspirillum* (BALDANI *et al.*, 1996).

Estudos mostram que *H. rubrisubalbicans* forma associação benéfica com gramíneas como arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). A interação entre as plantas e *H. rubrisubalbicans* é bem semelhante a que ocorre com a espécie *H. seropedicae* e inicia quando a bactéria é atraída até a superfície das raízes. A colonização ocorre nos pontos de emergência de raízes secundárias ou por fissuras na epiderme. Após a invasão dos tecidos internos a bactéria se estabelece nos espaços intercelulares, vasos do xilema e células do parênquima (JAMES *et al.*, 1997; MONTEIRO *et al.*, 2012a).

*H. rubrisubalbicans* pode ser considerado um patógeno e em algumas cultivares suscetíveis de sorgo causa a doença da estria vermelha (HALE; WILKIE, 1972; TULESKI *et al.*, 2020). Nas cultivares B-4362 e Taiwang de cana de açúcar é o agente causal da doença da estria mosqueada (OLIVARES

*et al.*, 1997; TAN *et al.*, 2010). Na relação patogênica *H. rubrisubalbicans* coloniza os espaços intercelulares e vasos do xilema podendo ser translocada até as folhas. O principal dano dessas doenças em ambas as culturas é a redução da área fotossintética e a vida útil da folha, mas não levam a planta a morte e não chegam a atingir nível de dano econômico (SCHMIDT *et al.*, 2012).

O genoma da estirpe *H. rubrisubalbicans* M1 foi sequenciado e anotado no GenBank com o número de acesso NZ\_CP013737.1. O genoma é composto por um cromossomo circular com tamanho de 5.611.261 pares de base, 4.904 genes, dos quais 3.497 apresentam funções conhecidas. O conjunto e a ordem dos genes são semelhantes ao encontrado no genoma de *H. seropedicae* SmR1, entretanto quando comparados os genomas de *H. rubrisubalbicans* M1 e *H. seropedicae* SmR1, há uma inversão na parte central do cromossomo (CARDOSO, 2011; 2015)

O genoma de *H. rubrisubalbicans* M1 apresenta genes relacionados ao processo de interação com plantas como genes relacionados aos T1SS, T2SS, T3SS, T5SS, T6SS e os genes *nif*. Também foram identificados genes envolvidos na biossíntese de celulose e diversas regiões de repetição transposases e integrases (CARDOSO, 2011; MONTEIRO, *et al.*, 2012b).

#### **2.4. Genômica comparativa**

As técnicas de sequenciamento e comparação de genomas têm sido ferramentas eficientes nos estudos filogenéticos. Essas informações têm possibilitado explorar a diversidade e as diferentes características de bactérias que pertencem a um determinado grupo taxonômico (PALMER *et al.*, 2018).

As análises de genômica comparativa entre múltiplos genomas de espécies revelaram que existe uma vasta diversidade genômica intra-espécies. A disponibilidade dessas informações levantou o questionamento sobre quantos genomas deveriam ser sequenciados para qualquer espécie para representar com precisão todo o seu repertório de genes. Estudos começaram a ser feitos baseados na premissa de quantos novos genes são identificados toda vez que um novo genoma da espécie de interesse é sequenciado (TETTELIN *et al.*, 2008). O primeiro trabalho utilizando essa abordagem foi

desenvolvido Tettelin *et al.* (2005) com múltiplos genomas de *Streptococcus agalactiae*, seguido por Hogg *et al.* (2007) que estudou genomas de *Haemophilus influenzae*. O resultado dessas análises levou os autores ao conceito de pangenoma bacteriano.

O pangenoma é a soma do genoma central e do genoma dispensável. O genoma central ou core genoma é composto por genes compartilhados por todas as linhagens estudadas. De maneira geral, são genes que codificam funções relacionadas à biologia básica e fenótipos da espécie. O genoma dispensável é composto de genes presentes em algumas, mas não em todas as estirpes estudadas, e pelos genes específicos de cada estirpe. Esses genes contribuem para a diversidade das espécies. Possivelmente fornecem funções que não são essenciais para seu estilo de vida básico, mas conferem vantagens seletivas, como adaptação de nicho, resistência a antibióticos e a capacidade de colonizar novos hospedeiros. Desde que esse conceito foi proposto, o pangenoma de diferentes espécies bacterianas foi obtido (CAPUTO; FOURNIER; RAOULT, 2019). Embora inicialmente utilizado para espécies, o conceito de pangenoma também pode ser aplicado para fazer comparações a nível de gênero (INGLIN; MEILE; STEVENS, 2018; KUMAR, R.; BRÖMS; SJÖSTEDT, 2020; MACHADO; GRAM, 2017; PATIL *et al.*, 2016; WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2012).

A disponibilidade de dados oriundos do sequenciamento de genomas também possibilitou que novas metodologias fossem desenvolvidas para a classificação taxonômica de bactérias. Técnicas laboratoriais como a hibridização DNA-DNA (do inglês "*DNA-DNA hybridization*") e a identidade de sequência do gene 16S rRNA estão dando lugar para a utilização de análises *in silico*. Um método bastante utilizado é o de identidade média de nucleotídeos (ANI - do inglês *Average Nucleotide Identity*). ANI é calculado com base na identidade média de nucleotídeo entre todos os genes ortólogos de dois genomas que estão sendo comparados. Organismos são classificados na mesma espécie quando os valores de ANI forem  $\geq 95\%$  (JAIN *et al.*, 2018; KONSTANTINIDIS; RAMETTE; TIEDJE, 2006).

Enquanto ANI é utilizado para a delimitação de espécie procariótica, a abordagem de porcentagem de proteínas conservadas (POCP) foi proposta para delimitar gêneros. O valor de POCP é calculado utilizando todas as



proteínas dos genomas que estão sendo comparados. Dessa forma, se estes genomas compartilharem 50% ou mais de suas proteínas são classificados como pertencentes ao mesmo gênero procariótico (QIN *et al.*, 2014).

#### **2.4.1. Genômica comparativa no gênero *Herbaspirillum***

Devido a importância agrícola do gênero *Herbaspirillum* associado com o avanço das tecnologias de sequenciamento genômico, diferentes estirpes do gênero começaram a ter seus genomas sequenciados e publicados (BALDANI *et al.*, 2014) Informações disponíveis no banco de dados RefSeq (LI *et al.*, 2021) mostram que, das 11 espécies descritas do gênero, estirpes das espécies *H. frisingense*, *H. huttiense*, *H. robinae*, *H. rubrisubalbicans*, *H. hiltneri* e *H. seropedicae* possuem genomas sequenciados e completamente fechados. As demais espécies (*H. aquaticum*, *H. autotrophicum*, *H. chlorophenolicum*, *H. lusitanum* e *H. rhizosphaerae*) e outras estirpes ainda sem espécie definida tiveram seus genomas sequenciados e depositados na forma de *draft*.

Uma das primeiras comparações genômicas do gênero *Herbaspirillum* foi feita entre *H. seropedicae* SmR1 (genoma fechado) e o *H. rubrisubalbicans* M1 (genoma *draft*). De maneira geral, os dois genomas são estruturalmente similares, mas há uma inversão na região central do cromossomo. Durante a montagem do genoma de *H. rubrisubalbicans* M1, Monteiro *et al.* (2012b) fizeram uma comparação entre os dois genomas através da técnica de hibridização subtrativa por supressão (SSH, do inglês “*Suppression Subtractive Hybridization*”). A comparação mostrou a presença de um conjunto de genes relacionados à biossíntese de celulose, lipopolissacarídeos (LPS) e adesinas encontrados apenas no genoma de *H. rubrisubalbicans* M1.

No trabalho de Straub *et al.* (2013a), o genoma de *H. frisingense* GSF30 foi sequenciado e utilizado juntamente com outros nove genomas de *Herbaspirillum* e mais quatro genomas de bactérias endofíticas (*Gluconacetobacter diazotrophicus* PAI5, *Azoarcus* sp. BH72, *Klebsiella pneumoniae* 342 e *Azospirillum* sp. B510) em estudos de comparação genômica. Os autores estudaram as similaridades e divergências de genes relacionados a colonização de plantas. Os genomas de *H. seropedicae*, *H.*

*rubrisubalbicans*, *H. frisingense*, *H. huttiense* subsp. *putei* e *Herbaspirillum* sp. GW103 apresentaram aspectos similares entre si.

Recentemente, estirpes ambientais e clínicas de espécie *H. seropedicae* foram comparadas com o objetivo de entender como estas migraram de colonizadoras de plantas para hospedeiros humanos. Primeiramente, os autores sequenciaram os genomas das estirpes clínicas AU14040 e AU13965, e os compararam com os genomas de estirpes descritas como de origem ambiental. A comparação entre os genomas revelou que as estirpes clínicas perderam os conjuntos de genes relacionados à fixação biológica de nitrogênio (*nif*) e ao sistema de secreção tipo 3 (T3SS), descrito como essencial para interações com plantas (FAORO *et al.*, 2019).

Além disso, um pangenoma da espécie *H. seropedicae* foi gerado revelando que estirpes clínicas e ambientais possuem diferentes conjuntos de genes acessórios. As estirpes clínicas adquiriram novos genes e ilhas genômicas que podem estar relacionadas às interações com o hospedeiro. Os resultados obtidos com esse trabalho sugerem que a transição do estilo de vida ambiental para o oportunista levou à perda e aquisição de genes específicos, o que possibilitou adaptações para colonizar e sobreviver em novos hospedeiros. Sendo assim, é possível que essas substituições sejam o ponto de partida para interações com novos hospedeiros (FAORO *et al.*, 2019).

## **2.5. O uso de inoculantes na cultura do milho**

O milho (*Zea Mays*) é uma monocotiledônea, anual, alógama, pertencente à família Poaceae. O centro de origem desse cereal é a América Central e sua domesticação ocorreu aproximadamente oito mil anos atrás (MATSUOKA *et al.*, 2002). A alta variabilidade genética, devido ao seu sistema de polinização cruzada, confere ao milho um elevado nível de diversidade genotípica (PECHANOVA *et al.*, 2013).

O milho juntamente com o arroz e o trigo são os cereais mais importantes do mundo. Essa cultura possui uma grande contribuição para alimentação humana, animal e também na produção de biocombustíveis. Sua importância se dá devido a sua composição química e nutricional que

proporciona uma excelente fonte energética (LAWRENCE *et al.*, 2008). Devido a sua grande adaptabilidade, esse cereal pode ser cultivado em regiões com diferentes condições como em diversas altitudes, em climas tropicais, subtropicais e temperados (BARROS; CALADO, 2014).

A produção mundial de milho na safra 2021/2022 foi de 1,21 bilhões de toneladas, sendo o grão mais produzido. O Brasil ocupa o 3º lugar no ranking mundial de produção desse grão, atrás apenas dos Estados Unidos e China (USDA, 2022). Na safra 2021/2022 a produção nacional foi de 113,2 milhões de toneladas em 21,5 milhões de hectares, com uma produtividade média de 5.248 kg.ha<sup>-1</sup>. A região Centro-Oeste é responsável por mais da metade da produção nacional de milho tendo produzido 63,9 milhões de toneladas na última safra. A região Sul é a segunda maior produtora de milho. O Estado de Santa Catarina ocupa o terceiro lugar da região Sul com uma produção na safra 2021/2022 de 2,14 milhões de toneladas (CONAB, 2022).

A região Sul apresenta a maior demanda brasileira de milho devido a criação de aves e suínos e produção de leite. A mesorregião Oeste Catarinense, principal produtora de milho do estado de Santa Catarina, juntamente com o Sudoeste do Paraná e Noroeste do Rio Grande do Sul, forma a região que mais concentra agricultura familiar nas produções de milho do Sul do Brasil (WORDELL FILHO & CHIARADIA, 2016).

A cultura do milho é bastante exigente quanto à fertilidade do solo, especialmente quanto à disponibilidade de nitrogênio. A deficiência deste macronutriente pode reduzir o rendimento de grãos entre 10 e 22% (BREDA; ALVES; REIS, 2016). Nos últimos anos a utilização de BPCV diazotróficas tornou-se uma alternativa promissora ao uso de fertilizantes nitrogenados no cultivo deste cereal. No Brasil, já são utilizadas na formulação de inoculantes as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *A. brasilense* (HUNGRIA *et al.*, 2010).

Outra bactéria capaz de se associar com milho é *H. seropedicae*. Embora, ainda não tenha sido desenvolvido nenhum inoculante comercial para milho utilizando estirpes dessa espécie de BPCV, diversos trabalhos mostram sua capacidade de associação com plantas de milho e promoção de benefícios a cultura (ALVES *et al.*, 2021, 2015; BREDA; ALVES; REIS, 2016; DALL'ASTA *et al.*, 2019; HUNGRIA *et al.*, 2010; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003).

## 2.6. Viabilidade das bactérias presentes nos inoculantes

Um inoculante bacteriano é composto por uma ou mais estirpes, ou ainda por diferentes espécies de bactérias benéficas juntamente com um material de suporte (orgânico, inorgânico ou sintetizado a partir de moléculas definidas) de fácil utilização e baixo custo (BASHAN, 1998). A formulação industrial ideal é aquela que garante a viabilidade e a capacidade da BPCV presente no inoculante comercial de produzir os efeitos desejados nas plantas inoculadas (SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013).

No Brasil o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regula o padrão de qualidade dos inoculantes produzidos, importados ou comercializados no país. Os critérios utilizados são: a ausência de contaminantes na formulação dentro dos limites estabelecidos, a pureza do inoculante, relacionada à ausência de outros microrganismos que não os especificados e a concentração de células viáveis do inoculante (UFC.mL<sup>-1</sup> ou UFC.g<sup>-1</sup>). Segundo especificações presentes na Instrução Normativa SDA nº 13/2011 os inoculantes à base de bactérias fixadoras de nitrogênio para leguminosas (rizóbios) devem apresentar uma concentração mínima de  $1,0 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup> ou UFC.g<sup>-1</sup> com garantia até a data de vencimento. Já para os demais inoculantes, com bactérias associativas e promotores de crescimento de plantas no geral, incluindo gramíneas, a concentração mínima é a mesma informada no processo de registro do produto.

Um pré-requisito para que ocorra uma colonização satisfatória, e os efeitos benéficos na planta sejam observados, é a presença de um grande número de células viáveis no inoculante. Em condições não controladas a viabilidade dos inoculantes pode ser afetada em diferentes níveis: antes, durante e após sua aplicação (BERNINGER *et al.*, 2018). A condição de armazenamento é um dos fatores que pode influenciar na viabilidade. Dessa forma, é preciso que o produto tenha uma vida de prateleira suficientemente longa e apresente estabilidade durante o processo de produção, empacotamento, estocagem e transporte (ARORA; KHARE; MAHESHWARI, 2011).

Durante e após aplicação, o inoculante é exposto a diversos fatores bióticos e abióticos que podem ser prejudiciais à viabilidade. Dentre os fatores abióticos pode-se destacar a radiação UV, e diferentes propriedades do solo como textura, temperatura e pH. Os inoculantes aplicados diretamente nas sementes ainda podem ter sua viabilidade afetada pela toxicidade de produtos aplicados para proteção das sementes. Além disso, interações bióticas com a microflora e microfauna nativas do solo podem ser um desafio para o estabelecimento das estirpes presentes no fertilizante aplicado (BERNINGER *et al.*, 2018; ARORA; KHARE; MAHESHWARI, 2011). Com o objetivo de superar esses fatores limitantes e proporcionar condições adequadas para manter a viabilidade dos inoculantes, os pesquisadores e a indústria de inoculantes têm continuamente buscado desenvolver novas tecnologias de processamento, aplicação e formulação (BERNINGER *et al.*, 2018; O'CALLAGHAN, 2016).

O conceito de viabilidade celular foi definido em 2015 por microbiologistas levando em conta a avaliação fisiológica e metabólica das células. Dessa forma, para serem consideradas como células viáveis estas precisam ter suas membranas celulares intactas e metabolismo funcional, requisitos fundamentais para o funcionamento de uma célula saudável (CODONY; AGUSTÍ; ALLUÉ-GUARDIA, 2015).

Em alguns casos, quando submetidas a condições de estresse, as células podem passar para um estado de sobrevivência, no qual não são mais capazes de formar colônias ou manter sua reprodução, sendo chamadas de células viáveis, mas não cultiváveis (BERGKESSEL; BASTA; NEWMAN, 2016). Nesse estado, as células continuam com a membrana intacta, mas podem ter mudanças na morfologia e composição da membrana e da parede celular, bem como perder a capacidade de crescimento. Entretanto, ainda são capazes de manter em níveis reduzidos o metabolismo de respiração, expressão gênica e síntese de proteínas (PINTO; SANTOS; CHAMBEL, 2015). A condição de não-cultivabilidade é um processo reversível e assim que o ambiente retorna as condições favoráveis as células são capazes de retomar seu funcionamento (CHIU; CHEN; WONG, 2008; OLIVER, 2010).

Em condições de estresse as células podem também sofrer danos na membrana, o que as torna inviáveis. Embora sejam capazes de manter algum

nível de atividade enzimática residual, em condições favoráveis essas células não conseguem mais recuperar seu status normal, pois são incapazes de manter a integridade da membrana e o metabolismo (CODONY; AGUSTÍ; ALLUÉ-GUARDIA, 2015; PINTO; SANTOS; CHAMBEL, 2015).

A determinação da viabilidade celular e a enumeração de populações microbianas podem ser feitas levando em conta três aspectos fundamentais para uma célula viva: integridade da membrana celular, atividade metabólica e responsividade (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012; NOCKER; CAMPER, 2009). Diferentes métodos moleculares têm sido propostos para esta finalidade. Entretanto, ainda é necessário o aperfeiçoamento destes métodos para que a determinação da viabilidade celular bacteriana em inoculantes seja determinada de forma confiável, rápida e precisa, contribuindo no desenvolvimento de formulações de inoculantes mais eficientes (BERNINGER *et al.*, 2018; BRAISSANT; BACHMANN; BONKAT, 2015).

## **2.7. Métodos de enumeração de populações microbianas**

Os métodos clássicos de cultivo para enumeração de populações microbianas são baseados na capacidade de um microrganismo crescer ativamente e multiplicar-se formando colônias visíveis em meios de cultura (FODDAI; GRANT, 2020; NOCKER; CAMPER, 2009). Estes métodos são denominados dependentes de cultivo e foram essenciais para o avanço da microbiologia. A principal vantagem destes métodos em relação as técnicas moleculares, é a possibilidade de fornecer material microbiano biologicamente ativo para ser usado em outras análises (AL-AWADHI *et al.*, 2013). Entretanto, em alguns casos podem apresentar algumas limitações. Por exemplo, como subestimar o número de microrganismos presentes nas amostras como células viáveis que perderam a capacidade de formar colônias, além de exigir procedimentos laboriosos que demandam muito tempo (FODDAI; GRANT, 2020; XU, 2016).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos diferentes métodos alternativos para determinar a enumeração de células microbianas. Essa determinação pode ser feita utilizando métodos baseados na fisiologia e integridade celular,

na atividade metabólica da célula e aqueles baseados na presença de ácidos nucleicos (GAO *et al.*, 2021). Os métodos moleculares fazem parte de um grupo de métodos chamados de “independentes de cultivo”, os quais possibilitam a otimização da descrição das comunidades microbianas (AL-AWADHI *et al.*, 2013).

Os métodos independentes de cultivo são baseados principalmente na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), na qual a detecção e diferenciação dos microrganismos acontece pela amplificação de uma sequência específica de DNA (COCOLIN *et al.*, 2013). A PCR quantitativa (qPCR) é largamente utilizada na identificação, quantificação e análise da diversidade microbiana, mesmo quando estes microrganismos estão em pequenas proporções na amostra (GIRAFFA; NEVIANI, 2001). Entretanto, uma limitação desta técnica é a incapacidade de distinguir células viáveis das inviáveis durante a detecção dos microrganismos. Na tentativa de superar esta limitação, foram propostas novas abordagens da técnica, que consistem em utilizar corantes de viabilidade, capazes de intercalar com o DNA de células viáveis, como pré-tratamento das amostras antes da qPCR (NOCKER; CAMPER, 2006, 2009).

### **2.7.1. Enumeração de microrganismos por PCR quantitativa (qPCR)**

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma técnica, na qual ocorre *in vitro* a amplificação de sequências específicas de ácidos nucleicos (MULLIS, 1990). A PCR quantitativa ou PCR em Tempo Real foi desenvolvida, a partir da PCR convencional (ou qualitativa) e significou um avanço, possibilitando novas aplicações na pesquisa, devido a sua sensibilidade na detecção e a possibilidade de monitorar em tempo real a geração dos produtos da PCR (XU, 2016).

Na qPCR a quantidade de produto de um determinado ponto da curva de amplificação da reação, está diretamente associada com a quantidade inicial de fitas-molde de ácidos nucleicos presentes na amostra. Dessa forma, quanto maior a quantidade de cópias do ácido nucleico-alvo no início da reação, menor será o número de ciclos necessários para detectar o produto de amplificação (FREEMAN; WALKER; VRANA, 1999; RAEYMAEKERS, 2000).

