

**Interação entre a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1 e o milho (*Zea mays* L.) cultivar DKB 390 nos estádios iniciais do desenvolvimento vegetal**

Jessica Cavalheiro Ferreira Bueno<sup>(1)\*</sup>, Cláudio Roberto Fônsaca Sousa Soares<sup>(2)</sup>, Ana Carolina Maisonnave Arisi<sup>(3)</sup>

<sup>(1)</sup> Acadêmica do curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>(2)</sup> Professor Adjunto, Depto de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Trindade. Caixa Postal 476, CEP 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil.

<sup>(3)</sup> Professor Associado, Depto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga, 1346, Bairro Itacorubi, Caixa Postal 476, CEP 88034-000, Florianópolis, SC, Brasil.

\* Autor correspondente – E-mail: jessicacfbueno@hotmail.com

## **Resumo**

Objetivou-se avaliar o estabelecimento e a eficiência simbiótica da bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1 nos estádios iniciais de desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.) cultivar DKB 390. Foram conduzidos dois ensaios em condições controladas utilizando solo coletado a campo em esquema fatorial 3x3: três tratamentos [dois controles não inoculados com baixo N (0,5 mmol L<sup>-1</sup>) e alto N (5,0 mmol L<sup>-1</sup>) e um tratamento inoculado com *H. seropedicae* com baixo N] e; três períodos de coleta [7, 14 e 21 dias após a emergência (DAE)]. Avaliou-se o crescimento e o teor de nitrogênio no milho, e quantificou-se DNA de *H. seropedicae* nas plantas e no solo por *qPCR*. A inoculação beneficiou o crescimento radicular em relação ao tratamento controle com baixo N, não havendo incremento na biomassa da parte aérea. Aos 14 DAE o teor de N aumentou em 25% nas plantas inoculadas em relação às plantas controle com baixo N e alto N. A técnica de *qPCR* foi eficiente na quantificação de DNA de *H. seropedicae*, sendo detectada apenas nas raízes das plantas inoculadas. Ensaios adicionais são necessários para avaliar a efetividade de *H. seropedicae* a campo em todo o ciclo da cultura.

**Palavras-chave:** fixação biológica de nitrogênio, gramíneas, interação planta-bactéria, *qPCR*

**Interaction between diazotrophic bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 and maize (*Zea mays* L.) cultivar DKB 390 in the early stages of plant development**

**Abstract**

This study aimed to evaluate the establishment and symbiotic efficiency of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in the early development stages of maize (*Zea mays* L.) cultivar DKB 390. Two experiments were conducted under controlled conditions using soil collected in the field in a 3x3 factorial scheme: three treatments [two controls uninoculated with low N (0.5 mmol L<sup>-1</sup>) and high N (5.0 mmol L<sup>-1</sup>) and inoculated with *H. seropedicae* with low N] in three periods of collection [7, 14 and 21 days after emergence (DAE)]. Growth and nitrogen content were measured in maize, and DNA of *H. seropedicae* was quantified in plants and soil by *qPCR*. Inoculation improved root growth compared to the control plants with low N, but there was no increase in shoot biomass. At 14 DAE N content increased about 25% in inoculated plants as compared with control plants with low N and control plants with high N. The *qPCR* technique was efficient in quantifying DNA of *H. seropedicae*, but was detected only roots of inoculated plants. Additional studies are needed to evaluate the effectiveness of *H. seropedicae* in the field throughout the crop cycle.

**Key words:** biological nitrogen fixation, grasses, plant-bacteria interaction, *qPCR*

**Introdução**

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais cultivado em todo o mundo. A importância econômica desta cultura se dá pelas diversas formas de sua utilização, que vai desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia, sendo que o uso do milho em grão como alimentação animal representa a maior parte do consumo, isto é, cerca de 70% no mundo e entre 70 e 80% no Brasil (DUARTE et al., 2010). Na safra 2013/2014 cerca de 15,8 milhões de hectares foram cultivados com a cultura no país, com produtividade média de 5.057 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2014).

Junto com o aumento da produtividade do milho aumentou-se a demanda por adubação, sendo esta indispensável, principalmente a nitrogenada. O nitrogênio (N) faz

parte de componentes essenciais da célula vegetal, e está relacionado com os mais importantes processos fisiológicos das plantas, tais como fotossíntese, respiração, desenvolvimento e atividade das raízes, absorção iônica de outros nutrientes, crescimento, diferenciação celular e genética (TAIZ & ZEIGER, 2009). Para a utilização do nitrogênio como adubo químico nas lavouras, realiza-se o processo industrial de fixação de  $N_2$ , o qual tem um elevado custo econômico, já que estes representam mais de 70% do custo de adubação do milho (MACHADO et al., 1998). Há também um elevado custo ambiental, pois seu uso em grande escala leva à degradação de recursos naturais e afeta funções ecológicas do solo (SHAZAD et al., 2013).