O processo utilizado na qPCR para quantificar ácidos nucleicos presentes em uma amostra é baseado na detecção e quantificação de fluorescência emitida por fluoróforos que se ligam direta ou indiretamente ao produto de amplificação. A fita-molde da reação pode ser DNA (plasmidial, genômico ou *amplicon*) ou cDNA, sintetizado pela transcrição reversa de um RNA mensageiro (VALASEK; REPA, 2005; ZHANG; FANG, 2006). Os dois principais sistemas utilizados na detecção da fluorescência em reações de qPCR são os corantes intercalantes e as sondas de hibridização (GUT *et al.*, 1999).

Os corantes intercalantes (por exemplo, SYBR® Green) são os mais usados nas reações de qPCR. Estes se ligam de forma inespecífica apenas à dupla fita de DNA. A falta de especificidade do fluoróforo possibilita seu uso com qualquer par de iniciadores na amplificação de qualquer sequência alvo. No entanto, esta característica acaba sendo uma das principais limitações desse sistema de quantificação, devido ao risco de detecção de amplificações não específicas e de dímeros de iniciadores (GARCÍA-CAÑAS; CIFUENTES; GONZÁLEZ, 2004). Contudo, pela análise das curvas de dissociação térmica pode-se distinguir os produtos amplificados (WEIGHARDT, 2006).

Outro sistema de detecção utilizado na qPCR é o de sonda de hidrólise fluorogênica (por exemplo, TaqMan®). Esse sistema baseia-se na atividade de exonuclease 5' – 3' da Taq polimerase para produzir um sinal fluorescente. Na sonda há um oligonucleotídeo específico ao ácido nucleico alvo, o que torna esse sistema de detecção mais específico, quando comparado com os corantes intercalantes (ANDERSEN *et al.*, 2006; NAVARRO *et al.*, 2015).

No estudo da interação entre plantas e microrganismos a qPCR se tornou uma ferramenta importante. A utilização dessa técnica tem possibilitado desde a identificação de genes envolvidos nos mecanismos de interação até a identificação e quantificação de populações microbianas de diferentes espécies em diversas matrizes.

Couillerot *et al.* (2010), desenvolveram um ensaio de qPCR para quantificação de *A. lipoferum* estirpe CRT1 na rizosfera de plântulas de milho cultivadas em casa de vegetação e em campo. Galisa *et al.* (2012), identificaram genes para serem utilizados como controles internos de referência, em estudos de expressão gênica utilizando RT-qPCR (*reverse*



*transcription quantitative PCR*) na bactéria diazotrófica *G. diazotrophicus* cultivada sob diferentes condições de cultivo. No ensaio de qPCR desenvolvido por Faleiro *et al.* (2013) para detecção da BPCV *A. brasilense* em plântulas de milho foram desenhados iniciadores para detecção da presença do gene *nifA*. Stets *et al.* (2015) desenvolveu pares de iniciadores estirpe específicos para serem utilizados em ensaios de qPCR para monitorar a população de *A. brasilense* estirpe FP2 em raízes de trigo sob condições de crescimento estéreis e não estéreis. Espindula *et al.* (2017), utilizando a técnica RT-qPCR, compararam a expressão de alguns genes vegetais envolvidos na resposta à inoculação de *A. brasilense* FP2 em plantas de milho. Urrea-Valencia *et al.* (2021) avaliaram o perfil de colonização de *A. brasilense* AbV5/AbV6 em sementes de milho ao longo de setenta e cinco dias após a semeadura (DAS) em um ensaio de campo. A abundância total de bactérias e de *A. brasilense* em sementes, raízes e rizosfera foram determinadas por qPCR.

No gênero *Herbaspirillum* já foram desenvolvidos trabalhos para quantificação e monitoramento da expressão gênica desses microrganismos durante a interação com arroz, trigo, milho e outros gramíneas (DO AMARAL *et al.*, 2014; BRUSAMARELLO-SANTOS *et al.*, 2012; CURÁ *et al.*, 2017; DAL'LASTA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2014; RONCATO-MACCARI *et al.*, 2003; TROVERO *et al.*, 2018)

No trabalho realizado por Pereira *et al.* (2014) foi desenvolvido um par de iniciadores espécie-específicos para quantificar *H. seropedicae* em raízes de milho cultivadas *in vitro* e em vasos utilizando a técnica de qPCR. Do Amaral *et al.* (2014) desenvolveram um ensaio de RT-qPCR para avaliar se a presença de *H. seropedicae* estirpe SmR1 em raízes de milho interferia na expressão de genes de milho relacionados com o metabolismo de fitohormônios e com a resposta de explosão oxidativa, processos estes que estão envolvidos na resposta das plantas à colonização por BPCV. Dall'Asta *et al.* (2017) desenvolveram uma sonda de hidrólise para quantificar o DNA de *H. seropedicae* em ensaios de qPCR. Além disso, a colonização efetiva de *H. seropedicae* SmR1 em plantas de milho cultivadas *in vitro* e em casa de vegetação foi monitorada avaliando a expressão dos genes *rpoC*, *hrcN* e *nifH* por RT-qPCR.

### **2.7.2. Enumeração de células viáveis de microrganismo por qPCR combinada com corantes de viabilidade**

Devido a versatilidade e a velocidade na obtenção dos resultados, as técnicas baseadas na amplificação de ácidos nucleicos passaram a ser usadas em análises microbiológicas de laboratórios de pesquisa e para diagnóstico microbiológico em indústrias (NOCKER; CAMPER, 2009). Entretanto, os métodos baseados na quantificação de DNA podem resultar na detecção de células independentemente de seu estado de viabilidade. Isso acontece, porque fragmentos de DNA podem persistir íntegros no ambiente por longos períodos de tempo, mesmo após as células perderem a viabilidade (NOGVA *et al.*, 2003; WANG; LEVIN, 2006). Dessa forma, as análises de qPCR baseadas na concentração de DNA presente em uma amostra podem superestimar o número de células viáveis, ou ainda podem apresentar resultados falso-positivos devido a incapacidade da técnica em fazer a diferenciação entre células viáveis e inviáveis. Essa característica é vista como uma das principais limitações da qPCR durante análises de detecção e quantificação de microrganismos presentes em diferentes matrizes (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012; WANG; LEVIN, 2006).

Uma nova abordagem da técnica de qPCR foi desenvolvida por Nogva *et al.* (2003) e reforçada por Nocker & Camper (2006), com o conceito de corantes de viabilidade como alternativa para detecção de células viáveis durante a amplificação. A combinação da técnica de qPCR com corantes de viabilidade possibilita o monitoramento da viabilidade celular de diversos microrganismos em amostras de alimentos, ambientais e clínicas (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012). Os corantes de viabilidade monoazida de propídeo (PMA) e monoazida de etídeo (EMA) são moléculas intercalantes de DNA com capacidade de penetrar em células com membranas celulares comprometidas (NOCKER; CAMPER, 2006; NOGVA *et al.*, 2003). Dessa forma, a distinção de células viáveis e inviáveis feita por esses corantes é baseada na integridade da membrana celular (ELIZAQUÍVEL; SÁNCHEZ; AZNAR, 2012).

Os corantes são utilizados no pré-tratamento de amostras de microrganismos que serão quantificadas por qPCR. Após o tratamento, as amostras são expostas a uma fonte de luz halógena que propicia que a molécula do corante se intercale na fita dupla de DNA formando ligações covalentes. Esta reação ocorre devido à presença de um grupamento azida na molécula do corante, que no momento da fotólise é convertido em um radical nitrogênio altamente reativo, capaz de reagir com uma molécula orgânica próxima, como o DNA, e o excesso de corante reage com moléculas de água. A modificação resultante do tratamento com corantes de viabilidade rende uma molécula de DNA insolúvel, que não é extraída e nem detectada durante as reações de amplificação (Figura 4) (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012; NOCKER; CAMPER, 2009).

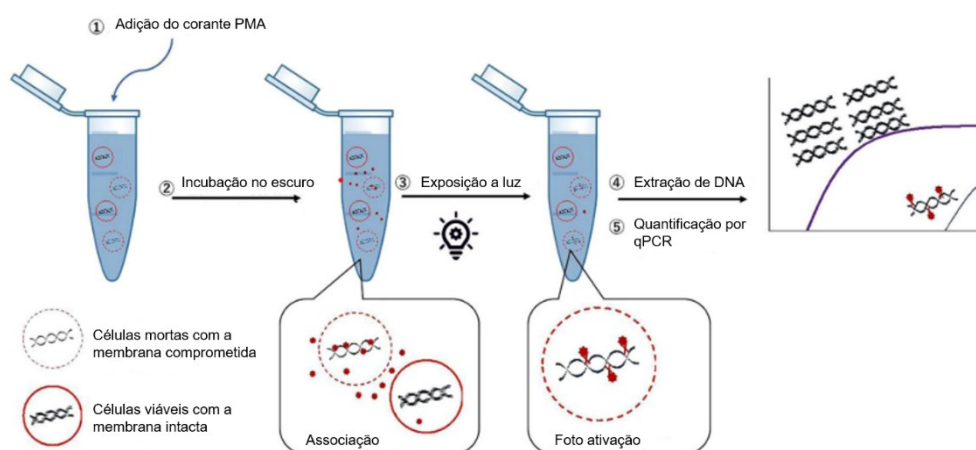


Figura 4 - Procedimentos e mecanismos para o diagnóstico de PMA-qPCR: ① adição de corante PMA, ② incubação no escuro para a associação entre ácidos nucleicos e corantes PMA, ③ exposição à luz para conversão do grupamento azida em um radical nitrogênio altamente reativo, capaz de reagir com uma molécula orgânica próxima (DNA) ④ Extração de DNA da amostra e ⑤ condução do procedimento de qPCR para a amplificação da sequência alvo. Fonte: Adaptado de Gao *et al.* (2020).

Os dois corantes de viabilidade agem de maneira bem semelhante, porém diferem na permeabilidade através das membranas celulares. O EMA, dependendo da célula bacteriana, pode penetrar também através de membranas de células viáveis, o que representa uma grande limitação na utilização deste corante (NOCKER; CAMPER, 2009). Já, o corante PMA, quando comparado com o EMA, apresenta maior especificidade na discriminação de células viáveis, pois sua permeabilidade é menor, o que

possibilitou sua ampla utilização na quantificação de células viáveis de diversos microrganismos (CANGELOSI; MESCHKE, 2014).

Antes de desenvolver um ensaio utilizando corantes de viabilidade devem ser considerados alguns fatores para a otimização da metodologia que podem influenciar nos resultados, como: a escolha do corante (PMA ou EMA) de acordo com a espécie bacteriana estudada, a concentração de tratamento da amostra, condições de incubação, fonte de luz fornecida, presença de células mortas e questões relacionadas ao tipo de matriz (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012).

No desenvolvimento de um ensaio de qPCR de viabilidade, a amostra em estudo normalmente é dividida em dois grupos: um grupo de amostras é tratado com um corante de viabilidade e outro grupo não é tratado, servindo como controle do ensaio. Uma vez que os corantes de viabilidade se baseiam na integridade da membrana celular, os tratamentos devem ser agressivos o suficiente para causar danos na célula. Podem ser utilizados tratamentos térmicos, agentes químicos e exposição à radiação ultravioleta (VONDRAKOVA *et al.*, 2018). Posteriormente, os grupos de amostras são quantificados por qPCR, e os resultados são analisados comparando as diferenças no sinal da qPCR entre os dois grupos. A contagem em placa após semeadura em meio de cultivo seletivo pode ser utilizada como forma de comparar os resultados obtidos com o uso destes corantes, já que somente células viáveis serão cultiváveis (CANGELOSI; MESCHKE, 2014).

Uma desvantagem da utilização dos corantes de viabilidade é a incapacidade que apresentam em fazer a distinção entre células viáveis e células não-cultiváveis. Isso ocorre, pois, a distinção da viabilidade é feita com base na integridade da membrana e células viáveis, mas não-cultiváveis possuem a membrana intacta, apesar de apresentar atividade metabólica reduzida (CODONY; AGUSTÍ; ALLUÉ-GUARDIA, 2015).

Os corantes de viabilidade estão sendo aplicados a uma vasta gama de microrganismos, incluindo células vegetativas de bactérias em diferentes abordagens. As principais áreas de aplicação do método estão relacionadas à avaliação microbiológica de matrizes alimentares, condições higiênico-sanitárias de águas e produtos residuais, amostras ambientais, solos e plantas. Alguns trabalhos foram desenvolvidos para quantificar microrganismos em

plantas cultivadas de interesse econômico. A maioria desses trabalhos utilizou corantes de viabilidade para quantificar microrganismos fitopatogênicos e alguns deles estão descritos na Tabela 1.

Recentemente, para avaliar a viabilidade celular de inoculantes, um trabalho foi desenvolvido com a bactéria *A. brasilense* como inoculante puro e inoculada em raízes de milho. A quantificação foi realizada utilizando qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa. Os resultados mostraram que a enumeração obtida tanto para o inoculante puro quanto em raízes de milho por qPCR foi superior à enumeração por PMA-qPCR e por contagem em placa. Evidenciando que o ensaio PMA-qPCR foi eficiente na quantificação de células viáveis em inoculantes e forneceu resultados confiáveis de forma rápida e precisa em comparação com métodos dependentes de cultivo (DA CUNHA *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Tabela 1 - Principais aplicações de corantes de viabilidade para quantificação de células viáveis em plantas.

<b>Matriz</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Corante de Viabilidade</b>	<b>Referência</b>
<i>Plantas</i>			
Raízes de Canola	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	PMA	(AL-DAOUD <i>et al.</i> , 2016)
Folhas de morango	<i>Xanthomonas fragariae</i>	PMA	(WANG, H.; TURECHEK, 2020)
Folhas de pêra, morango e kiwi	<i>Lactobacillus plantarum</i>	PMA e EMA	(DARANAS <i>et al.</i> , 2018)
Sementes de Tomate	<i>Clavibacter michiganensis</i>	PMA e EMA	(HAN <i>et al.</i> , 2018)
Sementes de Pepino	<i>Pseudomonas syringae pv. lachrymans</i>	PMA	(MENG <i>et al.</i> , 2016)
Cascas de Laranja	<i>Pantoea agglomerans CPA-2</i>	PMA	(SOTO-MUÑOZ <i>et al.</i> , 2015)
Tomate	<i>Pseudomonas syringae</i>	PMA	(CHAI <i>et al.</i> , 2020)

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

Comparar os genomas do gênero *Herbaspirillum* para estabelecer a diversidade gênica do gênero e desenvolver ensaio de avaliação da viabilidade celular de *Herbaspirillum seropedicae* em raízes de milho utilizando a metodologia PMA-qPCR.

#### **3.2. Objetivos específicos**

Testar a metodologia PMA-qPCR, para a quantificação de células viáveis de *H. seropedicae* em culturas puras, e em plantas de milho crescidas *in vitro*.

Comparar a eficiência das técnicas qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa para a quantificação de *H. seropedicae*.

Analisar a distribuição do cluster de genes *nif* no genoma das espécies de *Herbaspirillum*.

Avaliar a conservação do cluster *nif* no genoma de *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans*.

## CAPÍTULO I

### **4. A genômica comparativa revela alta conservação e distribuição escassa de genes *nif* de fixação de nitrogênio no gênero *Herbaspirillum* associado a plantas**

#### **4.1. Resumo**

O gênero *Herbaspirillum* ganhou destaque devido aos vários relatos de estirpes diazotróficas e resultados promissores no crescimento de plantas em ensaios de campo. No entanto, à medida que o estudo da diversidade de espécies de *Herbaspirillum* foi ganhando força, ficou mais claro que o estilo de vida benéfico quando associado a plantas não era a única forma de interação ecológica neste gênero, devido a relatos de fitopatogênese e infecções nosocomiais. Neste estudo foi realizada uma pesquisa profunda em todos os genomas de *Herbaspirillum* disponíveis publicamente. Usando uma filogenia robusta do genoma central, foi constatado que todas as espécies descritas estão bem delimitadas, sendo a única exceção os clados *H. aquaticum* e *H. huttiense*. Também foi constatado que os genes *nif* são altamente prevalentes apenas em *H. rubrisubalbicans*; no entanto, independente da espécie, todos os genes *nif* compartilham o mesmo arranjo gênico com alta identidade proteica e estão presentes em apenas dois tipos principais, em fitas invertidas. Por meio de uma árvore filogenética NifHDKENB, foi observado que as sequências *nif* de *Herbaspirillum* podem ter sido adquiridas do último ancestral comum pertencente à ordem Nitrosomonadales.

Palavras chaves: Filogenia; Microbiologia vegetal; Nitrogenase; Diazotrófico; NifHDKENB

#### 4.1. Introdução

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo mediado por um grupo de procariontes, chamados diazotróficos, capazes de reduzir o nitrogênio atmosférico a amônio (DIXON; KAHN, 2004). Alguns desses microrganismos estão intimamente associados às plantas, sendo capazes de transferir nitrogênio fixado para o hospedeiro, tornando-os potenciais bioinoculantes (CARVALHO *et al.*, 2014). No entanto, procariontes de vida livre também podem contribuir para os balanços de nitrogênio, particularmente em solo sem plantas leguminosas (SMERCINA *et al.*, 2021), solo profundo (ZHANG *et al.*, 2022) e solo de dossel (MATSON *et al.*, 2015). A FBN é catalisada pela nitrogenase, uma metaloenzima complexa que possui características estruturais e funcionais conservadas. A expressão da nitrogenase é regulada por, pelo menos, 20 genes estruturais e reguladores (CHUBATSU *et al.*, 2012; DIXON; KAHN, 2004). Embora alguns genes reguladores possam variar de acordo com as espécies diazotróficas e as condições em que o FBN ocorre, foi demonstrado que *nifHDKENB* são genes essenciais e, portanto, constituem um critério mínimo para a previsão *in silico* de diazotrofia (DOS SANTOS *et al.*, 2012). Essa abordagem tem sido usada para rastrear estirpes diazotróficas em diferentes estudos (revisado em KOIRALA *et al.*, 2021).

O gênero *Herbaspirillum* é conhecido por sua associação benéfica com plantas. Ensaios de campo já mostraram que estirpes desse gênero podem promover o crescimento de plantas quando usadas como bioinoculantes (ALVES *et al.*, 2021; ALVES *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2020). Esses achados foram corroborados por vários relatos de isolados capazes de fixar nitrogênio atmosférico juntamente com a ocorrência de *nif* em muitas estirpes (CHUBATSU *et al.*, 2012). Apesar da maioria dos dados que suportam a fixação de nitrogênio estarem relacionados a *H. seropedicae* (CHUBATSU *et al.*, 2012; FAORO *et al.*, 2019), os genes *nif* já foram relatados em *H. rubrisubalbicans* e *H. frisingense* (BALDANI *et al.*, 2014). Além disso, o potencial de fixação de nitrogênio de *H. frisingense* foi validado usando ensaios



de redução de acetileno, ensaios de PCR e sequenciamento do genoma (ROTHBALLER *et al.*, 2008; STRAUB *et al.*, 2013a; STRAUB *et al.*, 2013b).

Estudos de sequenciamento de genoma completo revelaram características moleculares chave da interação de *H. seropedicae* com a planta hospedeira (PEDROSA *et al.*, 2011). Esses achados foram estendidos por comparações genômicas entre isolados clínicos e ambientais de *H. seropedicae* (FAORO *et al.*, 2019). Além disso, uma alta semelhança de identidade de aminoácidos e arranjo gênico foi revelada entre a região *nif* de *H. seropedicae* e *H. frisingense* (STRAUB *et al.*, 2013a). Apesar dessas conquistas, a maior parte da diversidade de espécies de *Herbaspirillum* foi muitas vezes pouco explorada em estudos de comparação genômica, incluindo o patógeno brando *H. rubrisubalbicans*, que pode causar doenças em algumas variedades suscetíveis de cana-de-açúcar e sorgo (TULESKI *et al.*, 2020).

As comparações de genomas podem ajudar a elucidar os padrões evolutivos que levaram à presença e conservação de famílias de proteínas. Para obter uma visão completa da distribuição *nif* e conservação do arranjo gênico no gênero *Herbaspirillum*, o objetivo deste estudo foi realizar uma ampla investigação comparando todas as sequências genômicas disponíveis publicamente. A diversidade e conservação do *nif* de *Herbaspirillum* foram exploradas por meio de comparações genômicas, pangenoma, core genoma e filogenias de *Nif*.

## 4.2. Material e Métodos

### Obtenção e curagem dos genomas

Todas as sequências de genoma do gênero *Herbaspirillum*, disponíveis publicamente em fevereiro de 2021, foram baixadas (n = 62) do banco de dados RefSeq (LI *et al.*, 2021). A ferramenta BUSCO 3.0 (MANNI *et al.*, 2021) foi empregada para avaliar a qualidade da montagem, usando o banco de dados de ortólogos de cópia única de Betaproteobacteria. Todos os genomas tinham pelo menos 90% de ortólogos de cópia única presentes no banco de dados; assim, nenhum genoma foi removido nesta etapa.