Diante disso, há uma necessidade da adoção de tecnologias alternativas que proporcionem o menor uso de fertilizantes nitrogenados. Dentre essas tecnologias destacam-se as bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV), que são bactérias de vida livre, as quais apresentam relevância para a agricultura quando em associação com culturas de importância econômica (MOREIRA et al., 2010; ARRUDA et al., 2013). As BPCV quando associadas às plantas são capazes de promover o crescimento vegetal, pois são diazotróficas (fixadoras de  $N_2$ ), atuam em processos como a solubilização de fosfato, controle biológico de patógenos e na produção e secreção de fitormônios, tais como auxina, etileno, citocininas e giberelinas, além de outras moléculas (HUNGRIA et al., 2010; MONTEIRO et al., 2012), e assim geram incrementos no desenvolvimento e na produtividade das culturas (BALDANI et al., 1997).

*Herbaspirillum seropedicae* é uma bactéria aeróbia, Gram-negativa, diazotrófica e endofítica obrigatória, além de ser uma BPCV. Essa bactéria tem sido isolada de muitas espécies de gramíneas, como o milho, sorgo, arroz, cana de açúcar, trigo e outras plantas forrageiras cultivadas no Brasil (BALDANI et al., 1986; OLIVARES et al., 1996; BALSANELLI et al., 2010), sendo capaz de colonizar tecidos internos, estabelecendo associação simbiótica sem causar prejuízo à planta simbiótica (PEDROSA et al., 2011). Segundo Döbereiner et al. (1995), por ser uma bactéria endofítica obrigatória, *H. seropedicae* contribui mais eficientemente na fixação de  $N_2$  do que as associações rizosféricas, especialmente nos trópicos. De acordo com Monteiro et al. (2012), a cepa mais estudada dessa espécie é a *H. seropedicae* cepa SmR1, um mutante espontâneo da estirpe Z78 (ATCC 35893) que foi isolada a partir de sorgo por Baldani et al. (1986), e que é resistente ao antibiótico estreptomicina. Seu genoma foi sequenciado e publicado em 2011 por Pedrosa et al. (2011).

Esta bactéria não sobrevive bem no solo natural como outros endofíticos, sendo menos afetada em solo estéril, o que indica que fatores biológicos interferem em sua sobrevivência (MARIN et al., 1999). Há variações de respostas nessa interação em gramíneas que não foram completamente elucidadas, sendo que a interação entre genótipo e ambiente pode ter influência sobre a eficiência dos organismos diazotróficos.

Existem diversos estudos associando a inoculação de *H. seropedicae* com o crescimento vegetal ou incremento de nitrogênio à planta assim como a produtividade (ALVES et al., 2015; ZILLI et al., 2008; DARTORA et al., 2013) e também esclarecendo como a interação planta-bactéria acontece. Como afirma Figueiredo et al. (2008), o uso dessa bactéria na forma de inoculante a campo ainda é restrito. Porém, acredita-se que com avanços na aplicação dessa tecnologia e a adoção de ferramentas da biologia molecular e a genética de microrganismos, essas bactérias poderão ser empregadas em escala semelhante ao que se aplica atualmente para os rizóbios nas leguminosas. Nesse sentido, há trabalhos em que a técnica da PCR quantitativa (*qPCR*) foi utilizada objetivando a detecção e quantificação de microrganismos associados às plantas (COUILLEROT et al., 2010; FALEIRO et al., 2013). Pereira et al. (2014) desenvolveram ensaio *qPCR* específico para *H. seropedicae* cepa SmR1 usando os iniciadores HERBAS 1 para a quantificação desta bactéria no milho cultivado *in vitro* e em areia.

Para melhor entendimento da aplicação como inoculante comercial, há poucos estudos que quantificam o DNA bacteriano de *H. seropedicae* presente na planta do milho quando cultivado em solo não esterilizado e com a semente inoculada. Isso possibilitaria avaliar a presença da bactéria nos tecidos das plantas e relacionar com os benefícios no crescimento vegetal, juntamente com a interação do ambiente. Dessa forma, é importante estudar o estabelecimento e eficiência simbiótica da bactéria na planta quando inoculada na semente e em solo não estéril, e a técnica da *qPCR* é uma ferramenta rápida e confiável para sua detecção e quantificação.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o estabelecimento e a eficiência simbiótica da bactéria diazotrófica *H. seropedicae* cepa SmR1 nos estádios iniciais de desenvolvimento do milho (*Zea mays* L.) cultivar DKB 390.

## **Material e métodos**

### *Delineamento e condução experimental*

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis, Santa Catarina, sendo realizado em dois ensaios separadamente. O primeiro ensaio ocorreu durante os meses de outubro e novembro de 2014, e o segundo durante os meses de fevereiro e março de 2015. Foi utilizada a cultivar de milho DKB390, a qual apresenta alto potencial produtivo e estabilidade, além de ter apresentado uma boa resposta à inoculação com *H. seropedicae* em trabalho realizado por Araújo et al. (2013b).

Utilizou-se solo proveniente de uma propriedade agrícola no município de Curitibanos - Santa Catarina, coletado na camada de 0 a 20 cm, localizado em um relevo suave ondulado e com histórico de cultivo de soja e milho. Uma porção do solo foi coletada e congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior análise da presença de *H. seropedicae* por qPCR. O solo foi secado ao ar, destorroado e transferido para os vasos no primeiro ensaio. No segundo ensaio, o mesmo solo foi utilizado após uma semana de exposição ao calor pelo método da solarização, e foi aplicada vermiculita na superfície dos vasos para evitar contaminação externa.

Nos dois ensaios as sementes foram desinfetadas com álcool 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio 1% + Tween-20 0.01% (USB, Cleveland, OH, USA) por 20 minutos, e depois lavadas cinco vezes com água destilada esterilizada. A bactéria *H. seropedicae* foi crescida em agitação a 120 rpm em um shaker, a  $\pm 30^{\circ}\text{C}$ , em 20 mL de meio NFbNHP (NFbN High Phosphate –  $1,5\text{ mg L}^{-1}$ ) suplementado com  $5\text{ mg L}^{-1}$  de malato (KLASSEN et al., 1997) até atingir densidade óptica (DO) de 1,0 medida em comprimento de onda de 600nm [ $\text{DO}_{600} = 1,0 (10^8\text{ células mL}^{-1})$ ]. Depois 1 mL do inóculo foi centrifugado por três vezes a 1200 rpm, resuspendendo com meio de cultivo NFb malato 20% livre de nitrogênio. Para a preparação do inoculante foi aplicado 1 mL do inóculo em 1 g de turfa (previamente seca, moída, esterelizada e com pH ajustado), seguindo protocolo de Ferreira, Baldani & Baldani (2010). Esse inóculo apresentou uma concentração final de  $6 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , determinada pelo método de *drop plate* utilizando para crescimento o meio de cultivo NFb malato 20% contendo  $80\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$  do antibiótico estreptomicina. O inoculante turfoso foi aplicado nas sementes considerando-se a dose de 25 g de inoculante  $\text{kg}^{-1}$  de sementes (HUNGRIA et al., 2010). Também foi aplicada sacarose 10% na dose de 300 mL  $50\text{ kg}^{-1}$  sementes para aumentar a aderência do inoculante à semente. A quantificação do número de células de bactéria por semente foi feita utilizando o meio de

cultivo anteriormente citado. Para isso 50 sementes foram misturadas com 50 mL de solução salina 0,9% e homogeneizadas para posterior diluição seriada, plaqueamento e contagem pelo método de *pour plate*. Com isso, obteve-se uma concentração final de  $2 \times 10^6$  células por semente. Nos tratamentos controle, foram aplicadas as mesmas proporções de turfa, sacarose e meio NFB malato 20%, porém sem a presença da bactéria.

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3 com três repetições, sendo o primeiro fator relacionado aos três tratamentos referentes à inoculação da semente de milho: controle (sem inoculação) + 5 mM de nitrogênio (alto N), controle (sem inoculação) + 0,5 mM de nitrogênio (baixo N), *H. seropedicae* + 0,5 mM de nitrogênio; e o segundo fator referente aos tempos de coleta: 7, 14 e 21 dias após a emergência (DAE). Nos dois ensaios, a unidade experimental foi composta por três vasos de 1,5 dm<sup>3</sup>, com um total de 27 vasos por tratamento para todos os tempos de coleta. A semeadura foi realizada adicionando-se quatro sementes por vaso. Aos quatro DAE foi realizado o desbaste deixando-se apenas duas plantas por vaso. Durante a condução experimental foi realizada irrigação em dias alternados mantendo-se a umidade na capacidade de campo.

A adubação foi realizada aos 4, 11 e 18 DAE, aplicando-se 50 mL de uma solução de nitrato de potássio (KNO<sub>3</sub>) (RODRIGUEZ-SALAZAR et al., 2009), de modo a fornecer 0,5 mM de KNO<sub>3</sub> para o tratamento controle baixo N e para o tratamento inoculado, e 5 mM de KNO<sub>3</sub> para o tratamento controle alto N. Desta forma a quantidade de N aplicada ao final do experimento foi equivalente a 1,4 kg ha<sup>-1</sup> para os tratamentos inoculados e controle baixo N, e de 14 kg ha<sup>-1</sup> para o tratamento com alto N. Estas quantidades foram definidas baseadas na recomendação de adubação de semeadura do milho que deve ser de 10 a 20 kg de N ha<sup>-1</sup> (Comissão de Química e Fertilidade do Solo - CQFS-RS/SC, 2004).

#### *Análises realizadas*

No primeiro ensaio, a cada tempo de coleta foram avaliadas três plantas por tratamento por repetição, totalizando nove plantas por tratamento. As variáveis analisadas foram comprimento das raízes, altura da parte aérea, massa seca da parte aérea, massa seca da raiz e teor de nitrogênio na massa seca da parte aérea. A medida do comprimento de raiz e altura da parte aérea foi realizada com auxílio de uma régua graduada. Em seguida, a parte aérea e as raízes das plantas foram acondicionadas em sacos de papel, identificadas e levadas à estufa de circulação forçada de ar a  $65 \pm 2$  °C por 72 h, para posterior pesagem

em balança de precisão e determinação da massa seca. A avaliação do teor de nitrogênio total foi feita a partir da digestão sulfúrica do tecido vegetal, utilizando a massa seca da parte aérea, conforme metodologia descrita por Tedesco et al. (1995).