## Filtragem dos genomas

Para confirmar que todos os genomas obtidos pertenciam ao gênero *Herbaspirillum* foi realizada a análise de porcentagem de proteínas conservadas (POCP do inglês *percentage of conserved proteins*). Primeiramente o conteúdo proteico total dos genomas foi predito utilizando o software PROKKA 1.14.6 (SEEMANN, 2014). A quantidade de proteínas ortólogas entre os pares de genomas foi estimada utilizando o software orthofinder 2.5.2 (EMMS; KELLY, 2019). O cálculo de POCP foi realizado entre os pares de genomas de acordo com Qin et al. (2014):  $[(C1 + C2) / (T1 + T2)] \cdot 100\%$ , onde C1 e C2 representam o número de proteínas ortólogas conservadas entre dois genomas e T1 e T2 representam o número total de proteínas de cada um desses genomas. Genomas com POCP  $\geq 50\%$  foram considerados do gênero *Herbaspirillum*. A matriz de POCP foi visualizada em forma de *heatmap* utilizando o pacote pheatmap 1.0.12 em ambiente R (R Core Team, 2021). A identidade de aminoácidos foi calculada usando EzAAI (KIM; PARK; CHUN, 2021). Genomas comparados par a par que apresentaram valores de POCP superiores a 50% foram considerados do gênero *Herbaspirillum*. A matriz POCP foi visualizada como um mapa de calor usando o pacote pheatmap 1.0.12 no ambiente R. A identidade média de nucleotídeo (ANI) foi calculada para os genomas com POCP  $\geq 50\%$  utilizando o software pyani 0.2.11 (PRITCHARD et al., 2016). A matriz de distância de ANI foi utilizada para inferir uma filogenia por *Neighbor joining* utilizando o pacote APE 5.5 (PARADIS; CLAUDE; STRIMMER, 2004). A árvore foi visualizada utilizando a plataforma ITOL v4 (LETUNIC; BORK, 2019).

## Determinação do pangenoma de *Herbaspirillum*

As sequências de proteínas foram utilizadas para a determinação do pangenoma, utilizando um limiar de clusterização de 50% de identidade com o software Roary 3.13.0 (PAGE et al., 2015). Sequências compartilhadas por  $\geq 99\%$  dos genomas foram consideradas parte do genoma central (core), ao passo que o conteúdo gênico total foi considerado o pangenoma. As sequências pertencentes ao genoma central foram alinhadas utilizando o software mafft 7.0 (KATO; STANDLEY, 2013). A partir do alinhamento

múltiplo gerado, a filogenia por máxima verossimilhança foi obtida com auxílio do software FastTree 2.1.10 (PRICE; DEHAL; ARKIN, 2010). A visualização da matriz de presença/ausência do pangenoma foi obtida usando `roary_plots.py`, fornecido pela ferramenta Roary. Os genes estatisticamente associados à presença do cluster *nif* foram avaliados usando Scoary 1.6.16 (BRYNILDSDRUD et al., 2016). As categorias COG e KEGG foram inferidas para os pangenomas de genomas que continham ou não genes *nif* usando o software BPGA 1.3 (CHAUDHARI; GUPTA; DUTTA, 2016).

### **Distribuição dos genes relacionados a fixação de nitrogênio em *Herbaspirillum* spp.**

Para determinar a distribuição dos genes relacionados ao *cluster nif* no gênero *Herbaspirillum*, foram obtidas as sequências de 18 genes pertencentes à quatro regiões do *cluster nif* descritos no genoma de *H. seropedicae* SmR1 (GCF\_000143225.1). As sequências de *nifA* (WP\_013234836.1), *nifB* (WP\_006463072.1), *nifH* (WP\_013234820.1), *nifD* (WP\_013234819.1), *nifK* (WP\_013234818.1), *nifE* (WP\_013234817.1), *nifN* (WP\_013234816.1), *nifX* (WP\_006463095.1), *modA* (WP\_013234812.1), *modB* (WP\_013234811.1), *modC* (WP\_013234810.1), *fixX* (WP\_006463103.1), *fixC* (WP\_013234809.1), *fixB* (WP\_013234808.1), *fixA* (WP\_013234807.1), *nifW* (WP\_013234806.1), *nifV* (WP\_013234805.1), *fdxN* (WP\_013234804.1) foram utilizadas como referência em um alinhamento realizado por Blastp (ALTSCHUL et al., 1990), que buscou essas sequências contra um banco de dados formado por todas as sequências de proteínas de todos os genomas de *Herbaspirillum* spp.. Somente *hits* com pelo menos 50% de cobertura e 70% de identidade foram considerados válidos. A presença ou ausência dos genes relacionados à fixação de nitrogênio foi visualizada através da integração da árvore filogenética de core genoma e uma matriz de presença e ausência dos genes descritos acima, com auxílio do software ITOL v4 (LETUNIC; BORK, 2019).

### **Conservação do *cluster nif* em *H. seropedicae* e *H. rubrisubalbicans***

As sequências gênicas do *cluster nif* de *H. seropedicae* SmR1 foram utilizadas como referências em um Blast online utilizando a plataforma SimpleSynteny (VELTRI; WIGHT; CROUCH, 2016). Os mesmos parâmetros de

Blast foram aplicados, 50% de cobertura e 70% de identidade. A visualização da organização do *cluster nif* foi finalizada utilizando o software Inkscape 1.0.2-2.

### **Filogenia da Proteína Nif**

As sequências de proteínas NifHDK e NifENB de todos os genomas de *Herbaspirillum* foram obtidas como descrito acima. As sequências *nif* de *H. seropedicae* SmR1 foram usadas como referência no blastp contra o banco de dados NCBI NR restrito à classe Betaproteobacteria, excluindo o gênero *Herbaspirillum*, como sujeito. Foram obtidos os primeiros 500 acertos para cada uma das seis sequências de Nif. Usando scripts internos, 191 sequências únicas que ocorreram como hits para todas as seis sequências Nif foram filtradas. Por fim, 14 sequências Nif de *Herbaspirillum*, de genomas que codificam o cluster *nif* completo, foram adicionadas aos hits Nif filtrados. O software MUSCLE 3.8.31 (EDGAR, 2004) foi usado para realizar o alinhamento de sequências múltiplas, que foi posteriormente concatenado e usado para reconstruir uma filogenia de máxima verossimilhança usando IQ-TREE 2 (MINH *et al.*, 2020) com as entradas -nt 14 -m MFP -bb 1000. A visualização da árvore filogenética Nif foi finalizada usando o software ITOL v4 (LETUNIC; BORK, 2019) e o software Inkscape 1.0.2–2.

## **4.3. Resultados**

### **Comparações de genoma completo**

O grau de conservação de proteínas foi avaliado para inferir se os genomas selecionados pertenciam ao mesmo gênero. Comparações pareadas revelaram que a porcentagem de proteínas conservadas variou de 37% a 99% (Figura 1). Cinquenta e oito estirpes foram classificadas como gênero *Herbaspirillum* devido a valores de POCP que variaram de 51% a 99%. No entanto, quatro linhagens apresentaram valores de POCP inferiores a 50%, indicando que não pertencem ao gênero *Herbaspirillum*. As seguintes estirpes foram removidas: *Herbaspirillum* sp. K2R10-39, *Herbaspirillum* sp. K1R23-30, *Herbaspirillum* sp. SJZ107, e *Herbaspirillum* sp. ST 5-3. Ao contrário, valores de POCP superiores a 90% foram observados entre genomas da mesma

espécie, indicando a adequação desta abordagem para determinar a relação genoma-genoma. Os genomas removidos também apresentavam baixa identidade de aminoácidos (AAI) e fração ortóloga, quando comparados aos demais genomas de *Herbaspirillum*.

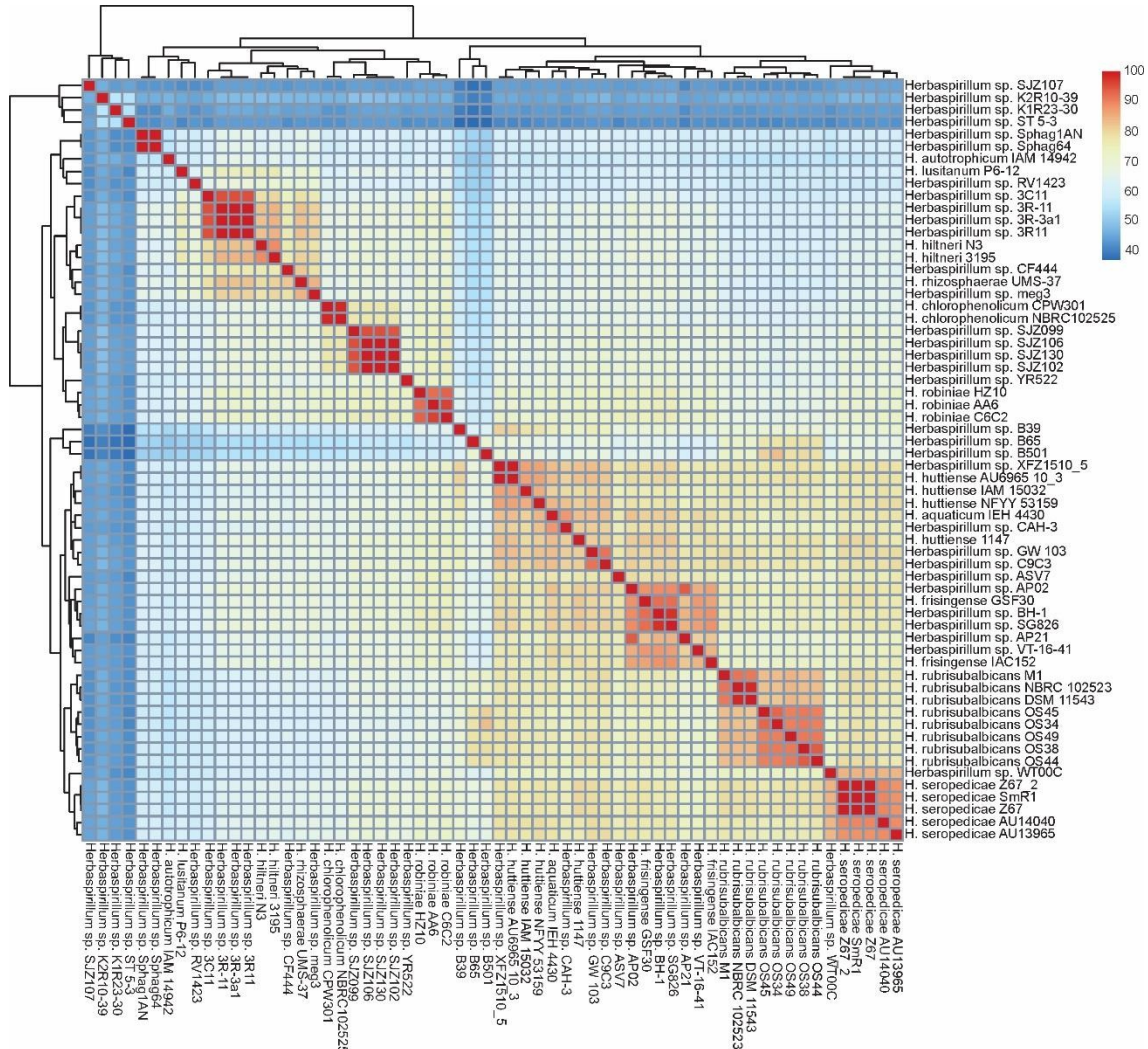


Figura 1 - Mapa de calor de porcentagem de proteínas conservadas de 62 genomas de *Herbaspirillum*. Cores quentes representam maior porcentagem de proteínas ortólogas compartilhadas. Os genomas outliers apresentaram valores < 50%.

A identidade média de nucleotídeos (ANI) dos 58 genomas pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* foi usado para construir um dendrograma baseado em distância (Figura 2). Trinta genomas formaram agrupamentos de espécies, enquanto 28 genomas não se agruparam com nenhuma espécie descrita. No geral, o gênero *Herbaspirillum* compreende 11 espécies descritas e cinco aglomerados sem nomenclatura oficial que formam aglomerados semelhantes a espécies. Nove genomas depositados como *Herbaspirillum* sp. agrupados com espécies conhecidas. *Herbaspirillum* sp. WT00C (GCF\_001929405.1)

mostrou 95,6% de ANI com *H. seropedicae* SmR1. *Herbaspirillum* sp. B65 (GCF\_000333555.1) e B501 (GCF\_000333575.1) apresentaram 98,4% e 99,8% de ANI, respectivamente, com *H. rubrisubalbicans* Os45. *Herbaspirillum* sp. VT-16-41 (GCF\_001994935.1), *Herbaspirillum* sp. BH1 (GCF\_002870055.1), e *Herbaspirillum* sp. SG826 (GCF\_011759625.1) estão agrupados no clado de *H. frisingense* (97%, 97,9% e 98% ANI, respectivamente, com *H. frisingense* GSF30). *Herbaspirillum* sp. XFZ15\_10\_5 (GCF\_003634405.1) e *Herbaspirillum* sp. B39 (GCF\_000333495.1) apresentaram 99% e 97,2% de ANI, respectivamente, com *H. huttiense* NFYY53159. Por fim, *Herbaspirillum* sp. CAH-3 (GCF\_009668275.1) foi agrupado no clado *H. aquaticum* (98,5% ANI).

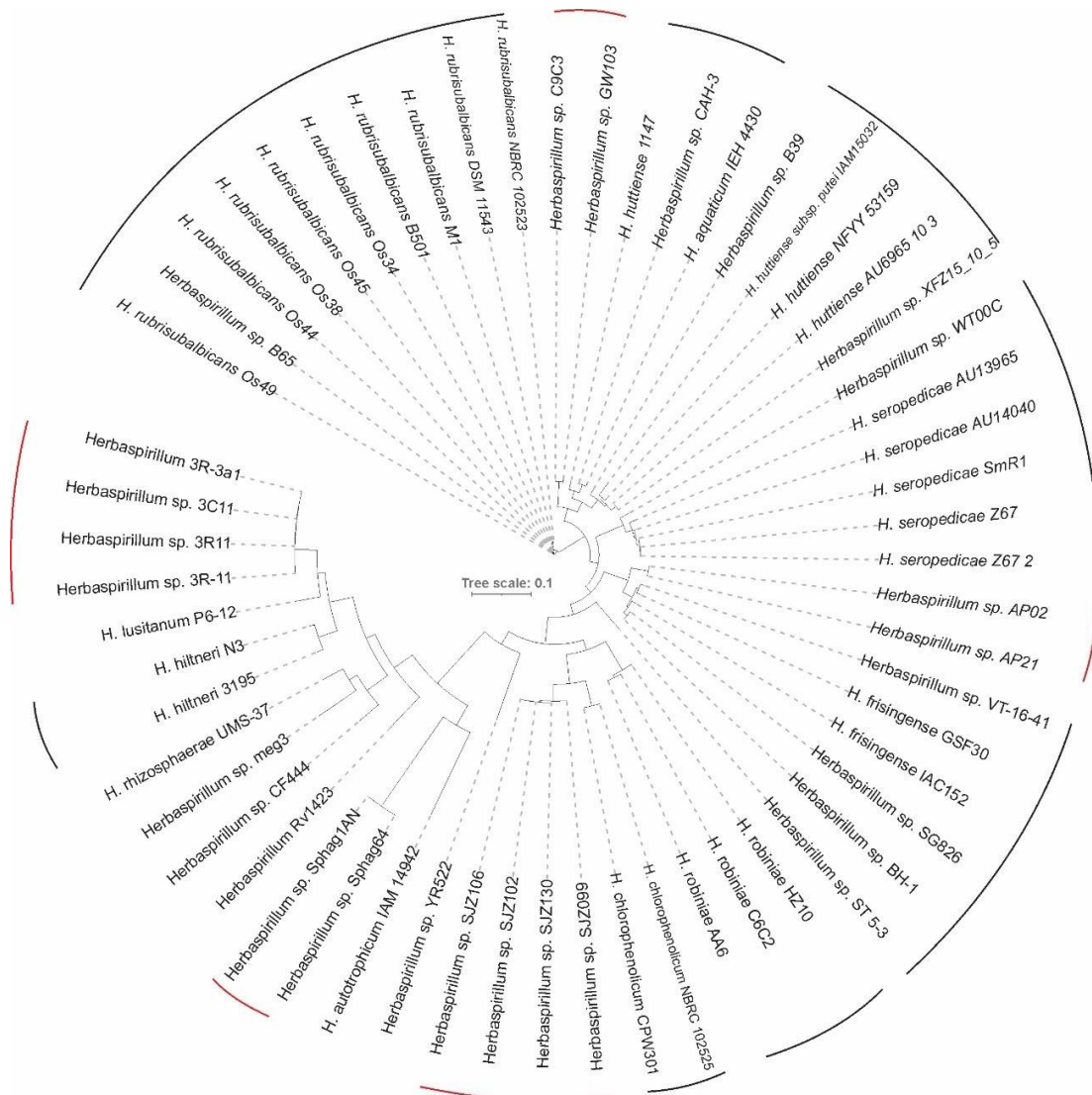


Figura 2 - Dendrograma baseado na distância da identidade média de nucleotídeos (ANI) de 58 genomas de *Herbaspirillum*. Arcos externos delimitam clados com mais de 95% de ANI. Arcos

negros delimitam uma espécie descrita; arcos vermelhos externos delimitam um aglomerado semelhante a uma espécie não descrita.

O único caso de estirpe mal classificada foi *H. huttiense* 1147, que deve ser reclassificada para *H. aquaticum*. Além disso, cinco aglomerados semelhantes a espécies abrigando apenas estirpes sem espécies conhecidas apresentaram valor de ANI maior que 95% entre si, indicando a presença de espécies não descritas dentro do gênero *Herbaspirillum*.

### Pangenoma e distribuição *nif* do gênero *Herbaspirillum*

Cinquenta e oito genomas foram usados para construir o pangenoma de *Herbaspirillum*, que compreende 32.954 famílias de genes. O tamanho do pangenoma aumentou junto com a adição de novos genomas, indicando alta diversidade genômica ainda a ser descoberta (Figura 3).

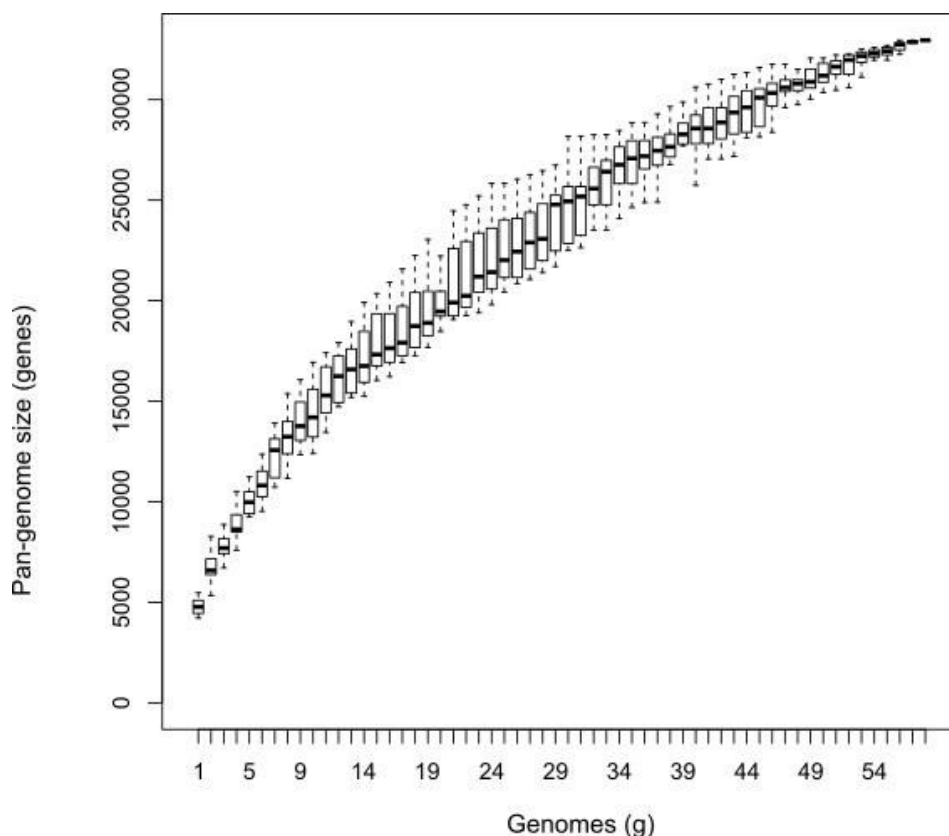


Figura 3 - Estimativa do tamanho do pangenoma do gênero *Herbaspirillum*.

O genoma central é constituído por 840 genes presentes em mais de 99% dos genomas. A matriz de presença e ausência do pangenoma revelou a ocorrência de grandes regiões gênicas compartilhadas pela maioria dos genomas, respondendo pelas 730 famílias de genes que compõem o genoma

*soft core*. Como 4809 foi a quantidade média de genes codificadores de proteínas, 32,65% do conteúdo genômico total foi altamente conservado (presente em mais de 95% dos genomas) em todo o gênero *Herbaspirillum* (Figura 4). O baixo número de genes únicos por espécie ou cluster, com pelo menos três genomas, também indica que as espécies de *Herbaspirillum* retêm uma grande quantidade de sequências compartilhadas.

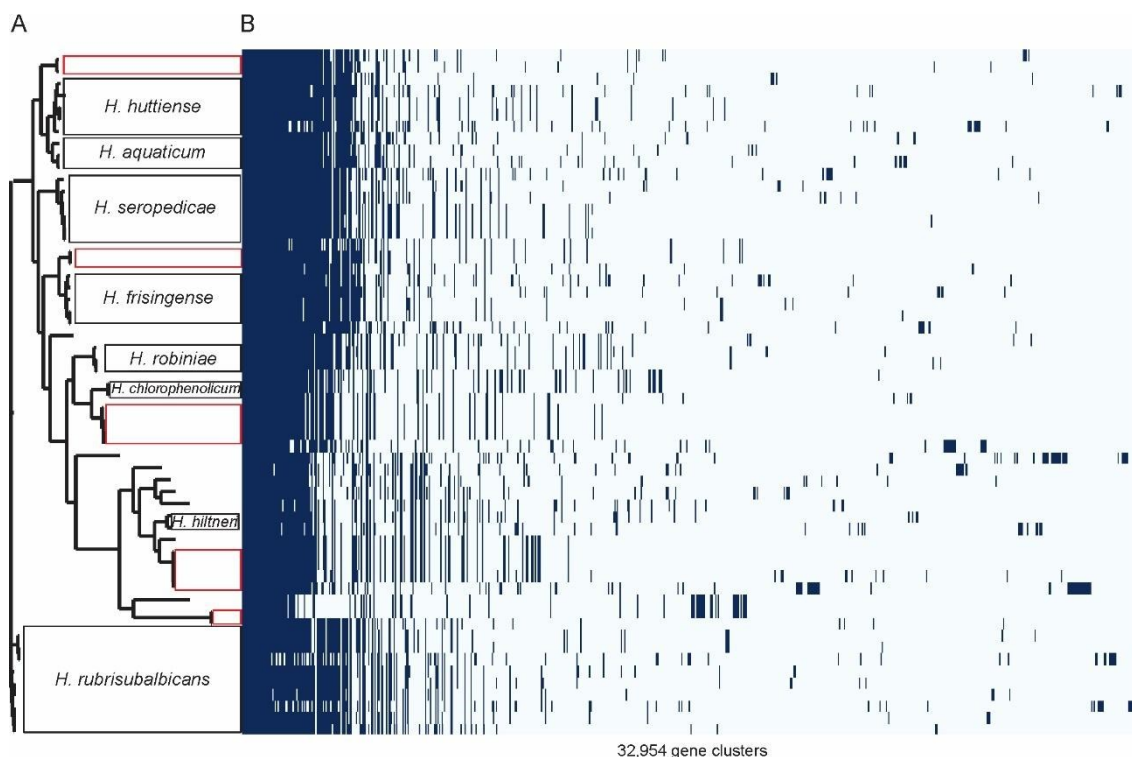


Figura 4 - A matriz de presença/ausência do pangenoma *Herbaspirillum* mapeou na árvore filogenética de máxima verossimilhança do genoma central. **A.** Árvore filogenética do genoma central. Caixas pretas internas delimitam uma espécie descrita; caixas vermelhas internas delimitam um aglomerado semelhante a uma espécie não descrita. **B.** Os quadrados preenchidos em azul representam a presença do gene, enquanto os espaços em branco representam a ausência do gene.

Os genes *nif* foram encontrados em 16 genomas de diferentes espécies de *Herbaspirillum*; foi realizada uma análise mais profunda do pangenoma, procurando genes estatisticamente associados à ocorrência de *nif*. Enquanto a grande maioria das famílias de genes fortemente associadas pertencem ao próprio cluster *nif*, outros genes como *tolQ* e *cntO* estão relacionados com a integridade da membrana e absorção de zinco. Ao explorar os pangenomas de genomas contendo *nif* ou com *nif*-ausente, não foi possível descobrir distinções claras em relação às categorias de genes COG e KEGG.



A árvore filogenética de máxima probabilidade do core genoma juntamente com a distribuição gênica do cluster *nif* foram investigados mais a fundo. A espécie *H. rubrisubalbicans* apresentou três características peculiares, comportamento de grupo externo, menor número de eventos de substituição de nucleotídeos e presença generalizada de genes do cluster *nif*. Além disso, apenas em *H. rubrisubalbicans* B65 e *H. rubrisubalbicans* 501 são encontrados agrupamentos *nif* incompletos (Figura 5A e B). No geral, os genes *nif* estão presentes em quatro das 11 espécies avaliadas; a prevalência total de *Herbaspirillum* spp. contendo *nif* foi de 27,5% (16 genomas). *H. seropedicae* SmR1, *H. seropedicae* Z67, *H. seropedicae* Z67\_2, *H. frisingense* GSF30, *H. huttiense* 1147, *Herbaspirillum* sp. AP02, e todos os outros *H. rubrisubalbicans* abrigam o cluster *nif* completo (Figura 5B). A similaridade mencionada entre *H. aquaticum* e *H. huttiense* também pode ser visualizada na árvore filogenética de máxima verossimilhança, bem como a alta precisão das atuais afiliações taxonômicas.

Todos os 14 genomas com o cluster *nif* completo abrigavam homólogos de *nifA*, *nifB*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *nifW*, *nifV*, *nifQ*, *nifS*, *nifT*, *nifW*, *nifZ1* e *nifZ*, com exceções dentro de *H. rubrisubalbicans*. Outros genes acessórios da nitrogenase, modABC, operon fixXCBA também foram detectados juntamente com *fdxN*, *fdxB* e genes desconhecidos. Notavelmente, apenas duas estruturas principais de cluster *nif* foram encontradas, sendo todos os genes na fita oposta em cada estrutura (Figura 6).

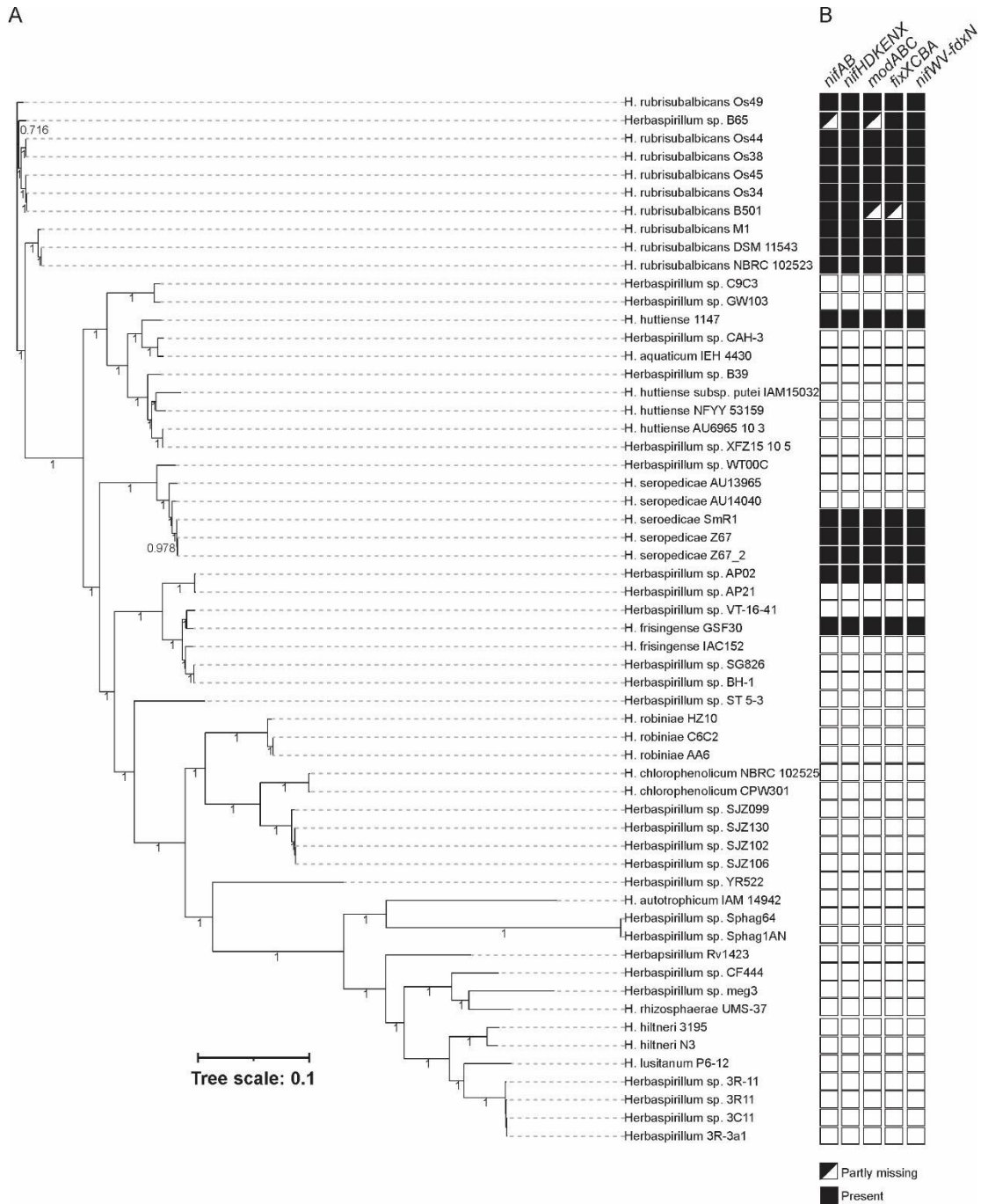


Figura 5 - A distribuição do cluster no gênero *Herbaspirillum*. **A.** Árvore filogenética de máxima verossimilhança do core genoma de 58 genomas de *Herbaspirillum*. Os valores de bootstrap são mostrados como valores de ramificação interna. **B.** Presença ou ausência do operon *nif*. Os quadrados preenchidos representam a presença de um operon *nif* completo; quadrados pretos preenchidos pela metade indicam que pelo menos um gene relacionado ao *nif* não foi encontrado dentro do operon usando os limiares aplicados; os quadrados brancos representam a ausência de todos os genes de um operon *nif*.

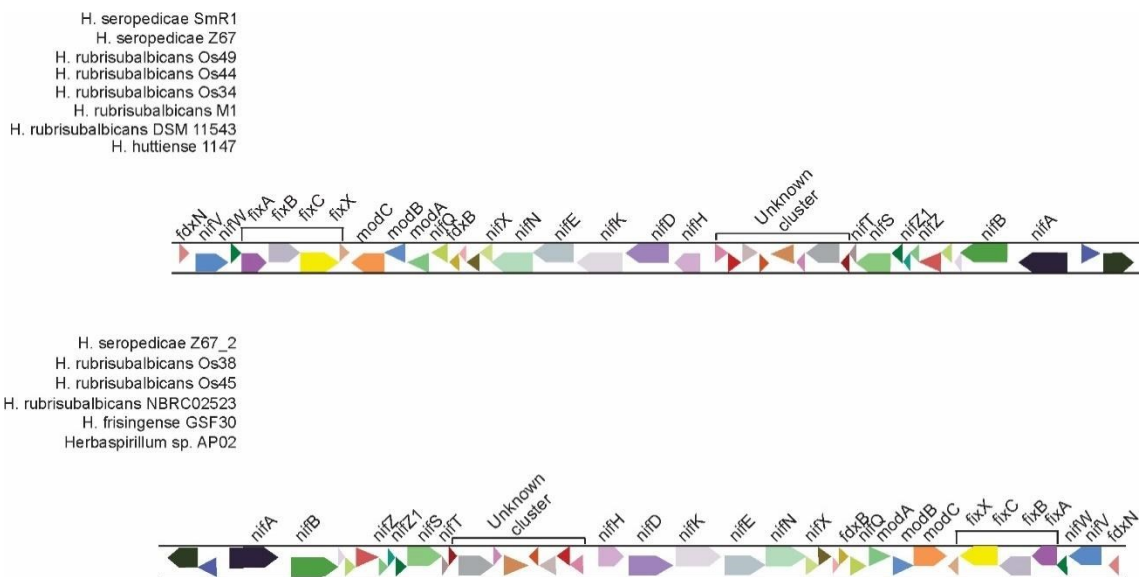


Figura 6 - Os dois arranjos gênicos do cluster nif em genomas de *Herbaspirillum*. Genes que compartilham a mesma cor compartilham identidade superior a 70%. Asteriscos nos nomes das estirpes indicam genomas que tinham genes ausentes.

Em seguida, foi investigada a filogenia Nif na classe Betaproteobacteria. A árvore filogenética de máxima verossimilhança confirmou a alta conservação das sequências de proteínas Nif de *Herbaspirillum* (Figura 7). Curiosamente, o ramo mais próximo do gênero *Herbaspirillum* abriga sequências taxonomicamente distintas, pertencentes a *Azoarcus*, *Aromatoleum* e *Rugosibacter*, enquanto o ramo interno agrupa sequências das famílias Sulfuricellaceae e Gallionellaceae. Outras sequências de Nif mostram agrupamento taxonomicamente coerente, como Azonexaceae, Burkholderiaceae e Comamonadaceae.

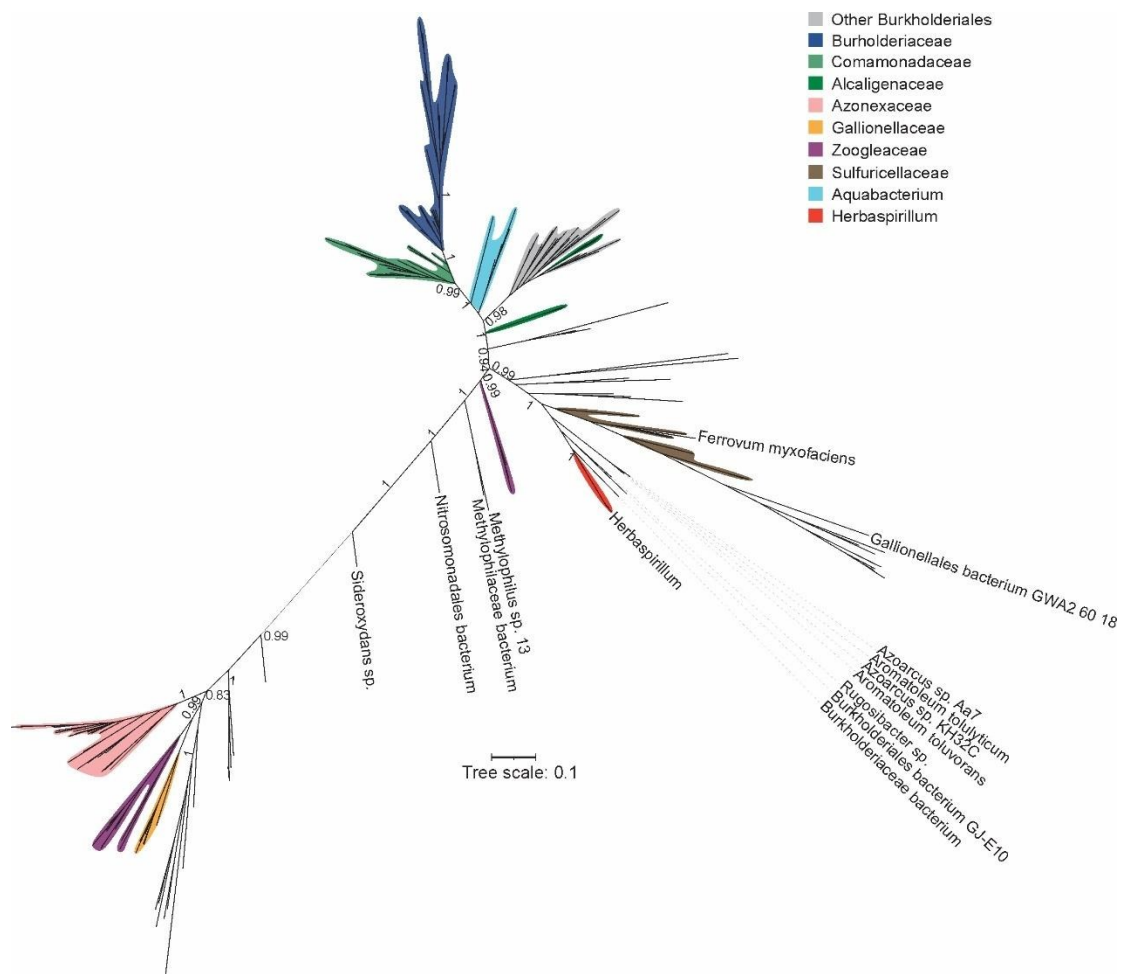


Figura 7 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança não enraizada de sequências de proteínas concatenadas NifHDKENB de 205 estirpes da classe Betaproteobacteria. A legenda de cores descreve as afiliações taxonômicas. Os valores de bootstrap internos são mostrados.

#### 4.4. Discussão

A fixação biológica de nitrogênio é um dos atributos metabólicos mais procurados em potenciais bioinoculantes bacterianos, servindo inclusive como parâmetro para diferenciar entre isolados benéficos em ensaios de triagem. Neste trabalho, foram analisados todos os genomas disponíveis publicamente do gênero *Herbaspirillum*, bem conhecido por suas estirpes diazotróficas. No entanto, nossos resultados desconstruem essa visão, mostrando, pela primeira vez, que o diazotrofismo é uma competência metabólica escassa mesmo dentro de linhagens sequenciadas de *Herbaspirillum*. Em esforços anteriores para estudar a diversidade de *Herbaspirillum*, quatro espécies foram reclassificadas para o novo gênero *Noviherbaspirillum* usando filogenética

fenotípica, quimiotaxonômica e 16S rRNA (LIN *et al.*, 2013). Estudos genômicos também corrigiram genomas mal classificados em *H. seropedicae* (FAORO *et al.*, 2019) e *H. frisingense* (OLIVEIRA *et al.*, 2021). Apesar dessas conquistas, Monteiro *et al.* (2014) definiram o gênero *Herbaspirillum* como um gênero pouco definido e estudado. Para obter uma compreensão mais profunda da diversidade de *Herbaspirillum*, foi criada a primeira árvore filogenética multilocus do gênero. Estas descobertas suportam os limites entre as espécies descritas, mesmo entre espécies contendo um único genoma, como *H. lusitanum*, *H. rhizosphaerae* e *H. autotrophicum*. Este estudo também confirma a proximidade entre *H. huttiense* e *H. aquaticum*, conforme relatado por Regunath *et al.* (2015), reforçando que o sequenciamento do gene 16S rRNA é incapaz de diferenciar essas duas espécies.

Até agora, o único pangenoma descrito de uma espécie de *Herbaspirillum* é o de *H. seropedicae* (FAORO *et al.*, 2019) obtido a partir das sequências genômicas de cinco estirpes. Devido ao pequeno número de genomas, mesmo dentro das espécies amplamente representadas, neste trabalho foi contruído um pangenoma de todo o gênero para obter uma compreensão mais profunda sobre a conservação de genes em todas as estirpes sequenciadas de *Herbaspirillum*. Foi descoberto que 32,65% do pangenoma é conservado em mais de 95% dos 58 genomas. Essa alta conservação já havia sido relatada para outras bactérias relacionadas ao solo e às plantas (MAISTRENKO *et al.*, 2020). Independentemente da presença ou ausência do cluster *nif* dentro dos genomas, não foi possível detectar padrões genômicos claros que pudessem estar relacionados ao estilo de vida associado à planta. Uma razão para isso pode ser o baixo número de genomas disponíveis para abordagens populacionais bacterianas (por exemplo, estrutura populacional).

Enquanto *H. lusitanum*, *H. rhizosphaerae* e *H. autotrophicum* têm apenas um genoma sequenciado, foi encontrado cinco agrupamentos de genomas semelhantes a espécies; um deles compreende os isolados *Herbaspirillum* sp. AP02 e *Herbaspirillum* sp. AP21, que promovem o crescimento do azevém (CORTÉS-PATIÑO *et al.*, 2021). Curiosamente, o cluster *nif* está presente no primeiro e ausente no último, um padrão semelhante ao observado em *H. seropedicae*, *H. frisingense* e *H. huttiense*.

Como a ausência de *nif* foi correlacionada com a transição para um estilo de vida oportunista em *H. seropedicae* (FAORO *et al.*, 2019) e *H. frisingense* (OLIVEIRA *et al.*, 2021), uma avaliação aprofundada das distinções genômicas entre presença ou ausência de *nif* em genomas *Herbaspirillum* spp devem ser considerados para aplicações biotecnológicas.

Comparações entre isolados clínicos e ambientais de *H. seropedicae* revelaram que as estirpes oportunistas AU13965 e AU14040 não possuem o cluster *nif* e adquiriram regiões gênicas relacionadas à biossíntese de lipopolissacarídeos (FAORO *et al.*, 2019). Da mesma forma, *H. frisingense* GSF-30, isolado de plantas de fibra C4 (KIRCHHOF *et al.*, 2001), abriga o conjunto completo de genes *nif*, enquanto a estirpe uropatogênica intimamente relacionada *Herbaspirillum* sp. VT-16-41 (TETZ; TETZ, 2017) não possui essa região gênica. Oliveira *et al.* (2021) empregaram ferramentas *in silico* para revelar que estirpes ambientais e clínicas de *H. frisingense* compartilham o mesmo conjunto de genes de virulência e resistência a antibióticos. *H. huttiense* também tem sido associado a infecções nosocomiais (LIU *et al.*, 2020); no entanto, Andreozzi *et al.* (2019) relataram uma expressão aumentada de *nifH* em *H. huttiense* RCA24 quando tratados com AIA. Embora este estudo tenha mostrado que a estrutura do cluster *nif* de *H. huttiense* 1147 é semelhante a outras do gênero, também foi descoberto que esta linhagem compartilha alta porcentagem de ANI com *H. aquaticum* IEH 4430, possivelmente pertencente à espécie *H. aquaticum*. Assim, mais pesquisas são necessárias para descobrir se as distinções observadas em *H. seropedicae* e *H. frisingense* também ocorrem no clado *H. huttiense/H. aquaticum*.