No segundo ensaio, a cada tempo de coleta foram coletadas seis plantas por tratamento por repetição, totalizando 18 plantas por tratamento. Nove delas foram utilizadas para avaliação de comprimento das raízes, altura da parte aérea, massa seca da parte aérea e massa seca da raiz, conforme descrito anteriormente. As outras nove plantas coletadas foram congeladas imediatamente com nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C para posterior quantificação de *H. seropedicae* por *qPCR*, sendo que esta análise foi realizada com as plantas do tratamento inoculado e controle não inoculado com baixo N aos 7, 14 E 21 DAE.

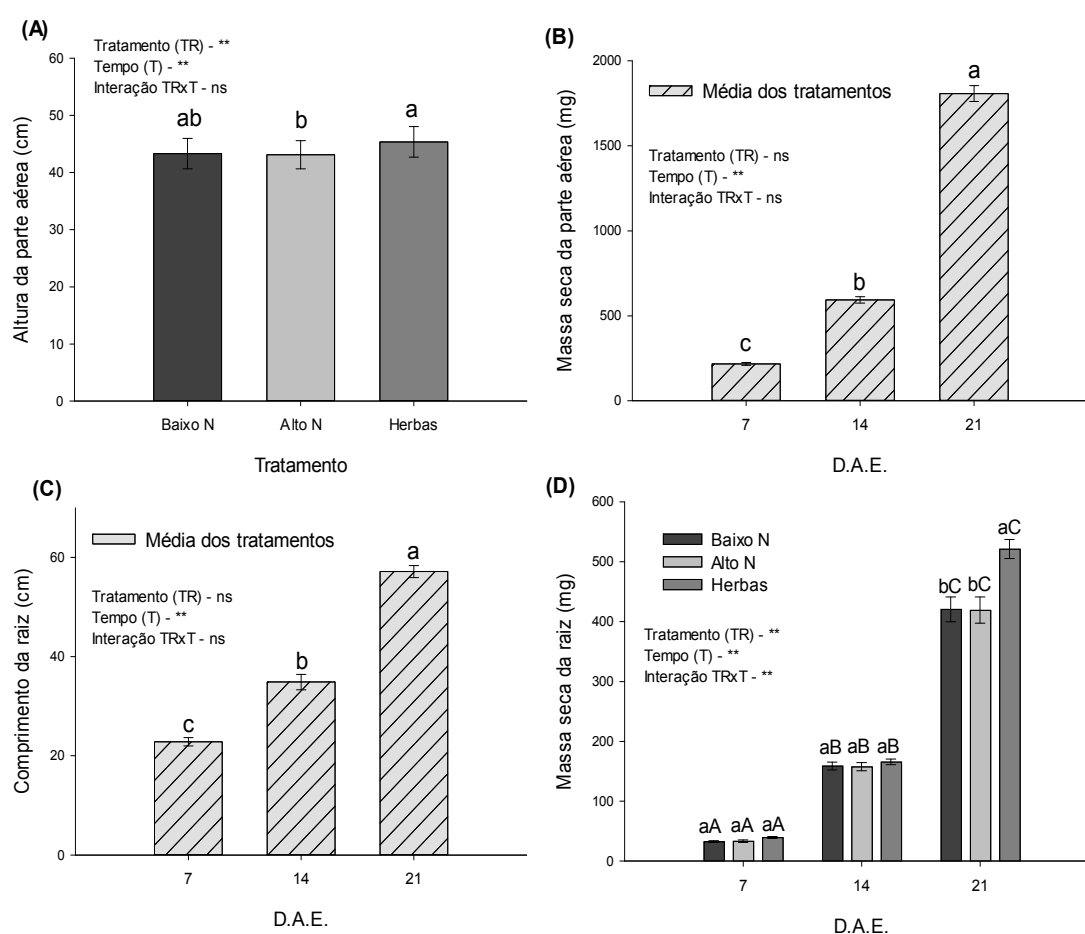
Na extração do DNA para realização da *qPCR* de amostras de solo, foi utilizado o PowerSoil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Inc.), seguindo protocolos indicados pelo fabricante. Para a *qPCR* de amostras de tecido vegetal, o DNA foi extraído e purificado de raízes e folhas congeladas a -80°C utilizando o DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante. A quantificação de *H. seropedicae* no solo, nas folhas e nas raízes foi realizada por meio da técnica da *qPCR* utilizando os iniciadores HERBAS1, segundo metodologia descrita por Pereira et al. (2014), empregando-se a sonda Taqman (Life Technologies), a qual tem demonstrado maior especificidade neste tipo de avaliação em relação ao corante intercalante SYBR Green. Este ensaio é específico para uma sequência alvo da bactéria, amplificando uma região de 76 pares de base.

Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando o teste “F” foi significativo a 5%, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de 5% de significância, utilizando o programa Sisvar versão 5.3 (FERREIRA, 2011).

## **Resultados e discussão**

Os tratamentos e tempos de coleta exerceram efeitos diferenciados sobre as variáveis de crescimento do milho no primeiro ensaio (Apêndice A). Na Figura 1 podem ser observados os resultados das variáveis de crescimento avaliadas neste ensaio. Verificou-se que a altura das plantas foi significativamente influenciada pelos efeitos isolados de tempos de coleta e tratamentos (Figura 1A). A inoculação de *H. seropedicae* aumentou em 5% a altura das plantas em relação ao tratamento controle contendo alto N. A

produção de massa seca da parte aérea (MSPA) e o comprimento de raízes foram influenciados apenas pelo tempo de coleta (Figura 1B e Figura 1C, respectivamente). A produção de massa seca de raízes (MSR) foi significativamente influenciada pela interação tratamento\*tempo (Figura 1D), sendo verificado efeito dos tratamentos apenas aos 21 DAE. Nesse período de avaliação o tratamento inoculado com *H. seropedicae* aumentou em média 18% a biomassa de raízes em relação ao tratamento controle contendo baixo N e controle com alto N.

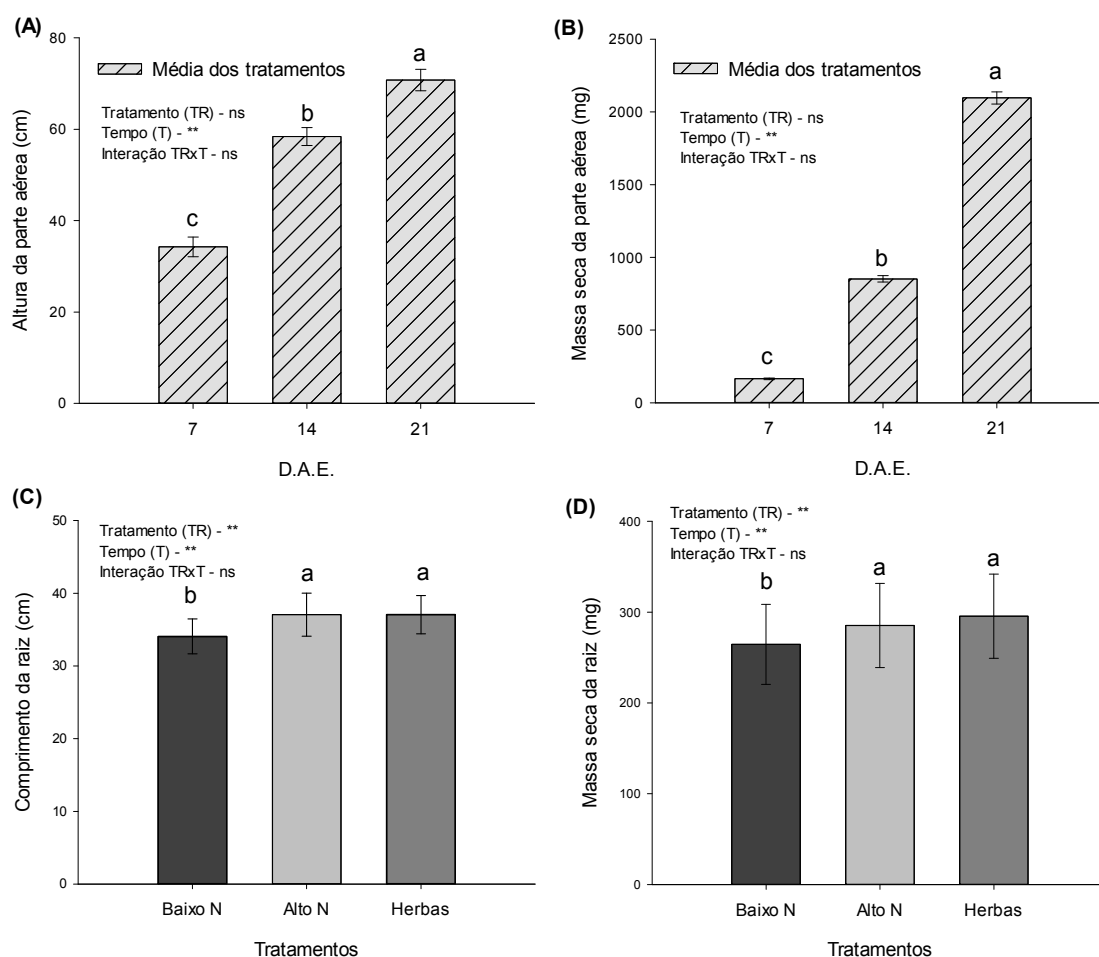


**Figura 1.** Efeito dos tratamentos de inoculação (TR), tempo de cultivo (T) e interação TRxT sobre a altura da parte aérea (A), massa seca da parte aérea (B), comprimento da raiz (C) e massa seca da raiz (D) de plantas de milho aos 7, 14 e 21 dias após a emergência (DAE), para os tratamentos controle baixo N, controle alto N e inoculado com *H. seropedicae* SmR1 (Herbas), do primeiro ensaio realizado. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tempo de coleta pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam os tempos de coleta dentro do mesmo tratamento pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. \*\* - efeito significativo a 5% de probabilidade; ns – efeito não significativo. As barras verticais representam o erro padrão da média.