Uma distinção clara da ocorrência esparsa de *nif* mencionada acima não pode ser observada em *H. rubrisubalbicans*; pelo contrário, todas as linhagens dessa espécie abrigavam os genes *nif*. *H. rubrisubalbicans* demonstrou associar-se com raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (BALDANI *et al.*, 1996; OLIVARES *et al.*, 1996), sendo capaz de aumentar significativamente o rendimento de colmos de várias variedades de cana-de-açúcar (DE OLIVEIRA *et al.*, 2006; SCHULTZ *et al.*, 2012). No entanto, *H. rubrisubalbicans* também pode desenvolver um estilo de vida fitopatogênico em algumas variedades de cana-de-açúcar (OLIVARES *et al.*, 1997), como já foi relatado tanto no arroz (VALDAMERI *et al.*, 2017) quanto no sorgo (TULESKI *et al.*, 2019).

Os genes *nif* estão organizados em uma série de arranjos entre os procariontes; um exemplo dessa diversidade foi relatado em *Bradyrhizobium*, no qual sete tipos distintos de agrupamentos *nif* foram encontrados, cada um com arranjos gênicos únicos (TAO *et al.*, 2021). Neste estudo, foram encontrados apenas dois tipos de arranjos gênicos *nif*, diferindo apenas entre fitas diretas ou complementares. Independentemente da orientação da fita, todos os genes foram altamente conservados; a alta identidade e conservação dos genes *nif* já havia sido relatada em comparações entre *H. frisingense* GSF-30 e *H. seropedicae* SmR1 (SRAUB *et al.*, 2013a). Assim, os resultados deste estudo expandiram essas observações para todo o gênero *Herbaspirillum*.

Devido à alta diversidade dos arranjos de genes do cluster *nif*, os pesquisadores estabeleceram um conjunto mínimo de seis genes *nif*, codificando componentes estruturais e biossintéticos, como uma ferramenta de critério para predição da fixação de nitrogênio (DOS SANTOS *et al.*, 2012). Este conjunto mínimo de genes *nif* foi usado em uma filogenia de proteínas Nif multi-locus em larga escala, que categorizou sequências Nif de Betaproteobacteria, incluindo três estirpes de *Herbaspirillum*, para o cluster IB (KOIRALA; BRÖZEL, 2021). Os resultados deste estudo da diversidade de Nif em Betaproteobacteria, usando o mesmo conjunto de sequências mínimas de proteínas, revelaram que em todos os 14 *Herbaspirillum* spp. as sequências de Nif agruparam-se na mesma ponta, tendo sequências de *Azoarcus*, *Aromatoleum* e *Rugosibacter* como vizinhos mais próximos. Usando sequências de genes *nifH* e *nifD*, foi demonstrado que os agrupamentos *nif* de *Azoarcus* e *Aromatoleum* podem ter sido adquiridos de *Dechloromonas* e *Azospira*, respectivamente (FAORO *et al.*, 2017). Isso foi ainda apoiado pelo emprego da análise de cluster RAFTS3G-32 nas sequências nifHDKENB (RAITZ *et al.*, 2021). Curiosamente, a árvore filogenética de máxima verossimilhança deste estudo não mostrou distinções entre as 14 sequências de *Herbaspirillum* NifHDKENB, indicando que essas sequências não foram adquiridas de eventos horizontais de transferência de genes.

As pontas internas do mesmo ramo, onde foram colocadas as sequências de *Herbaspirillum*, contêm várias sequências das famílias Sulfuricellaceae e Gallionellaceae, que atualmente estão separadas

taxonomicamente (KOJIMA *et al.*, 2021). As famílias Sulfuricellaceae e Gallionellaceae pertencem à ordem Nitrosomonadales, que abriga muitas linhagens relacionadas ao ciclo biológico do nitrogênio. Foi demonstrado que os genes *nif* foram repetidamente adquiridos horizontalmente durante as transições de estilo de vida de linhagens simbióticas de rizóbios (REMIGI *et al.*, 2016); no entanto, nos resultados neste estudo indicam que todos os genes *nif* de *Herbaspirillum* podem ter sido adquiridos da mesma fonte, possivelmente o último ancestral comum, pois eventos independentes de aquisições horizontais de doadores distintos dificilmente resultariam em padrões *nif* conservados conforme observado.

A alta conservação do arranjo dos genes *nif* e a identidade das sequências da proteína Nif em todas as espécies de *Herbaspirillum* que codificam *nif* indicam que esta região pode não ter sido adquirida horizontalmente. Nesse caso, estirpes de *Herbaspirillum* não codificadoras de *nif* podem ter perdido esses genes ao longo de sua evolução. Análises genômicas comparativas entre *Herbaspirillum* que codificam *nif* e táxons vizinhos que codificam *nif* (por exemplo, *Azoarcus*) podem ser úteis para testar essa hipótese.



## CAPÍTULO II

### 5. Enumeração de células viáveis de *Herbaspirillum seropedicae* utilizando propídio monoazida associado a PCR quantitativa

#### 5.1. Resumo

A bactéria promotora de crescimento vegetal *Herbaspirillum seropedicae* é endofítica e diazotrófica encontrada em associação com várias culturas economicamente importantes. Métodos confiáveis, de alto rendimento e econômicos são necessários para determinar a viabilidade bacteriana em formulações de inoculantes ou em plantas. O presente estudo tem como objetivo quantificar as células viáveis de *H. seropedicae* em cultura pura e raízes de milho cultivadas *in vitro* a partir do uso do propídio monoazida associado a PCR quantitativa (qPMA-qPCR). *H. seropedicae* cultivada em meio de cultura foi submetida a tratamento térmico a 48 °C por diferentes períodos de tempo. Raízes de milho foram inoculadas, cultivadas *in vitro* e coletadas sete dias após a inoculação. As células viáveis de bactérias foram quantificadas usando ensaios de qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa. Foram elaboradas curvas padrão e a eficiência obtida variou de 85 a 99%. O limite de detecção (LOD) foi de  $10^1$  cópias do genoma, correspondendo a 60,3 pg de DNA. A enumeração obtida em culturas puras por qPCR, PMA-qPCR e contagem de placas foram  $8,85 \pm 0,16$ ,  $6,51 \pm 0,12$  e  $2,25 \pm 0,30$  log UFC.mL<sup>-1</sup> após tratamento térmico, respectivamente. Esses resultados mostraram que o PMA-qPCR é uma abordagem poderosa para quantificar células viáveis e viáveis, mas não cultiváveis em inoculantes e plantas. O PMA-qPCR permitiu obter resultados confiáveis muito mais rapidamente do que os métodos dependentes de cultivo.

Palavras-chave: Bactérias promotoras de crescimento de plantas; Colonização de raízes de milho; PMA-qPCR

## 5.2. Introdução

*Herbaspirillum seropedicae*, a primeira espécie descrita do gênero *Herbaspirillum*, é uma bactéria endofítica conhecida por sua associação benéfica com diversas culturas economicamente importantes. Essa associação já foi bem caracterizada em nível molecular, fisiológico e microscópico (DO AMARAL *et al.*, 2016; MONTEIRO *et al.*, 2012a). *H. seropedicae* SmR1 é a estirpe mais estudada do gênero e tem seu genoma sequenciado e anotado (PEDROSA *et al.*, 2011). Quando usado como inoculante em plantas, os mecanismos pelos quais esta bactéria promove o crescimento das plantas incluem fixação biológica de nitrogênio, produção de fitohormônios e solubilização de fosfato (MONTEIRO *et al.*, 2014).

A entrega de um número adequado de células viáveis à planta e a sobrevivência do inóculo são essenciais para alcançar uma taxa de colonização satisfatória que resulte no efeito desejado no campo. No entanto, a viabilidade dos inoculantes é afetada pelas condições ambientais e pode ser influenciada antes, durante e após a sua aplicação em resposta a fatores bióticos e abióticos (BERNINGER *et al.*, 2018). A falta de formulações adequadas que possam suportar essas influências é um dos desafios do uso de PGPB em inoculantes agrícolas.

Métodos dependentes e independentes de cultivo são utilizados na avaliação da diversidade bacteriana associada a plantas cultivadas. O cultivo em meio sólido seguido pela contagem de unidades formadoras de colônias por muito tempo foi o método mais utilizado para monitorar a viabilidade de inoculantes relevantes para a agricultura. No entanto, é um método trabalhoso e pode ser demorado (BERNINGER *et al.*, 2018; PENNA *et al.*, 2011). Outras metodologias, como a PCR quantitativa (qPCR) passaram a ser utilizadas para monitorar efetivamente o número de células dos inoculantes da rizosfera de uma forma rápida e precisa (COUILLEROT *et al.*, 2010).

Em relação à quantificação de DNA bacteriano em plantas um ensaio de qPCR usando os iniciadores espécie específico HERBAS1 foi desenvolvido para quantificar o DNA de *H. seropedicae* em raízes de milho inoculadas (PEREIRA *et al.*, 2014). A abundância de *H. seropedicae* foi avaliada em

plantas de milho cultivadas em condições estéreis e não estéreis, para isso foi desenvolvido um ensaio de qPCR utilizando uma sonda de hidrólise TaqMan espécie-específica (DAL'LASTA *et al.*, 2017).

Embora eficaz na quantificação de DNA bacteriano em plantas, a técnica de qPCR pode apresentar uma limitação importante, não sendo capaz de diferenciar o DNA oriundo de células viáveis ou inviáveis. Dessa forma, os resultados de qPCR podem superestimar o número de células viáveis presentes. Uma alternativa é o pré-tratamento das amostras com corantes intercalantes de DNA como o propídio monoazida (PMA). O PMA permite que apenas o DNA de células viáveis seja amplificado, incluindo aquelas que podem ser cultivadas e aquelas que não podem ser cultivadas. O PMA pode diferenciar tipos de células devido à sua capacidade de penetrar em células mortas ou células com membranas comprometidas e se ligar covalentemente ao DNA após exposição à luz halógena. Este DNA torna-se insolúvel e sua amplificação por qPCR é inibida (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012; NOCKER; CAMPER, 2006, 2009).

A associação do PMA em ensaios qPCR tem sido utilizada para detecção de células viáveis em populações microbianas de diferentes matrizes (AL-DAOUD *et al.*, 2016; CRESPO-SEMPERE *et al.*, 2013; ELIZAQUÍVEL; SÁNCHEZ; AZNAR, 2012; MENG *et al.*, 2016; SCARIOT *et al.*, 2018). PMA-qPCR é uma abordagem promissora para avaliar a viabilidade celular e de armazenamento de inoculantes bacterianos não esporulantes. No entanto, ainda precisa ser avaliado para diferentes espécies e estirpes bacterianas (BERNINGER *et al.*, 2018). Nesse sentido, a bactéria promotora de crescimento vegetal *A. brasilense* utilizada em inoculantes foi quantificada usando PMA-qPCR. Na enumeração de *A. brasilense*, valores semelhantes foram obtidos para o inoculante puro e em raízes de milho inoculadas com a bactéria por PMA-qPCR e contagem em placa em meio de cultura seletivo. Por outro lado, a enumeração por qPCR obteve valores superiores, revelando que o ensaio PMA-qPCR foi eficiente na quantificação de células viáveis para este inoculante (DA CUNHA *et al.*, 2020). O estudo de Da Cunha *et al.* (2020) foi o primeiro publicado usando a abordagem PMA-qPCR para enumerar células viáveis de bactérias promotoras de crescimento em inoculantes e em plantas inoculadas. Portanto, este trabalho tem como objetivo desenvolver um ensaio

para avaliar células viáveis de *H. seropedicae* em cultura pura e raízes de milho cultivadas *in vitro* utilizando a abordagem PMA-qPCR.

### 5.3. Material e Métodos

#### Linhagem bacteriana e condições de cultivo

A estirpe SmR1 *H. seropedicae* (cepa Z78 ATCC 35893 SmR) (BALDANI *et al.*, 1986) foi cultivada em um agitador orbital (120 rpm) a 30 °C em meio líquido NFbHPN suplementado com 5 g.L<sup>-1</sup> de ácido málico (KLASSEN *et al.*, 1997). A densidade óptica (DO) da cultura de células bacterianas foi medida a 600 nm usando um Espectrofotômetro Hitachi U2910. Uma correlação entre DO e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi determinada pelo método drop plate (contagem de gota em placa) como a diluição em série (1:10) de quantidades conhecidas de células em solução de NaCl a 0,9% em um meio de ágar NFbHPN seletivo. A contagem bacteriana foi realizada após incubação por 48 horas a 30°C. As cepas bacterianas utilizadas em qPCR como controle negativo (*Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*) foram cultivadas conforme descrito anteriormente (PEREIRA *et al.*, 2014).

#### Ensaio preliminar de temperatura em cultura pura

Para avaliar a aplicabilidade do corante PMA na diferenciação de células viáveis e não viáveis, uma análise preliminar foi realizada com amostras de culturas puras de *H. seropedicae* SmR1, cultivadas conforme descrito acima. Células inviáveis foram obtidas e as amostras foram submetidas a tratamento térmico com temperatura constante e tempo variável. Quatro ensaios foram realizados com culturas bacterianas de *H. seropedicae* SmR1 em banho maria termostaticado. No primeiro teste, foi testada a temperatura de 38°C nos tempos: 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. No segundo teste, a temperatura foi de 45°C; no terceiro teste, 52°C; e no quarto teste, 48°C. Nos testes 2, 3 e 4, os tempos utilizados foram 0, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. Para cada tempo, três microtubos contendo 1 mL de cultura pura foram obtidos. Os microtubos foram colocados em banho maria termostaticado nas temperaturas e tempos

determinados para cada ensaio. Ao final de cada período de tempo, os microtubos foram colocados em água fria por 15 segundos para que a cultura bacteriana ficasse em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada diluição seriada a partir da diluição de 1 mL da cultura pura em solução de NaCl 0,9%. O plaqueamento foi feito gota a gota em meio de ágar malato NFbHP seletivo e, para cada ponto de diluição, foram pipetadas três gotas com volume de 10µL. Foram realizadas três repetições por vez, sendo cada placa uma unidade experimental.

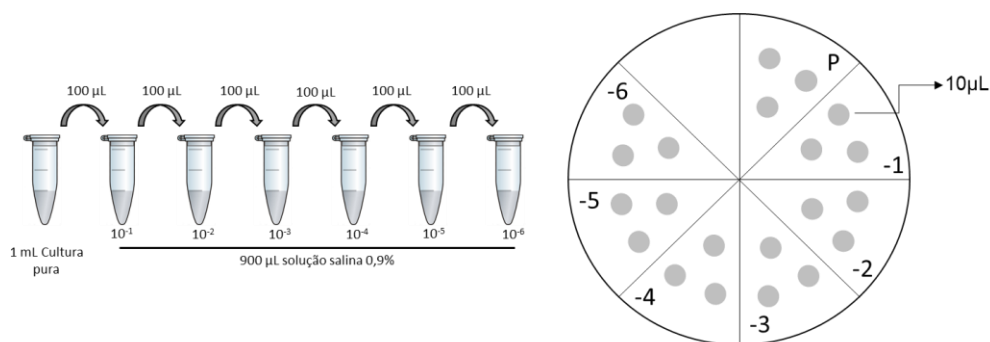


Figura 1 - Representação diluição seriada e plaqueamento por drop plate da cultura bacteriana nos ensaios de temperatura para *H. seropedicae* SmR1. P: cultura pura; -1 a -6 indica as diluições seriadas da cultura bacteriana. Fonte: Autora, 2022.

#### Preparação de amostras de cultura tratadas termicamente

*H. seropedicae* SmR1 foi cultivado até a fase de crescimento logarítmico médio (~108 UFC.mL<sup>-1</sup>), e 1,5 mL da cultura foi colocado em tubos de microcentrifuga submersos em banho maria termostatizado a 48 °C. Os tubos foram removidos a cada 0, 30, 60, 90, 120 e 180 min após a incubação. As amostras foram divididas em três grupos, o primeiro grupo permaneceu sem tratamento (amostras não tratadas com PMA), o segundo grupo foi tratado com PMA e o terceiro grupo foi plaqueado pelo método drop plate em meio NFbHP para contagem de colônias após 48 h de incubação em 30°C. O primeiro e o segundo grupo de amostras foram submetidos à centrifugação (6000 x g, 4 °C, 3 min), e os precipitados bacterianos (pellets) foram lavados três vezes com solução de NaCl 0,9% antes da análise. Três réplicas biológicas foram obtidas para cada grupo de tratamento.

### **Germinação, inoculação e crescimento *in vitro***

Sementes de *Zea mays* (variedade Dekalb390) foram esterilizadas superficialmente em uma cabine de biossegurança, lavando três vezes com água ultrapura autoclavada, seguida de etanol 70% por 3 minutos e agitação durante 30 min em solução de hipoclorito de sódio 2% e Tween 20 2,5%. As sementes foram lavadas três vezes com água ultrapura autoclavada por agitação suave, transferidas para folhas de papel de germinação (Germitest) e mantidas por três dias em câmara de crescimento à temperatura de 25 °C, no escuro, para germinação. As plântulas foram inoculadas com a cultura de *H. seropedicae* SmR1 (~108 UFC.mL<sup>-1</sup>) após diluição para 107 UFC.mL<sup>-1</sup> em meio NFb malato (sem fonte de nitrogênio) e mantidas em agitador orbital por 30 min a 30 °C e 80 rpm (PEREIRA *et al.*, 2014). Plântulas do tratamento controle foram inoculadas com Mock nas mesmas condições. As plântulas cultivadas *in vitro*, tanto inoculadas quanto controle foram lavadas em solução de NaCl 0,9% autoclavada por 1 min e colocadas em tubos de vidro contendo solução *Plant Medium* (EGENER; HUREK; REINHOLD-HUREK, 1999). As plântulas de cada tratamento foram cultivadas em uma câmara de ambiente controlado e colocadas lado a lado por 7 dias (fotoperíodo de 16 h, 25 °C e 40% de umidade). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em três repetições biológicas. Plântulas de milho foram coletadas aleatoriamente 7 dias após a inoculação (DAI). As raízes foram tratadas superficialmente por 2 min de imersão em etanol 70% mais 2 min em solução de hipoclorito de sódio 1%. Em seguida, as raízes foram lavadas 3 vezes em água destilada autoclavada para posterior análise.

### **Preparo das amostras de raízes de milho**

Para o milho cultivado *in vitro*, as amostras de raízes foram divididas em três grupos, o primeiro grupo permaneceu sem tratamento (amostras não tratadas com PMA), o segundo grupo foi tratado com PMA e o terceiro grupo foi plaqueado por *drop plate* em meio NFbHP para contagem de colônias após 48 h de incubação a 30°C. Para amostras tratadas com PMA, 200 mg de raízes foram trituradas em almofariz e pilão, em 1mL de solução salina 0,9% e transferidas para tubos de microcentrífuga. As alíquotas foram centrifugadas

(9000 x g, 10 min) e armazenadas em gelo até o tratamento com PMA (DA CUNHA *et al.*, 2020).

### **Tratamento com PMA para quantificação de células viáveis**

PMA (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) foi dissolvido (1 mg) em água ultrapura de acordo com as instruções do fabricante para obter uma solução estoque 20 mM (armazenada a - 20 ° C no escuro). A cultura de bactérias tratadas termicamente e os pellets de raiz de milho foram ressuspensos em água ultrapura a 500 µL e 1000 µL, respectivamente, e tratados com PMA para obter uma concentração final de 50 µM de PMA (GARCÍA-CAYUELA *et al.*, 2009). Os tubos foram incubados por 5 min no escuro (com agitação intermitente) e então expostos por 15 min a uma fonte de luz halógena de 500 W. As amostras foram colocadas a 20 cm da fonte de luz no gelo para evitar o aquecimento. Em seguida, os tubos foram submetidos à centrifugação (6000×g, 10 min), e os precipitados foram armazenados a -80 °C até a extração do DNA.

### **Extração de DNA**

O DNA genômico foi extraído de culturas bacterianas de *H. seropedicae* SmR1 usando o Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega™, Madison, WI, EUA) com modificações (PEREIRA *et al.*, 2014). O DNA total das raízes de milho foi isolado usando o protocolo hot CTAB (SUN, L. *et al.*, 2008) com modificações. Aproximadamente 200 mg de tecido foi usado para extração. Raízes não tratadas com PMA foram congeladas em nitrogênio líquido e moídas até um pó fino antes de serem transferidas para microtubos. As raízes pré-tratadas com PMA foram maceradas com solução salina conforme descrito anteriormente. Inicialmente, foi adicionado PVP 1,5% diretamente em um tubo tipo falcon contendo 100 mL de tampão CTAB (2% CTAB, 0,1 M Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 0,2 M EDTA dissódico), seguido de pré-aquecimento a 65 °C por 5 min. Em seguida, 4,5 µL de 2-mercaptoetanol e 4 µL de RNase foram adicionados diretamente ao tubo de amostra. Após, a solução foi incubada em banho termostático a 65 °C por 60 min. Cada extrato correspondeu a um pool de raízes de quatro plântulas. A concentração e a qualidade do DNA foram medidas em espectrofotômetro Thermo Scientific Nanodrop™ 2000

(Wilmington, DE, EUA) medindo-se a absorvância da amostra em 260 e 280 nm.