No segundo ensaio os tratamentos e os tempos de coleta exerceram efeitos diferenciados sobre as variáveis de crescimento do milho (Apêndice A). Os resultados das



variáveis analisadas no segundo ensaio podem ser observados na Figura 2. O comprimento da raiz (Figura 2C) e a produção de massa seca de raízes (Figura 2D) foram significativamente influenciados pelos efeitos isolados dos tempos de coleta e tratamentos. A inoculação de *H. seropedicae* aumentou em 9% o comprimento das raízes das plantas em relação ao tratamento controle baixo N e não diferenciou do controle alto N. O tratamento inoculado com *H. seropedicae* aumentou, em média, 12% a biomassa de raízes em relação ao tratamento controle baixo N, e não se diferenciou estatisticamente do tratamento controle alto N. Já a altura da parte aérea (Figura 2A) e a produção de massa seca da parte aérea (Figura 2B) foram influenciadas apenas pelos tempos de coleta.



**Figura 2.** Efeito dos tratamentos de inoculação (TR), tempo de cultivo (T) e interação TRxT sobre a altura da parte aérea (A), massa seca da parte aérea (B), comprimento da raiz (C) e massa seca da raiz (D) de plantas de milho aos 7, 14 e 21 dias após a emergência (DAE), para os tratamentos controle baixo N, controle alto N e inoculado com *H. seropedicae* SmR1 (Herbas), do segundo ensaio realizado. Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. \*\* - efeito significativo a 5% de probabilidade; ns – efeito não significativo. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Para a altura da parte aérea, no primeiro ensaio houve diferença entre os tratamentos e no segundo ensaio essa diferença não ocorreu. Resultado semelhante ao do segundo ensaio realizado foi encontrado em trabalho de Araújo et al. (2013a) em que não houve diferença na altura de planta aos 35 DAE.

Nos dois ensaios realizados a inoculação não influenciou o incremento de MSPA. Ao contrário destes resultados, Riggs et al. (2001) verificaram que a inoculação de *H. seropedicae* em milho e trigo promoveu incrementos de MSPA variando de 16% a 82%. Plantas de milho inoculadas com *H. seropedicae* (ZAE 94) foram avaliadas aos 55 DAE por Araújo et al. (2013b), e observou-se que o decréscimo de MSPA em alguns genótipos e em outros ocorreu o acréscimo, destacando-se o DKB390 que teve um incremento significativo de 23% em relação às plantas não inoculadas. Em trabalho de Santos et al. (2015) a inoculação da estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* promoveu aumentos de 14 % na produção de MSPA de milho, quando associado à dose 60 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Para o comprimento de raiz no primeiro ensaio não houve diferença entre os tratamentos. Já no segundo ensaio houve diferença entre os tratamentos, com maior comprimento de raízes nas plantas inoculadas e controle alto N comparadas ao controle baixo N. Da mesma forma Araújo et al. (2013a) encontraram diferença no comprimento de raiz de plantas de milho inoculadas em relação às não inoculadas, com incremento de 62% nas inoculadas.

Em relação à massa seca de raiz (MSR), no primeiro ensaio houve diferença entre os tratamentos aos 21 DAE com destaque para o tratamento inoculado e no segundo ensaio a diferença foi significativa considerando os tratamentos independentemente dos tempos de avaliação, com maiores valores para o inoculado e para o controle alto N. Esse benefício para o crescimento radicular também foi constatado por Conceição et al. (2008) em trabalho utilizando *H. seropedicae* (Z67) como inoculante combinado com ácido húmico.

Em experimento conduzido em areia e utilizando *H. seropedicae* como inoculante na plântula do milho, Amaral et al. (2014) não encontraram diferenças significativas nos parâmetros de crescimento, mas observaram que as plantas inoculadas apresentaram maior número de raízes laterais, assim como a bactéria aumentou expressão de um gene envolvido na via de biossíntese de giberelina e um gene da oxidase NADPH, indicando que a bactéria pode modular a resposta de defesa da planta e síntese de hormônios durante a colonização. Bastian et al. (1998), observaram a produção de ácido indol-3-acético (AIA) e de giberelinas GA1 e GA3 por *H. seropedicae*. Essa síntese de hormônios, relatada nos

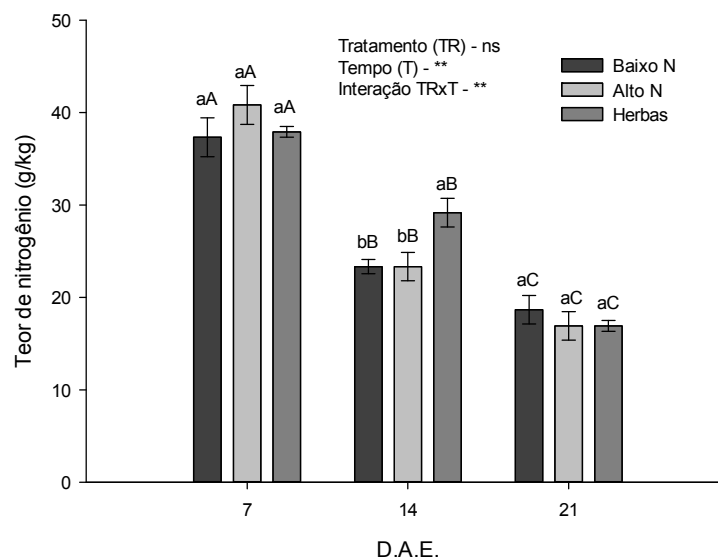
trabalhos citados, provavelmente pode ter contribuído para a maior produção de MSR e comprimento de raiz nas plantas inoculadas no presente trabalho.

Os resultados de desenvolvimento vegetal inicial do milho mostram que há variabilidade de respostas em relação não só à inoculação, mas também ao ambiente, já que alterando algumas variáveis como a época de cultivo e o uso do solo, no caso destes ensaios, as respostas também são alteradas. Esse fato pode ser observado em outras pesquisas realizadas. Em trabalho de Mendonça, Urquiaga e Reis (2006), observou-se que as bactérias diazotróficas inoculadas colonizaram raízes, colmos e folhas dos nove genótipos de milho estudados, porém não foi observada contribuição da fixação biológica de nitrogênio, sendo que a produção e acúmulo de N foram variáveis de acordo com a capacidade de cada genótipo e não com a inoculação.

Dotto et al. (2010) verificaram que a inoculação de *H. seropedicae* em milho não promoveu efeitos significativos sobre as variáveis de produtividade analisadas, sendo que para um dos híbridos houve decréscimo da produtividade e para outro houve aumento, o que mostra essas respostas variáveis de acordo com o genótipo. O genótipo utilizado no presente trabalho (DKB390), foi avaliado em experimento de Araújo et al. (2013b), com produção aumentada pela inoculação. Nesse mesmo trabalho, observou-se que menos de 20% das 35 cultivares de milho avaliadas apresentaram respostas positivas à inoculação com *H. seropedicae* (ZAE 94), o que mostra que é necessário conhecer se cada genótipo tem afinidade com a bactéria, tanto na produção de fitohormônios quanto na FBN.

A resposta à inoculação também é modulada pelo ambiente, e principalmente pela interação deste com o genótipo, o que tem papel decisivo na eficiência do diazotrófico (GYANESHWAR et al., 2002). A adubação nitrogenada em conjunto com a bactéria deve ser levada em conta para uma maior eficiência do incremento na produtividade. Moreira et al. (2010) afirmam que identificar as condições de manejo que podem contribuir para a maximização dos processos que bactérias diazotróficas associativas realizam, como *H. seropedicae*, é o desafio da pesquisa.

O teor de nitrogênio (N) na massa seca da parte aérea das plantas foi significativamente influenciado pela interação tratamento\*tempo (Figura 3), havendo efeito dos tratamentos apenas aos 14 DAE.



**Figura 3.** Efeito dos tratamentos de inoculação (TR), tempo de cultivo (T) e interação TRxT sobre o teor de nitrogênio na massa seca da parte aérea de plantas de milho aos 7, 14 e 21 dias após a emergência (DAE), para os tratamentos controle baixo N, controle alto N e inoculado *com H. seropedicae* SmR1(Herbas), do primeiro ensaio realizado. Letras minúsculas comparam os tratamentos dentro do mesmo tempo de coleta pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas comparam os tempos de coleta dentro do mesmo tratamento pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. \*\*- efeito significativo a 5% de probabilidade; ns – efeito não significativo. As barras verticais representam o erro padrão da média.

Houve contribuição significativa da inoculação ao teor de N aos 14 DAE, sendo que houve um incremento de 25% no teor de nitrogênio da parte aérea nas plantas inoculadas em relação às plantas controle baixo N e controle alto N. Já aos 7 DAE e 21 DAE não houve diferença estatística entre os tratamentos. Aos 7 DAE isso ocorreu provavelmente pelo fato de a bactéria não ter se estabelecido a ponto de fixar N para a planta. Aos 21 DAE os teores de N se igualaram e isto se justifica pelo fato de que o sistema radicular de todas as plantas já é maior, tendo maiores condições para a absorção de N do solo em todos os tratamentos.

Este resultado encontrado corrobora algumas pesquisas realizadas, como o estudo de Alves (2015), no qual a inoculação contribuiu com até 28% do N nas plantas; a pesquisa de Ferreira, Baldani e Baldani (2010), na qual cultivares de arroz submetidas à inoculação com bactérias diazotróficas tiveram respostas positivas no acúmulo de N; e trabalho de Santos et al. (2015), onde a inoculação promoveu aumento de 44% do N total, quando associado à dose 60 kg ha<sup>-1</sup> de N.

Araújo et al. (2013b) observaram que não houve diferença significativa no teor de N da cultivar DKB 390 com e sem inoculação de *H. seropedicae* ZAE94 aos 55 dias após a emergência. Araújo et al. (2013b) também verificaram que há respostas diferentes entre cultivares de milho em relação ao teor de nitrogênio, sendo que em algumas há incremento deste nutriente quando submetidas à inoculação, e em outras há até mesmo o decréscimo nas plantas inoculadas quando comparadas às sem inoculação.