### **Quantificação por PCR em tempo real e construção de curvas padrão**

O par de iniciadores HERBAS1 espécie específico foi usado para amplificar especificamente um fragmento de 76 pb em uma região não codificadora do genoma de *H. seropedicae* SmR1 (PEREIRA *et al.*, 2014), as sequencias dos iniciadores foram as seguintes: 5'-TTTCGCGGTAGGCGATCA-3' e 5'-GAGCAATTGACCGGCAAGAC-3'. A PCR quantitativa em tempo real foi realizada no ABI PRISM 7500 Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações de amplificação continham 12,5 µL de 2× SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 100 nM do par de iniciadores HERBAS1, água e 10 ng de DNA molde em um volume final de 25 µL. As reações de qPCR foram realizadas em triplicata seguindo as condições de ciclagem: uma etapa inicial de incubação a 50 °C por 2 min, incubação a 95 °C por 10 min, seguido por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min. A análise da curva de *melting* foi realizada automaticamente por aquecimento contínuo de 60°C a 95°C. Todas as corridas de PCR em tempo real foram analisadas usando configurações automáticas de software. Para quantificar o DNA genômico em cultura pura de *H. seropedicae* SmR1, curvas padrão foram preparadas por diluição seriada. O DNA genômico foi diluído em série 10 vezes em água ultrapura até concentrações finais variando de 10<sup>6</sup> a 10<sup>0</sup> cópias de DNA, equivalentes a concentrações de 6,03 ng a 6,03 fg. O número de cópias do genoma foi calculado com base no tamanho do genoma de *H. seropedicae* SmR1 (5,51 Mbp) (PEDROSA *et al.*, 2011) conforme descrito anteriormente (PEREIRA *et al.*, 2014). Os valores de eficiência de amplificação foram calculados a partir da equação  $E = (10^{-1/s} - 1) \times 100$ , onde E é a eficiência (porcentagem) e s é a inclinação obtida da curva padrão. Limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e outros parâmetros de qPCR foram determinados conforme descrito anteriormente (KRALIK; RICCHI, 2017).



## **Enumeração de *H. seropedicae* SmR1 por qPCR e contagem em placa**

A estimativa da contagem bacteriana em UFC.mL<sup>-1</sup> da cultura pura de *H. seropedicae* estirpe SmR1 e das raízes de milho crescidos *in vitro*, por qPCR foram calculadas conforme descrito anteriormente (DA CUNHA *et al.*, 2020) com modificações. A contagem em placa da cultura pura de *H. seropedicae* e das raízes de milho foram determinadas pelo método *drop plate* em meio seletivo de ágar. Os dados foram expressos como número de UFC.mL<sup>-1</sup> (cultura) ou por grama (peso fresco) de raiz. Plântulas de milho cultivadas *in vitro* foram coletadas aleatoriamente 7 após a inoculação (DAI) para determinar a colonização radicular bacteriana. As raízes foram lavadas em água destilada autoclavada e 200 mg foram triturados em almofariz e pilão em 1 mL de solução salina 0,9%. Os homogenatos foram diluídos em série e semeados em meio de ágar seletivo para determinar UFC por grama de raiz fresca após 48 h de incubação a 30 °C (BALSANELLI *et al.*, 2010).

## **5.4. Resultados**

### **Ensaio preliminar de temperatura em cultura pura**

Quatro ensaios foram desenvolvidos para determinar a temperatura ideal para obtenção de células não viáveis após o tratamento térmico. As temperaturas testadas foram definidas com base no trabalho desenvolvido por Baldani *et al.* (1986). Neste estudo, os autores determinaram que a faixa de temperatura ideal para o crescimento da espécie *H. seropedicae* é de 20° a 38° C. A primeira temperatura testada foi de 38° C, que teve pouco efeito sobre a viabilidade celular de *H. seropedicae* (Figura 2A). A segunda temperatura testada foi de 45° C, que causou um leve declínio no crescimento de *H. seropedicae* SmR1 (Figura 2B). Essa temperatura, embora superior à faixa tolerada por essa espécie, ainda não foi capaz de causar danos acentuados às células bacterianas. Na temperatura de 52° C, houve uma queda brusca no crescimento (Figura 2B). Não houve crescimento bacteriano nos últimos tempos avaliados. Por esta razão, a temperatura de 48°C foi testada (Figura 2B). Houve uma diminuição no crescimento bacteriano, mas menos acentuada, então 48°C foi a temperatura utilizada no tratamento térmico.

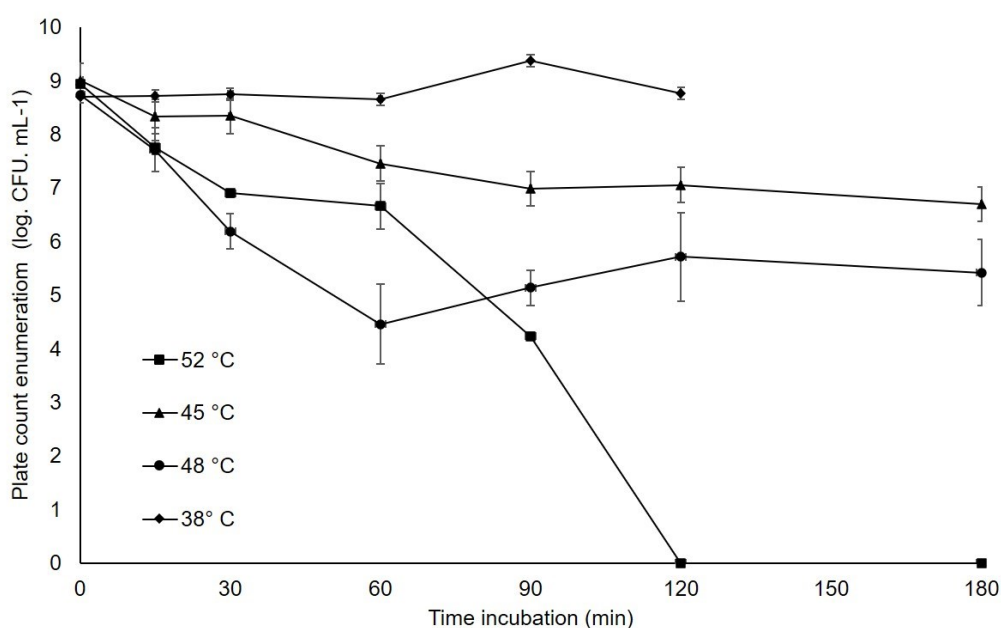


Figura 2 - Enumeração da bactéria *H. seropedicae* SmR1 (log UFC.mL<sup>-1</sup>) obtida por contagem em placa de amostras submetidas a tratamento térmico por diferentes períodos de tempo. Temperatura: 38°C (losangos); 45 °C (triângulos); 48 °C (círculos) 52 °C (quadrado). Os valores são a média ± DP de três réplicas biológicas (n = 3).

### Parâmetros de qPCR para quantificação de *H. seropedicae*

As curvas padrão foram preparadas usando reagentes SYBR Green e *primers* HERBAS1 para obter parâmetros de qPCR, como eficiência, inclinação e coeficiente de correlação ( $R^2$ ). Os valores de eficiência variaram de 86 a 99%, com declives variando de - 3,33 a - 3,69 (Tabela 1). Todas as curvas padrão apresentaram coeficientes de correlação linear entre 0,97 e 0,99. LOD e LOQ de qPCR usando amostras de cultura pura foram estabelecidos como número de  $10^1$  cópias do genoma correspondendo a 60,3 fg de DNA.

O desvio padrão de repetibilidade (%RSDr) dos números de cópias de DNA experimentais obtidos em dezoito reações de qPCR apresentou valores abaixo de 1,19%, e a acurácia avaliada pelo BIAS (%Bias) apresentou valores variando de -4 a 90% (Tabela 2).

Tabela 1 - Parâmetros da qPCR de curvas padrão para quantificação de *H. seropedicae* SmR1. O DNA foi extraído de *H. seropedicae* cultivado em meio de cultura.

Pure <i>H. seropedicae</i> culture			
qPCR run	Efficiency (%)	Slope	R <sup>2</sup>
1	99	-3.336	0.996
2	94	-3.470	0.984
3	98	-3.372	0.977
4	86	-3.696	0.999
5	88	-3.654	0.985
6	96	-3.432	0.997
Mean	93.5	-3.493	
SD	5.4	0.149	
CV (%)	5.7	4.253	

Tabela 2 - Repetibilidade do ensaio qPCR HERBAS1 usando diluições em série de DNA extraído de *H. seropedicae*.

True Copy number	DNA quantity (ng)	%RSDr <sup>a</sup>	Experimental copy number	Bias % <sup>b</sup>
10 <sup>6</sup>	6.03	0.99	1284237	28
10 <sup>5</sup>	0.603	0.92	110734	11
10 <sup>4</sup>	0.0603	0.49	10059	1
10 <sup>3</sup>	0.00603	0.88	960	-4
10 <sup>2</sup>	0.000603	0.71	90	-10
10 <sup>1</sup>	0.0000603	1.19	19	90

<sup>a</sup> Desvio padrão de repetibilidade relativa

<sup>b</sup> Desvio padrão BIAS

### **Eficiência do tratamento com PMA para quantificação de células viáveis de *H. seropedicae***

Com o objetivo de avaliar a eficiência do tratamento com PMA para inibir a amplificação de DNA de células mortas, alíquotas de cultura pura de *H. seropedicae* SmR1 foram submetidas a tratamento térmico a 48°C por zero a 180 minutos para obtenção de diferentes quantidades de células viáveis e não viáveis. As alíquotas foram tratadas ou não com PMA, o DNA foi extraído e submetido a qPCR e PMA-qPCR. As corridas de qPCR foram realizadas em dois dias diferentes. O número de cópias de DNA de cada amostra foi calculado e comparado entre as corridas de qPCR (Figura 3). O número de cópias de DNA foi menor em amostras submetidas a PMA-qPCR em comparação com amostras submetidas a q-PCR. Todas as amostras com e sem PMA apresentaram número de cópias de DNA semelhante, independente do tratamento térmico. Como esperado para PMA-qPCR, o número de células viáveis foi maior no tempo zero em relação aos demais tempos de tratamento térmico.

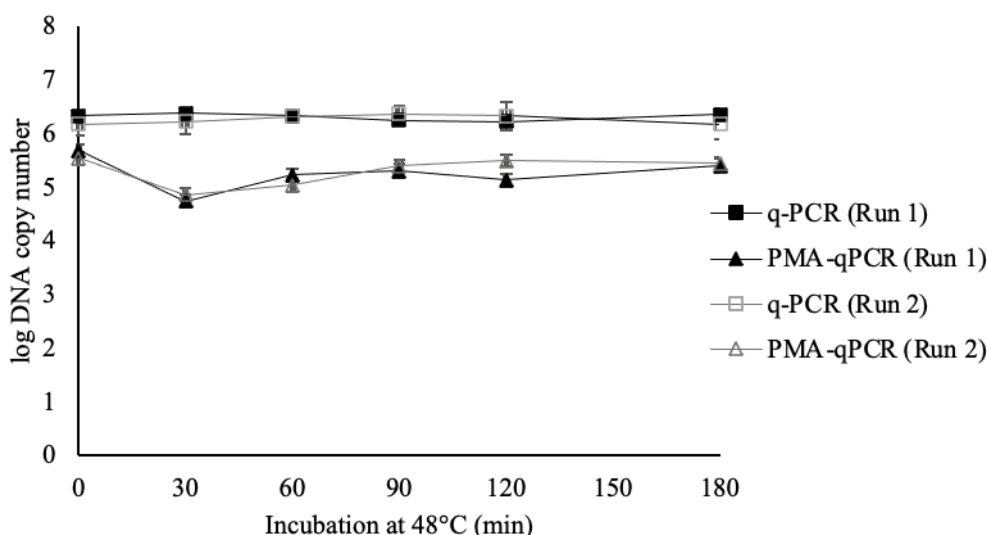


Figura 3 - Log número de cópias de DNA de *H. seropedicae* estirpe SmR1 estimado por qPCR (quadrado) e PMA-qPCR (triângulos) em duas corridas independentes. As culturas puras foram submetidas a tratamento térmico a 48°C por diferentes períodos de tempo. Os valores são a média  $\pm$  DP de quatro extratos de DNA (n = 3).

### Quantificação de células viáveis de *H. seropedicae* em amostras de cultura e raízes de milho tratadas termicamente

Células viáveis de *H. seropedicae* SmR1 em cultura pura tratada termicamente e raízes (controle e inoculadas) de milho cultivado *in vitro* foram quantificadas por contagem em placa, qPCR e qPCR associado a PMA (PMA-qPCR). O DNA foi extraído em triplicata para cada amostra de cultura tratada termicamente e submetido ao ensaio qPCR (Tabela 3). Utilizando os valores de Cq obtidos e a equação descritos anteriormente (ILHA *et al.*, 2016), a contagem de *H. seropedicae* SmR1 (log UFC.mL<sup>-1</sup>) foi feita por qPCR e PMA-qPCR (Tabela 3).

Tabela 3 - Comparação da contagem de *H. seropedicae* SmR1 (log CFU.mL<sup>-1</sup>) obtida por qPCR, PMA-qPCR e contagem em placa de culturas puras de bactéria tratadas termicamente (48 °C).

Sample	qPCR count <sup>a</sup> (log CFU.mL <sup>-1</sup> )	PMA-qPCR count <sup>a</sup> (log CFU.mL <sup>-1</sup> )	Plate count <sup>b</sup> (log CFU.mL <sup>-1</sup> )
0'	8.99 $\pm$ 0.12	7.83 $\pm$ 0.47	8.83 $\pm$ 0.03
30'	8.89 $\pm$ 0.21	6.02 $\pm$ 0.73	5.75 $\pm$ 0.35
60'	8.94 $\pm$ 0.16	6.30 $\pm$ 0.57	4.19 $\pm$ 0.26
90'	8.85 $\pm$ 0.35	6.50 $\pm$ 0.51	3.81 $\pm$ 0.23
120'	8.83 $\pm$ 0.09	6.59 $\pm$ 0.23	n.d.
180'	8.85 $\pm$ 0.16	6.51 $\pm$ 0.12	2.25 $\pm$ 0.30

<sup>a</sup> Os valores são a média  $\pm$  DP (n = 12), qPCR em triplica quatro corridas independentes.

<sup>b</sup> Os valores são a média  $\pm$  DP (n = 12) contagem em placa.

n.d. não detectado

O tratamento térmico teve pouco efeito nos valores de UFC nos tempos avaliados para qPCR. As contagens bacterianas em log UFC.mL<sup>-1</sup> foram obtidas por qPCR e PMA-qPCR (a partir dos valores de Cq obtidos e curvas padrão) e por contagem em placa (Tabela 3). A enumeração de *H. seropedicae* SmR1 por qPCR em amostras tratadas termicamente e raízes de milho foram maiores do que PMA-qPCR e contagem em placa. O valor de UFC.mL<sup>-1</sup> para PMA-qPCR variou de 10<sup>7</sup> no tempo zero a 10<sup>6</sup> nos demais tempos do tratamento térmico. Para qPCR, o valor UFC.mL<sup>-1</sup> permaneceu em 10<sup>8</sup>. Diferentes valores foram observados para contagem em placas. Os valores de UFC diminuíram de 10<sup>8</sup> para 10<sup>3</sup> até 90 minutos. Nenhuma contagem bacteriana foi observada em 120 minutos. No entanto, aos 180 minutos, o crescimento bacteriano foi retomado com uma contagem de 10<sup>2</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Embora nenhuma contagem bacteriana tenha sido observada em 120 minutos de tratamento térmico na contagem em placa, em PMA-qPCR, foi detectado 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> de *H. seropedicae*.

As raízes de milho coletadas sete dias após a inoculação apresentaram valores de UFC.g<sup>-1</sup> para qPCR de 6,12 ± 0,52 e PMA-qPCR de 3,73±0,17 utilizando curvas padrão de cultura pura. O DNA isolado das raízes de milho controle apresentou valores de UFC para qPCR de 2,70±0,04 e para PMA-qPCR de 2,25 ± 0,21 (Figura 4). A contagem em placa dos níveis de *H. seropedicae* em raízes de milho cultivadas *in vitro* foi maior (4,90 ± 0,63 log UFC.g<sup>-1</sup>) do que o estimado por PMA-qPCR usando curvas padrão de cultura pura.

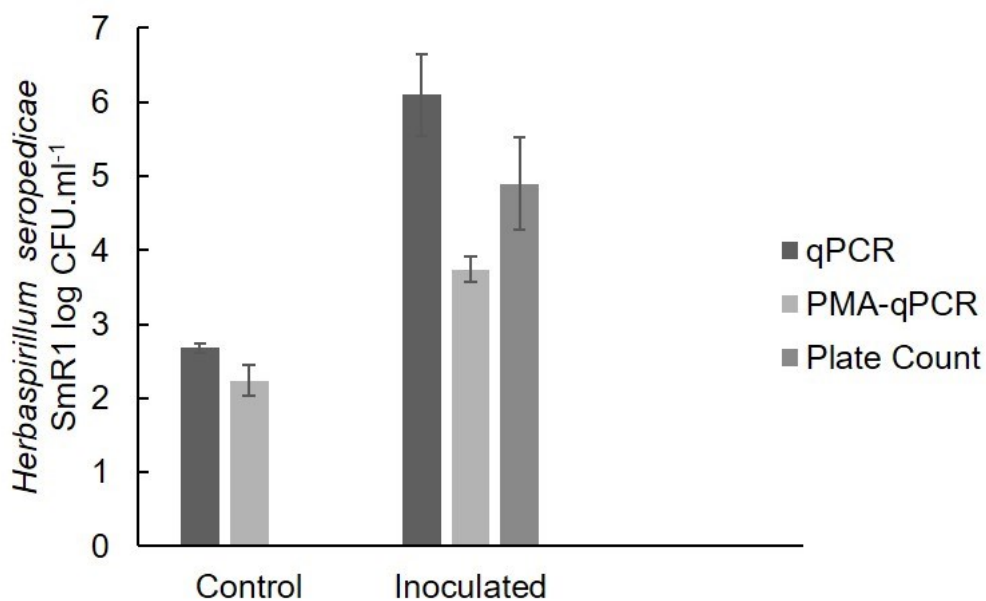


Figura 4 - Comparação da contagem de *H. seropedicae* SmR1 (log UFC.g<sup>-1</sup>) obtida por qPCR e PMA-qPCR de amostras de raízes de milho coletadas aos 7 dias. Cada barra representa os valores médios  $\pm$  DV (n = 3).

## 5.5. Discussão

A presença de um grande número de células viáveis no inoculante é um pré-requisito para que ocorra uma colonização satisfatória e para que efeitos benéficos sobre a planta sejam observados (BERNINGER *et al.*, 2018). Em relação à detecção e ao monitoramento bacteriano em inoculantes, métodos moleculares têm sido utilizados por serem rápidos e específicos (DALL'ASTA *et al.*, 2017). O uso de PMA associado à qPCR é uma técnica eficiente que vem sendo utilizada para diferenciar células viáveis e não viáveis em diferentes amostras (FITIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012). Esta abordagem tem sido amplamente utilizada para quantificar uma ampla gama de microrganismos, em diferentes matrizes (CRESPO-SEMPERE *et al.*, 2013; GENSBERGER *et al.*, 2014; TRUCHADO *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2013). Pesquisas desenvolvidas para quantificar microrganismos em plantas cultivadas de interesse econômico utilizaram corantes de viabilidade para quantificar microrganismos fitopatogênicos e microrganismos benéficos associadas a plantas (DA CUNHA *et al.*, 2020; MENG *et al.*, 2016; SOTO-MUÑOZ *et al.*, 2015; WANG; TURECHEK, 2020). Neste estudo, foi avaliada a aplicabilidade do método PMA-qPCR no monitoramento de células viáveis de *Herbaspirillum seropedicae* em culturas puras submetidas a temperatura de 52 °C e inoculadas em raízes

de milho. Os valores obtidos foram comparados com os determinados por qPCR e contagem em placa.

Com o intuito de quantificar de forma confiável o DNA de *H. seropedicae*, parâmetros de qPCR para ensaios SYBR Green foram definidos usando curvas padrão. O uso de uma curva padrão baseada em uma concentração de DNA conhecida torna teoricamente possível quantificar o DNA de qualquer fonte (TIMMUSK *et al.*, 2009). Considerando que uma curva padrão consistente deve ter um valor de  $R^2$  superior a 0,95 e uma inclinação entre -3,0 e -3,9 (correspondendo a eficiências de PCR de 80 e 115%) (KRÁLIK; RICCHI, 2017; ZHANG; FANG, 2006) todas as curvas apresentaram parâmetros de qPCR confiáveis (Tabela 1). Resultados semelhantes já foram observados em outros ensaios de qPCR usando o par de iniciadores HERBAS1 para quantificação *H. seropedicae* (DAL'LASTA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que as corridas de PCR (Tabela 2) apresentaram baixa variação, indicando um adequado grau de acurácia do ensaio. A repetibilidade de ensaios de qPCR é expressa como o desvio padrão de repetibilidade relativa (RSDr). Segundo Kralik; Richi (2017), na detecção microbiana clínica, veterinária e alimentar, não há recomendações específicas para o valor RSDr em termos de sua proporção em relação à média.

A acurácia também foi avaliada como o viés (BIAS) do valor médio experimental a partir do valor teórico (número de cópias verdadeiras) para cada amostra de DNA. O LOD (limite de detecção) fornece a sensibilidade dos experimentos de quantificação de qPCR, sendo definido como a menor concentração de DNA em uma amostra que pode ser detectada de forma confiável. Em ensaios de qPCR, LOD é a quantidade de DNA, na qual 95% das amostras positivas são detectadas (BUSTIN *et al.*, 2009). O ensaio qPCR desenvolvido neste trabalho garantiu a detecção confiável de quantidades de DNA de *H. seropedicae* SmR1 variando de  $10^6$  cópias do genoma (6,03 ng) a  $10^1$  cópias do genoma (60,3 fg). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos anteriores de quantificação de *H. seropedicae* por qPCR (DALL'ASTA *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2014).

Este trabalho avaliou o desempenho do corante PMA antes da qPCR usando DNA extraído de culturas puras de *H. seropedicae* SmR1 incubadas por diferentes períodos em temperaturas acima das ideais de crescimento seguindo Scariot *et al.* (2018). Metodologia semelhante foi empregada para quantificar células viáveis de *A. brasilense* e determinar o número de células inviáveis obtidas por tratamento térmico (DA CUNHA *et al.*, 2020). Nesse estudo, o corante PMA conseguiu diferenciar entre células viáveis e não viáveis, uma vez que foram observadas diferenças entre as contagens de UFC obtidas por qPCR e PMA-qPCR (Tabela 3). As diferenças observadas mostram que o ensaio qPCR detectou DNA total, enquanto o PMA-qPCR detectou DNA de células com membrana intacta. Essa diferença pode ser explicada porque a qPCR parece quantificar o DNA total, incluindo células mortas, enquanto a PMA-qPCR quantifica apenas o DNA de células viáveis.

Nas amostras oriundas do tratamento térmico, a contagem de *H. seropedicae* por plaqueamento reduziu de 8 para 3 log UFC.mL<sup>-1</sup> de zero até 90 minutos, não foi observada contagem bacteriana em 120 minutos. Aos 180 minutos, o crescimento bacteriano foi retomado com uma contagem de 2 log UFC (Tabela 3). Embora a contagem em placa tenha diminuído com o tempo de exposição ao tratamento térmico, a contagem por PMA-qPCR variou de 7 a 6 log UFC.mL<sup>-1</sup>. Comportamento semelhante foi observado na quantificação de células viáveis de *Pantoea agglomerans*. Após a secagem por pulverização, os números de células obtidos por PMA-qPCR (avaliação de células intactas) foram duas ordens de grandeza superiores aos obtidos por contagem em placa (SOTO-MUÑOZ *et al.*, 2015). Isso indica que uma perda de culturabilidade não coincide necessariamente com danos na membrana. Este comportamento celular pode ser explicado devido à indução do estado viável, mas não cultivável (VNC), uma resposta adaptativa das células frente às condições adversas. As células no estado VNC não podem formar colônias ou manter sua reprodução, mas continuam com a membrana intacta (BERGKESSEL; BASTA; NEWMAN, 2016; PINTO; SANTOS; CHAMBEL, 2015). A condição de não-culturabilidade é um processo reversível. O funcionamento celular é retomado quando o ambiente volta a condições favoráveis ou se as células forem capazes de se adaptar a condição estressante (CHIU; CHEN; WONG, 2008; OLIVER, 2010).



A eficiência do tratamento com PMA foi avaliada na presença de matriz. Nesse sentido, raízes de milho inoculadas com *H. seropedicae*, cultivadas *in vitro* e colhidas 7 DAI foram quantificadas por qPCR após tratamento com PMA. Comparando a enumeração bacteriana das células viáveis, foi possível observar que a quantificação por PMA-qPCR foi aproximadamente duas vezes menor que por qPCR (Figura 4).

Métodos confiáveis, de alto rendimento e econômicos para determinar a viabilidade bacteriana em inoculantes são necessários para facilitar a triagem de uma ampla gama de parâmetros de processamento. PMA associado a qPCR é uma abordagem poderosa em comparação com métodos dependentes de cultivo para quantificar células viáveis (TANTIKACHORNKIAT *et al.*, 2016). A principal vantagem do PMA-qPCR é que ele permite uma quantificação fácil, simples e mais precisa. O ensaio de PMA-qPCR já foi proposto para quantificar bactérias promotoras de crescimento de plantas em raízes de milho e cultura pura, mas até onde sabemos, um ensaio de PMA-qPCR para quantificação de células viáveis de *H. seropedicae* ainda não foi desenvolvido. Os resultados deste estudo, mostraram que esta abordagem molecular permite estimar a quantificação de células viáveis de *H. seropedicae* em culturas puras e amostras de raízes de milho.

## 6. Considerações Finais

Os mecanismos moleculares de reconhecimento, colonização e troca de nutrientes entre plantas e BPCV ainda estão longe de serem totalmente conhecidos. Entretanto, estudos recentes envolvendo sequenciamento de genomas de BPCV possibilitaram avanços na compreensão desses sistemas. O sequenciamento e a análise genômica comparativa de espécies de *Herbaspirillum* com diferentes características metabólicas podem ajudar a compreender os mecanismos de interação com a planta, a encontrar o potencial biotecnológico de cada estirpe, a compreender a evolução do grupo e a aprimorar a classificação taxonômica dentro do gênero. As análises de genômica comparativa e investigação da distribuição dos genes de fixação biológica de nitrogênio dentro do gênero *Herbaspirillum* realizadas no presente estudo permitiram inferir a origem dos genes *nif* e avaliar a diversidade e a conservação de genes dentro do gênero. A distribuição e origem dos genes *nif* podem ser explorados em outros gêneros de bactérias promotoras de crescimento vegetal, expandindo assim o conhecimento sobre o assunto. A execução das atividades referentes a este capítulo proporcionou a inserção de análises *in silico* no Laboratório de Biologia Molecular, bem como o estabelecimento de parcerias.

As BPCV oferecem uma alternativa eficaz ao uso de fertilizantes químicos, contribuindo para o aumento da produção agrícola de forma sustentável. Entre estas bactérias, destaca-se o gênero *Herbaspirillum*, que engloba espécies com capacidade de se associarem com gramíneas. No entanto, sabe-se que apesar da comprovada vantagem da utilização de inoculantes, existe uma grande dificuldade na sua fabricação que mantenham sua viabilidade após aplicação no campo. A viabilidade de inoculantes pode ser afetada em diferentes estágios, antes, durante e após aplicação ao ser exposto a condições ambientais adversas. Sendo assim, é importante o desenvolvimento de técnicas capazes de mensurar e enumerar de forma precisa e rápida, o número de células viáveis em inoculantes e em plantas colonizadas. Com base nestas informações, a realização deste estudo propôs o desenvolvimento da metodologia já amplamente utilizada para

monitoramento de viabilidade celular de diversas espécies de microrganismos, através do uso do corante de viabilidade monoazida de propídeo (PMA) aliado à qPCR. Foram realizados ensaios de PMA-qPCR para monitoramento de *Herbaspirillum seropedicae* em culturas puras submetidas à tratamento térmico e em raízes de milho crescidas *in vitro*. O presente estudo serve como base para realização de trabalhos futuros com outras estirpes/espécies de BPCV entre outros inoculantes, e com outras culturas de plantas com as quais estas bactérias fazem associação.

## 7. Referências

ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Allow Reduced Application Rates of Chemical Fertilizers. **PLANT MICROBE INTERACTIONS**, 2009. v. 58, n. 4, p. 921–929.

AL-AWADHI, H. *et al.* Bias problems in culture-independent analysis of environmental bacterial communities: A representative study on hydrocarbonoclastic bacteria. **SpringerPlus**, 2013. v. 2, n. 1, p. 1–11.

AL-DAOUD, F. *et al.* Propidium Monoazide Improves Quantification of Resting Spores of *Plasmodiophora brassicae* with qPCR. **Plant Disease**, 2016. v. 101, n. 3, p. 442–447.

ALBERTON, D. *et al.* Comparative proteomics analysis of the rice roots colonized by *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 reveals induction of the methionine recycling in the plant host. **Journal of Proteome Research**, 2013. v. 12, n. 11, p. 4757–4768.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, 1990. v. 215, n. 3, p. 403–410.

ALVES, G. C. *et al.* Agronomic evaluation of *Herbaspirillum seropedicae* strain ZAE94 as an inoculant to improve maize yield in Brazil. **Pedosphere**, ago. 2021. v. 31, n. 4, p. 583–595.

ALVES, G. C. *et al.* Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant Soil**, 2015. v. 387, p. 307–321.

AMARAL, F. P. DO *et al.* Differential growth responses of *Brachypodium distachyon* genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. **Plant Molecular Biology**, 2016. v. 90, n. 6, p. 689–697.

AMARAL, F. P. DO *et al.* Gene expression analysis of maize seedlings (DKB240 variety) inoculated with plant growth promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **Symbiosis**, 7 jan. 2014. v. 62, n. 1, p. 41–50.

ANANDHAM, R. *et al.* *Paraherbaspirillum soli* gen. nov., sp. nov. isolated from soil. **Journal of Microbiology**, 2013. v. 51, n. 2, p. 262–267.

ANDERSEN, C. B. *et al.* Equal performance of TaqMan, MGB, molecular beacon, and SYBR green-based detection assays in detection and quantification of roundup ready soybean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006. v. 54, n. 26, p. 9658–9663.

ANDREOZZI, A. *et al.* Efficient colonization of the endophytes *Herbaspirillum*

*huttiense* RCA24 and *Enterobacter cloacae* RCA25 influences the physiological parameters of *Oryza sativa* L. cv. Baldo rice. **Environmental Microbiology**, 2019. v. 21, n. 9, p. 3489–3504.

ANPII. Associação Nacional de Produtores e Importadores de Inoculantes. Disponível em: <<http://www.anpii.org.br/estatisticas/>>. Acesso em: em outubro de 2022.

ARAÚJO, A. E. Da S. *et al.* Response of traditional upland rice varieties to inoculation with selected diazotrophic bacteria isolated from rice cropped at the Northeast region of Brazil. **Applied Soil Ecology**, 2013. v. 64, p. 49–55.

ARORA, N. K.; KHARE, E.; MAHESHWARI, D. K. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. *In*: MAHESHWARI, D. K. (Org.). **Microbiology Monographs**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011, V. 18, p. 97–116.

BALDANI, J. I. *et al.* Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 1996. v. 46, n. 3, p. 802–810.

BALDANI, J. I. *et al.* Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY**, 1986. v. 36, n. 1, p. 86–93.

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**, 2005. v. 77, n. 3, p. 549–579.

BALDANI, J. I. *et al.* The Family Oxalobacteraceae. *In*: SCHMID, M.; HARTMANN, Anton (Org.). **The Prokaryotes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, p. 919–974.

BASHAN, Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. **Biotechnology Advances**, 1998. v. 16, n. 4, p. 729–770.

BASU, A. *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria (Pgpr) as green bioinoculants: Recent developments, constraints, and prospects. **Sustainability (Switzerland)**, 2021. v. 13, n. 3, p. 1–20.

BARROS, J. F. C.; CALADO, J. G. A cultura do milho. 2014.

BERGKESSEL, M.; BASTA, D. W.; NEWMAN, D. K. The physiology of growth arrest: Uniting molecular and environmental microbiology. **Nature Reviews Microbiology**, 2016. v. 14, n. 9, p. 549–562.

BERNINGER, T. *et al.* Maintenance and assessment of cell viability in formulation of non-sporulating bacterial inoculants. **Microbial Biotechnology**,

2018. v. 11, n. 2, p. 277–301.

BRAISSANT, O.; BACHMANN, A.; BONKAT, G. Microcalorimetric assays for measuring cell growth and metabolic activity: Methodology and applications. **Methods**, 2015. v. 76, p. 27–34.

BREDA, F. A. Da 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**, 2016. v. 51, n. 1, p. 45–52.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C. *et al.* Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, 2012. v. 356, n. 1–2, p. 113–125.

BRYNILDSDRUD, O. *et al.* Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with Scoary. **Genome Biology**, 2016. v. 17, n. 1, p. 1–9.

CAMARGO, M. N. *et al.* classificação brasileira de latossolos. In: Oficina internacional de classificação de solos: classificação, caracterização e utilização de latossolos, EMBRAPA, Rio de Janeiro, Brasil, 1988, p. 190–202.

CANGELOSI, G. A.; MESCHKE, J. S. Dead or Alive: Molecular Assessment of Microbial Viability. **Applied and Environmental Microbiology**, 2014. v. 80, n. 19, p. 5884–5891.

CAPUTO, A.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Genome and pan-genome analysis to classify emerging bacteria. **Biology Direct**, 2019. v. 14, n. 1, p. 1–9.

CARDOSO, R.L.A. **Análise Genômica Comparativa de Bactérias do Gênero *Herbaspirillum***. 163 f. Tese (Doutorado em Ciências Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

CARDOSO, R.L.A. **Montagem Genômica da Bactéria Endofítica Diazotrófica *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1**. 109 f. Dissertação (Mestrado em Bioinformática) – Setor de Educação Profissional e Tecnológica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

CARRO, L. *et al.* *Herbaspirillum canariense* sp. nov., *Herbaspirillum aurantiacum* sp. nov. and *Herbaspirillum soli* sp. nov., isolated from volcanic mountain soil, and emended description of the genus *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2012. v. 62, n. 6, p. 1300–1306.

CARVALHO, T. L. G. *et al.* Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, 2014. v. 65, n. 19, p. 5631–5642.

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**, 2016. v. 90, n. 6, p. 561–574.

CHAI, A. L. *et al.* Quantification of Viable Cells of *Pseudomonas syringae* pv. tomato in Tomato Seed Using Propidium Monoazide and a Real-Time PCR Assay. **Plant Disease**, 2020. v. 104, n. 8, p. 2225–2232.

CHAUDHARI, N. M.; GUPTA, V. K.; DUTTA, C. BPGA-an ultra-fast pan-genome analysis pipeline. **Scientific Reports**, 2016. v. 6, n. March, p. 1–10.

CHIU, S. W.; CHEN, S. Y.; WONG, H. C. Localization and expression of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* under different stresses. **Applied and Environmental Microbiology**, 2008. v. 74, n. 22, p. 7016–7022.

CHUBATSU, Leda Satie *et al.* Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, 2012. v. 356, n. 1–2, p. 197–207.

COCOLIN, L. *et al.* Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, 2013. v. 167, n. 1, p. 29–43.

CODONY, F.; AGUSTÍ, G.; ALLUÉ-GUARDIA, A. Cell membrane integrity and distinguishing between metabolically active and inactive cells as a means of improving viability PCR. **Molecular and Cellular Probes**, 2015. v. 29, n. 3, p. 190–192.

Core Team (2021). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

CORTÉS-PATIÑO, S. *et al.* Potential of *Herbaspirillum* and *Azospirillum* consortium to promote growth of perennial ryegrass under water deficit. **Microorganisms**, 2021. v. 9, n. 1, p. 1–16.

COUILLEROT, O. *et al.* Soil Biology & Biochemistry Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology & Biochemistry**, 2010. v. 42, n. 12, p. 2298–2305.

DA CUNHA, E. T. *et al.* *Azospirillum brasilense* viable cells enumeration using propidium monoazide-quantitative PCR. **Archives of Microbiology**, 2020. v. 202, n. 7, p. 1653–1662.

CURÁ, A. *et al.* Inoculation with *Azospirillum* sp. and *Herbaspirillum* sp. Bacteria Increases the Tolerance of Maize to Drought Stress. **Microorganisms**, 2017. v. 5, n. 41, p. 1–16.

DALL'ASTA, P. *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* promotes maize growth but fails to control the maize leaf anthracnose. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 2019. v. 25, n. 1, p. 167–176.

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**, 2017. v. 83, n. 3, p. 397–408.

DARANAS, N. *et al.* Monitoring Viable Cells of the Biological Control Agent *Lactobacillus plantarum* PM411 in Aerial Plant Surfaces by Means of a Strain-Specific Viability Quantitative PCR Method. **Applied and Environmental Microbiology**, 2018. v. 84, n. 10, p. 1–18.

DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of [*Pseudomonas*] *huttiensis*, [*P.*] *lanceolata*, [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *delicatum* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum* as *H. huttiense* comb. nov., *C. lanceolatus* comb. nov., *C. delicatus* comb. nov. and *H. autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2004. v. 54, n. 6, p. 2223–2230.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, 2004. v. 2, n. 8, p. 621–631.

DOBRIŤSA, A. P.; REDDY, M. C. S.; SAMADPOUR, M. Reclassification of *Herbaspirillum putei* as a later heterotypic synonym of *Herbaspirillum huttiense*, with the description of *H. huttiense* subsp. *huttiense* subsp. nov. and *H. huttiense* subsp. *putei* subsp. nov., comb. nov., and description of *Herbaspirillum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2010. v. 60, n. 6, p. 1418–1426.

EDGAR, R. C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, 2004. v. 32, n. 5, p. 1792–1797.

ELIZAQUÍVEL, P.; SÁNCHEZ, G.; AZNAR, R. Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. **Food Control**, 2012. v. 25, n. 2, p. 704–708.

EMMS, D. M.; KELLY, S. OrthoFinder: Phylogenetic orthology inference for comparative genomics. **Genome Biology**, 2019. v. 20, n. 1, p. 1–14.

ESPINDULA, E. *et al.* *Azospirillum brasilense* FP2 modulates respiratory burst oxidase gene expression in maize seedlings. **Indian Journal of Plant Physiology**, 2017. v. 22, p. 316–323.

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**, 2013. v. 61, p. 125–133.

FAN, M. C. *et al.* *Herbaspirillum robiniae* sp. nov., isolated from root nodules of *Robinia pseudoacacia* in a lead-zinc mine. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2018. v. 68, n. 4, p. 1300–1306.



FAORO, H. *et al.* The oil-contaminated soil diazotroph *Azoarcus olearius* DQS-4T is genetically and phenotypically similar to the model grass endophyte *Azoarcus* sp. BH72. **Environmental Microbiology Reports**, 2017. v. 9, n. 3, p. 223–238.

FAORO, H. *et al.* Genome comparison between clinical and environmental strains of *Herbaspirillum seropedicae* reveals a potential new emerging bacterium adapted to human hosts. **BMC Genomics**, 2019. v. 20, n. 1, p. 1–15.

FERRARI, C. S. *et al.* Expressed Proteins of *Herbaspirillum seropedicae* in Maize (DKB240) Roots-Bacteria Interaction Revealed Using Proteomics. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2014. v. 174, p. 2267–2277.

FERREIRA, C. M. H.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Promising bacterial genera for agricultural practices: An insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. **Science of the Total Environment**, 2019. v. 682, p. 779–799.

FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of Microbiological Methods**, 2012. v. 91, n. 2, p. 276–289.

FODDAI, A. C. G.; GRANT, I. R. Methods for detection of viable foodborne pathogens: current state-of-art and future prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2020. v. 104, n. 10, p. 4281–4288.

FREEMAN, W. M.; WALKER, S. J.; VRANA, K. E. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and Potential. **BioTechniques**, 1999. v. 26, n. 1, p. 112–125.

GALISA, P. S. *et al.* Identification and validation of reference genes to study the gene expression in *Gluconacetobacter diazotrophicus* grown in different carbon sources using RT-qPCR. **Journal of Microbiological Methods**, 2012. v. 91, n. 1, p. 1–7.

GAO, R. *et al.* The diagnostic tools for viable but nonculturable pathogens in the food industry: Current status and future prospects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2021. v. 20, n. 2, p. 2146–2175.

GARCÍA-CAÑAS, V.; CIFUENTES, A.; GONZÁLEZ, R. Detection of Genetically Modified Organisms in Foods by DNA Amplification Techniques. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, nov. 2004. v. 44, n. 6, p. 425–436.

GIRAFFA, G.; NEVIANI, E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. **International Journal of Food Microbiology**, 2001. v. 67, n. 1–2, p. 19–34.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, 2012. v. 2012, p. 1–15.

GLOBAL BIOFERTILIZERS MARKET - GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECASTS (2021 - 2026) Disponível online em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biofertilizers-market-industry> (acessado em outubro 2022).

GUPTA, G. *et al.* Microbial & Biochemical Technology Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Current and Future Prospects for Development of Sustainable Agriculture. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, 2015. v. 7, n. 2, p. 96–102.

GUT, M. *et al.* One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses. **Journal of Virological Methods**, 1999. v. 77, n. 1, p. 37–46.

HALE, C. N.; WILKIE, J. P. A comparative study of *Pseudomonas* species pathogenic to sorghum. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, 1972. v. 15, n. 3, p. 448–456.

HAN, S. *et al.* Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in viable but nonculturable state from tomato seed using improved qPCR. **PLoS ONE**, 2018. v. 13, n. 5, p. 1–12.

HOGG, J. S. *et al.* Characterization and modeling of the *Haemophilus influenzae* core and supragenomes based on the complete genomic sequences of Rd and 12 clinical nontypeable strains. **Genome Biology**, 2007. v. 8, n. 6.

HUNGRIA, M. *et al.* Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant So**, 2010. v. 331, p. 413–425.

IM, W. T. *et al.* *Herbaspirillum chlorophenicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2004. v. 54, n. 3, p. 851–855.

INGLIN, R. C.; MEILE, L.; STEVENS, M. J. A. Clustering of Pan- and Core-genome of *Lactobacillus* provides Novel Evolutionary Insights for Differentiation. **BMC Genomics**, 2018. v. 19, n. 1, p. 1–15.

Inkscape 1.0.2-2, 2021.

INTERNATIONAL FERTILIZER ASSOCIATION (IFA). Fertilizer Outlook 2020-2024. **Market Intelligence and Agriculture Services**, 2020.

JAIN, C. *et al.* High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. **Nature Communications**, 2018. v. 9, n. 1, p. 1–8.

JAMES, E. K. *et al.* *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, 1997. v. 48, n. 308, p. 785–797.

JUNG, S. Y. *et al.* *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. *platyphyllum*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2007. v. 57, n. 10, p. 2284–2288.

KATOH, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, 2013. v. 30, n. 4, p. 772–780.

KIM, D.; PARK, S.; CHUN, J. Introducing EzAAL: a pipeline for high throughput calculations of prokaryotic average amino acid identity. **Journal of Microbiology**, 2021. v. 59, n. 5, p. 476–480.

KIRCHHOF, G. *et al.* *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2001. v. 51, n. 1, p. 157–168.

KOIRALA, A.; BRÖZEL, V. S. Phylogeny of nitrogenase structural and assembly components reveals new insights into the origin and distribution of nitrogen fixation across bacteria and archaea. **Microorganisms**, 2021. v. 9, n. 8.

KOJIMA, H. *et al.* *Sulfurimicrobium lacus* gen. nov., sp. nov., a sulfur oxidizer isolated from lake water, and review of the family Sulfuricellaceae to show that it is not a later synonym of Gallionellaceae. **Archives of Microbiology**, 2021. v. 203, n. 1, p. 317–323.

KONSTANTINIDIS, K. T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006. v. 72, n. 11, p. 7286–7293.

KUMAR, R.; BRÖMS, J. E.; SJÖSTEDT, A. Exploring the Diversity Within the Genus *Francisella* – An Integrated Pan-Genome and Genome-Mining Approach. **Frontiers in Microbiology**, 2020. v. 11, n. August.

LAWRENCE, C. J. *et al.* Maize GDB: The Maize Model Organism Database for Basic, Translational, and Applied Research. **International Journal of Plant Genomics**, 2008. v. 2008, p. 1–10.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. **Nucleic Acids Research**, 2019. v. 47, n. W1, p. 256–259.

LI, W. *et al.* RefSeq: Expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation. **Nucleic Acids Research**, 2021. v. 49, n. D1, p. D1020–D1028.

LIN, S. Y. *et al.* Description of *Noviherbaspirillum malthae* gen. nov., sp. nov., isolated from an oil-contaminated soil, and proposal to reclassify *Herbaspirillum soli*, *Herbaspirillum aurantiacum*, *Herbaspirillum canariense* and *Herbaspirillum psychrotolerans* as *Noviherbaspirillum soli* comb. nov., *Noviherbaspirillum*

*aurantiacum* comb. nov., *Noviherbaspirillum canariense* comb. nov. and *Noviherbaspirillum psychrotolerans* comb. nov. based on polyphasic analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2013. v. 63, n. PART 11, p. 4100–4107.

LIU, C. *et al.* Septicemia caused by *Herbaspirillum huttiense* secondary to pneumonia. **Annals of Laboratory Medicine**, 2020. v. 39, n. 3, p. 340–342.

MACHADO, H.; GRAM, L. Comparative genomics reveals high genomic diversity in the genus *Photobacterium*. **Frontiers in Microbiology**, 2017. v. 8, n. JUN, p. 1–14.

MAHANTY, T.; BHATTACHARJEE, S.; GOSWAMI, M. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. **Environmental Science and Pollution Research**, 2016. v. 24, n. 4, p. 3315–3335

MAISTRENKO, O. M. *et al.* Disentangling the impact of environmental and phylogenetic constraints on prokaryotic within-species diversity. **ISME Journal**, 2020. v. 14, n. 5, p. 1247–1259.

MANNI, M. *et al.* BUSCO Update: Novel and Streamlined Workflows along with Broader and Deeper Phylogenetic Coverage for Scoring of Eukaryotic, Prokaryotic, and Viral Genomes. **Molecular Biology and Evolution**, 2021. v. 38, n. 10, p. 4647–4654.

MAPA. **Instrução Normativa SDA N° 13 de 24 de março de 2011**, 2011.

MATSON, A. L. *et al.* Free-living nitrogen fixation responds to elevated nutrient inputs in tropical montane forest floor and canopy soils of southern Ecuador. **Biogeochemistry**, 2015. v. 122, n. 2–3, p. 281–294.

MATSUOKA, Y. *et al.* A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2002. v. 99, n. 9, p. 6080–6084.

MEHNAZ, S. *Azospirillum*: a biofertilizer for every crop. In: (Ed.). **Plant microbes symbiosis: Applied facets**: Springer, 2015. p.297-314.

MENG, X. *et al.* Rapid detection and quantification of viable *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* cells in contaminated cucumber seeds using propidium monoazide and a real-time PCR assay. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 2016. v. 38, n. 3, p. 296–306.

MENGUER, P. K.; SPEROTTO, R. A.; RICACHENEVSKY, F. K. A walk on the wild side: *Oryza* species as source for rice abiotic stress tolerance. **Genetics and Molecular Biology**, 2017. v. 40, n. 1, p. 238–252.

MINH, B. Q. *et al.* IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. **Molecular Biology and Evolution**, 2020. v. 37, n. 5, p. 1530–1534.

MONTEIRO, R. A. *et al.* Genomic comparison of the endophyte *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 and the phytopathogen *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1 by suppressive subtractive hybridization and partial genome sequencing. **FEMS Microbiology Ecology**, abr. 2012. v. 80, n. 2, p. 441–451a.

MONTEIRO, R. A. *et al.* *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, 4 jul. 2012. v. 356, n. 1–2, p. 175–196b.

MONTEIRO, R. A. *et al.* Comparative Genomics of *Herbaspirillum* Species. In: KATSY, E. I. (Org.). **Plasticity in Plant-Growth-Promoting and Phytopathogenic Bacteria**. New York, NY: Springer New York, 2014, p. 171–198.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, 1990. v. 262, n. 4, p. 56–65.

NAVARRO, E. *et al.* Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, 2015. v. 439, p. 231–250.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. **Applied and Environmental Microbiology**, 2006. v. 72, n. 3, p. 1997–2004.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. **FEMS Microbiology Letters**, 2009. v. 291, n. 2, p. 137–142.

NOGVA, H. K. *et al.* Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-Nuclease PCR. **BioTechniques**, 2003. v. 34, n. 4, p. 804–813.

O'CALLAGHAN, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2016. v. 100, n. 13, p. 5729–5746.

OLDROYD, G. E. D. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. **Nature Reviews Microbiology**, 2013. v. 11, n. 4, p. 252–263.

OLEŃSKA, E. *et al.* Beneficial features of plant growth-promoting rhizobacteria for improving plant growth and health in challenging conditions: A methodical review. **Science of the Total Environment**, 2020. v. 743.

OLIVARES, F. L. *et al.* Infection of mottled stripe disease-susceptible and resistant sugar cane varieties by the endophytic diazotroph *Herbaspirillum*. **New Phytologist**, 1997. v. 135, n. 4, p. 723–737.

OLIVARES, F. L. *et al.* Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, 1996. v. 21, n. 3, p. 197–200.

OLIVARES, F. L. *et al.* Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, 8 dez. 2017. v. 4, n. 1, p. 30.

OLIVEIRA, A. L. M. DE *et al.* Yield of micro propagated sugarcane varieties in different soil types following inoculation with diazotrophic bacteria. **Plant and Soil**, 2006. v. 284, n. 1–2, p. 23–32.

OLIVEIRA, W. K. *et al.* High genomic identity between clinical and environmental strains of *Herbaspirillum frisingense* suggests pre-adaptation to different hosts and intrinsic resistance to multiple drugs. **Antibiotics**, 2021. v. 10, n. 11.

OLIVER, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, 2010. v. 34, n. 4, p. 415–425.

OWEN, D. *et al.* Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. **Applied Soil Ecology**, 2015. v. 86, p. 41–54.

PAGE, A. J. *et al.* Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. **Bioinformatics**, 2015. v. 31, n. 22, p. 3691–3693.

PALMER, M. *et al.* Genome-Based Characterization of Biological Processes That Differentiate Closely Related Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, 6 fev. 2018. v. 9, n. FEB, p. 1–23.

PARADIS, E.; CLAUDE, J.; STRIMMER, K. APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. **Bioinformatics**, 2004. v. 20, n. 2, p. 289–290.

PATIL, P. P. *et al.* Genome sequence of type strains of genus *Stenotrophomonas*. **Frontiers in Microbiology**, 2016. v. 7, n. MAR.

PECHANOVA, O. *et al.* Maize proteomics: An insight into the biology of an important cereal crop. **Proteomics**, 2013. v. 13, n. 3–4, p. 637–662.

PEDROSA, F. O. *et al.* Genome of *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. **PLoS Genetics**, 2011. v. 7, n. 5.

PEREIRA, T. P. *et al.* Real-Time PCR Quantification of the Plant Growth Promoting Bacteria *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1 in Maize Roots. **Molecular Biotechnology**, 22 fev. 2014. p. 660–670.

**pheatmap 1.0.12** disponível em:

<https://cran.rproject.org/web/packages/pheatmap/index.html>

PINTO, D.; SANTOS, M. A.; CHAMBEL, L. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. **Critical Reviews in Microbiology**, 2015. v. 41, n. 1, p. 61–76.

PRICE, M. N.; DEHAL, P. S.; ARKIN, A. P. FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. **PLoS ONE**, 2010. v. 5, n. 3.

PRITCHARD, L. *et al.* Genomics and taxonomy in diagnostics for food security: Soft-rotting enterobacterial plant pathogens. **Analytical Methods**, 2016. v. 8, n. 1, p. 12–24.

QIN, Q. L. *et al.* A proposed genus boundary for the prokaryotes based on genomic insights. **Journal of Bacteriology**, 2014. v. 196, n. 12, p. 2210–2215.

RAEYMAEKERS, L. Basic Principles of Quantitative PCR. **Molecular Biotechnology**, 2000. v. 15, p. 115–122.

RAITZ, R. T. *et al.* Article comparative genomics provides insights into the taxonomy of *Azoarcus* and reveals separate origins of *nif* genes in the proposed *Azoarcus* and *Aromatoleum* genera. **Genes**, 2021. v. 12, n. 1, p. 1–21.

RAMAKRISHNA, W.; YADAV, R.; LI, K. Plant growth promoting bacteria in agriculture: Two sides of a coin. **Applied Soil Ecology**, 2019. v. 138, n. February, p. 10–18.

REGUNATH, H. *et al.* Severe community-acquired pneumonia with bacteremia caused by *Herbaspirillum aquaticum* or *Herbaspirillum huttiense* in an immune-competent adult. **Journal of Clinical Microbiology**, 2015. v. 53, n. 9, p. 3086–3088.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: Bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, 2011. v. 14, n. 4, p. 435–443.

REIS, S. *et al.* Influência do meio de cultura na germinação de sementes in vitro e taxa de multiplicação de *Melissa officinalis* L. **Revista Ceres**, 2008. v. 55, n. 3, p. 160–167.

REMIGI, P. *et al.* Symbiosis within Symbiosis: Evolving Nitrogen-Fixing Legume Symbionts. **Trends in Microbiology**, 2016. v. 24, n. 1, p. 63–75.

RONCATO-MACCARI, L. D. *et al.* Endophytic *Herbaspirillum seropedicae* expresses *nif* genes in gramineous plants. **FEMS Microbiology Ecology**, jul. 2003. v. 45, n. 1, p. 39–47.

ROTHBALLER, M. *et al.* *Herbaspirillum hiltneri* sp. nov., isolated from surface-sterilized wheat roots. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2006. v. 56, n. 6, p. 1341–1348.

ROTHBALLER, M. *et al.* Endophytic root colonization of gramineous plants by *Herbaspirillum frisingense*. **FEMS Microbiology Ecology**, 2008. v. 66, n. 1, p. 85–95.

SALEEM, M. *et al.* Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2007. v. 34, n. 10, p. 635–648.

SANTOS, P. C. DOS *et al.* Distribution of nitrogen fixation and nitrogenase-like sequences amongst microbial genomes. **BMC Genomics**, 2012. v. 13, n. 1, p. 1–12.

SAVCI, S. An Agricultural Pollutant: Chemical Fertilizer. **International Journal of Environmental Science and Development**, 2012. v. 3, n. 1, p. 77–80.

SCHMIDT, M. A. *et al.* The type III secretion system is necessary for the development of a pathogenic and endophytic interaction between *Herbaspirillum rubrisubalbicans* and Poaceae. **BMC Microbiology**, 2012. v. 12.

SCHOCH, C. L. *et al.* NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. **Database**, 2020. v. 2020, n. 2, p. 1–21.

SCHOEBITZ, M.; LÓPEZ, M. D.; ROLDÁN, A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil – plant fertilization. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, 2013. v. 33, n. 4, p. 751–765.

SCHULTZ, N. *et al.* Avaliação agronômica de variedades de cana-de-açúcar inoculadas com bactérias diazotróficas e adubadas com nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2012. v. 47, n. 2, p. 261–268.

SEEMANN, T. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, 2014. v. 30, n. 14, p. 2068–2069.

SIQUEIRA, A. F. *et al.* Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. **BMC Genomics**, 2014. v. 15, n. 1.

SMERCINA, D. N. *et al.* Temporal dynamics of free-living nitrogen fixation in the switchgrass rhizosphere. **GCB Bioenergy**, 2021. v. 13, n. 11, p. 1814–1830.

SØRENSEN, J. *et al.* Molecular tools in rhizosphere microbiology-from single-cell to whole-community analysis. **Plant and Soil**, 2009. v. 321, n. 1–2, p. 483–512.

SOTO-MUÑOZ, L. *et al.* DNA-based methodologies for the quantification of live and dead cells in formulated biocontrol products based on *Pantoea agglomerans* CPA-2. **International Journal of Food Microbiology**, 2015. v. 210, p. 79–83.



SOUMARE, A. *et al.* Exploiting Biological Nitrogen Fixation: A Route. **Plants**, 2020. p. 1–22.

SOUZA, G. K. DE *et al.* Soybean inoculants in Brazil: an overview of quality control. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2019. v. 50, n. 1, p. 205–211.

SOUZA, R. De; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, 3 nov. 2015. v. 38, n. 4, p. 401–419.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS microbiology reviews**, 2007. v. 31, n. 4, p. 425–48.

SPIPKER, T. *et al.* Recovery of *Herbaspirillum* species from persons with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, 2008. v. 46, n. 8, p. 2774–2777.

STETS, M. I. *et al.* Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, 2015. v. 81, n. 19, p. 6700–6709.

STRAUB, D. *et al.* Root ethylene signalling is involved in *Miscanthus sinensis* growth promotion by the bacterial endophyte *Herbaspirillum frisingense* GSF30 T. **Journal of Experimental Botany**, 2013. v. 64, n. 14, p. 4603–4615b.

STRAUB, D. *et al.* The genome of the endophytic bacterium *H. frisingense* GSF30T identifies diverse strategies in the *Herbaspirillum* genus to interact with plants. **Frontiers in Microbiology**, 2013. v. 4, n. JUN, p. 1–10a.

TAN, Z. *et al.* First Report of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* Causing Mottled Stripe Disease on Sugarcane in China. **Plant Disease**, 2010. v. 94, n. 3, p. 379–379. Scientific Societies.

TAO, J. *et al.* Evolutionary origin and ecological implication of a unique nif island in free-living Bradyrhizobium lineages. **ISME Journal**, 2021. v. 15, n. 11, p. 3195–3206.

TETTELIN, H. *et al.* Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial “pan-genome”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 8 nov. 2005. v. 102, n. 45, p. 16530–16530.

TETTELIN, H. *et al.* Comparative genomics: the bacterial pan-genome. **Current Opinion in Microbiology**, 2008. v. 11, n. 5, p. 472–477.

TETZ, V.; TETZ, G. Draft Genome Sequence of the Uropathogenic *Herbaspirillum frisingense* Strain ureolyticus VT-16-41. **Genome Announcements**, 27 abr. 2017. v. 5, n. 17, p. 14–16.

THONAR, C. *et al.* Potential of three microbial bio-effectors to promote maize

growth and nutrient acquisition from alternative phosphorous fertilizers in contrasting soils. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, 13 dez. 2017. v. 4, n. 1, p. 7.

TROVERO, M. F. *et al.* *Herbaspirillum seropedicae* Differentially Expressed Genes in Response to Iron Availability. **Frontiers in Plant Science**, 2018. v. 9, n. July, p. 1–12.

TULESKI, T. R. *et al.* Cellulose production increases sorghum colonization and the pathogenic potential of *Herbaspirillum rubrisubalbicans* M1. **Scientific Reports**, 2019. v. 9, n. 1, p. 1–10.

TULESKI, T. R. *et al.* *Herbaspirillum rubrisubalbicans* as a phytopathogenic model to study the immune system of *Sorghum bicolor*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 2020. v. 33, n. 2, p. 235–246.

USDA, 2022. World Agricultural Production. **Circular Series**. October, 2022.

URREA-VALENCIA, S. *et al.* Detection of *Azospirillum brasilense* by qPCR throughout a maize field trial. **Applied Soil Ecology**, 2021. v. 160, p. 103849.

VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, 2005. v. 29, n. 3, p. 151–159.

VALDAMERI, G. *et al.* *Herbaspirillum rubrisubalbicans*, a mild pathogen impairs growth of rice by augmenting ethylene levels. **Plant Molecular Biology**, 2017. v. 94, n. 6, p. 625–640.

VALVERDE, A. *et al.* *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2003. v. 53, n. 6, p. 1979–1983.

VELTRI, D.; WIGHT, M. M.; CROUCH, J. A. SimpleSynteny: a web-based tool for visualization of microsynteny across multiple species. **Nucleic acids research**, 2016. v. 44, n. W1, p. W41–W45.

VONDRAKOVA, L. *et al.* Impact of various killing methods on EMA/PMA-qPCR efficacy. **Food Control**, 2018. v. 85, p. 23–28.

XU, W. The Identification and Detection Technology of Research in Microorganisms Including Living or Dead Bacteria. In: XU, W. (Ed.). **Functional Nucleic Acids Detection in Food Safety: Theories and Applications**. Singapore: Springer Singapore, 2016. p.343-364.

WANG, H.; TURECHEK, W. W. Detection of viable *Xanthomonas fragariae* cells in strawberry using propidium monoazide and long-amplicon quantitative PCR. **Plant Disease**, 2020. v. 104, n. 4, p. 1105–1112.

WANG, S.; LEVIN, R. E. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from

dead cells in real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, 2006. v. 64, n. 1, p. 1–8.

WEIGHARDT, F. Quantitative PCR for the detection of GMOs. The Analysis of Food Samples for the Presence of Genetically Modified Organisms: **Joint Research Centre**, 2006.

WEILHARTER, A. *et al.* Complete genome sequence of the plant growth-promoting endophyte *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. **Journal of Bacteriology**, 2011. v. 193, n. 13, p. 3383–3384.

WISNIEWSKI-DYÉ, F. *et al.* Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. **Genes**, 2012. v. 3, n. 4, p. 576–602.

WORLD DEVELOPMENT INDICATORS (WDI). **Fertilizer consumption**, 2021.

WORDELL FILHO, J. A.; CHIARADIA, L. A. **A cultura do milho em Santa Catarina**: Epagri 2016.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2006. v. 70, n. 3, p. 281–289.

ZHANG, W. *et al.* High Abundance of Thaumarchaeota Found in Deep Metamorphic Subsurface in Eastern China. **Microorganisms**, 2022. v. 10, n. 3.

## 8. Apêndices

Material suplementar referente ao capítulo 1: A genômica comparativa revela alta conservação e distribuição escassa de genes *nif* de fixação de nitrogênio no gênero *Herbaspirillum* associado a plantas

- [Supplementary file1 \(DOCX 979 KB\)](#)
- [Supplementary file2 \(XLSX 13 KB\)](#)
- [Supplementary file3 \(XLSX 15 KB\)](#)
- [Supplementary file4 \(XLSX 15 KB\)](#)
- [Supplementary file5 \(XLSX 15 KB\)](#)
- [Supplementary file6 \(XLSX 15 KB\)](#)
- [Supplementary file7 \(XLSX 12 KB\)](#)
- [Supplementary file8 \(XLSX 11 KB\)](#)
- [Supplementary file9 \(XLSX 9 KB\)](#)
- [Supplementary file10 \(XLSX 379 KB\)](#)