Em trabalho de Dotto et al. (2010) o teor de N nas plantas de milho não foi influenciado significativamente pela inoculação, e estes autores afirmam que o genótipo da planta é o fator-chave para haver benefícios da FBN, juntamente com a seleção de estirpes eficientes. Mendonça, Urquiaga e Reis (2006) não observaram incrementos no teor de N nos diferentes genótipos inoculados, mesmo quando a presença da bactéria foi observada, e eles explicam que é preciso também considerar que alguns grupos de genótipos respondem mais aos fitohormônios produzidos pelas bactérias diazotróficas, enquanto outros respondem mais à FBN. Portanto, as diferenças nos resultados podem estar associadas à interação entre genótipo e estirpe utilizada, além da interação com o ambiente, como discutido anteriormente.

Também foi possível observar que com o desenvolvimento vegetativo da planta os teores de N vão diminuindo (Figura 3). Isso se deve provavelmente ao fato de que há uma translocação do N da planta para formação de novas estruturas, chamado de “efeito de diluição” por Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), os quais afirmam que plantas com altas taxas de produção de matéria seca comumente apresentam menores teores de N nos tecidos e vice-versa.

Os resultados da quantificação de DNA de *H. seropedicae* SmR1, expresso em número de cópias de DNA por grama de raiz e de folhas, são apresentados na Tabela 1, assim como os resultados da quantificação de DNA desta bactéria no solo utilizado. Como esperado não houve detecção de *H. seropedicae* SmR1 nas plantas controle, as quais não foram inoculadas, e a bactéria também não foi detectada nas folhas das plantas inoculadas, pois o Ct médio apresentado na análise dessas amostras foi tardio (Ct > 35, Apêndice B). Já nas raízes das plantas inoculadas houve a detecção do *H. seropedicae* (Apêndice B), sendo que o número de cópias de DNA bacteriano aos 7 DAE foi, em média, 14 vezes superior aos demais tempos de avaliação (Tabela 1).

**Tabela 1.** Número de cópias de DNA da bactéria por grama de raiz e por grama de folha de milho aos 7, 14 e 21 dias após a emergência (DAE), para os tratamentos controle (baixo N) e inoculado com *H. seropedicae* cepa SmR1, e número de cópias de DNA da bactéria por grama de solo.

Tratamentos / qPCR	DAE			
	7	14	21	
Controle não inoculado	> LOD	0/9	0/9	0/9
	Número de cópias de DNA da bactéria/g raiz ± DP	nd	nd	nd
	Número de cópias de DNA da bactéria/g folha ± DP	nd	nd	nd
Inoculado com <i>H. seropedicae</i> SmR1	> LOD	9/9	3/9	3/9
	Número de cópias de DNA da bactéria/g raiz ± DP	3,48 ± 1,48 x10 <sup>5</sup>	1,31 ± 0,14 x10 <sup>4</sup>	3,83 ± 0,09 x10 <sup>4</sup>
	> LOD	0/9	0/9	0/9
Amostra de solo	Número de cópias de DNA da bactéria/g folha ± DP	nd	nd	nd
	> LOD	0/9	0/9	0/9
	Número de cópias de DNA da bactéria/g solo ± DP	nd	nd	nd

nd= não detectado, abaixo do limite de detecção (LOD).

Portanto as bactérias conseguiram se estabelecer rapidamente nas raízes, porém a sua população diminuiu aos 14 DAE e aos 21 DAE em relação ao primeiro tempo de coleta (7 DAE). Alguns trabalhos realizados mostram que a bactéria *Herbaspirillum* sp. apresenta além de uma colonização rápida das raízes, também dos colmos e folhas por meio da infecção intracelular e colonização dos vasos do xilema (CHUBATSU et al., 2012; MONTEIRO, R. et al., 2012), o que não foi possível observar, já que não houve detecção da bactérias nas folhas das plantas.

Balsanelli et al. (2010) utilizaram *H. seropedicae* SmR1 como inoculante no milho e encontraram valores de 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> unidades formadoras de colônia (UFC) da bactéria inoculada por grama de raiz. Faleiro et al. (2013) compararam a quantificação de *Azospirillum brasilense* pelo número de cópias de DNA por grama de raiz através da qPCR em relação à contagem de UFC por grama de raiz feita através de contagem em placa e constataram uma discrepância entre os valores, evidenciando a diferença nos resultados

destas técnicas. Em outro trabalho com uma BPCV, foi quantificado *Azospirillum lipoferum* CRT1 através de *q*PCR e foi verificado valores de  $10^4$  a  $10^6$  UFC por grama de raiz de milho (COUILLEROT et al., 2010).

Pereira et al. (2014) em experimento com milho inoculado com *H. seropedicae* cepa SmR1 e cultivado *in vitro* e em areia, encontraram  $5,16 \times 10^7$  cópias de DNA bacteriano por grama de raiz um dia após a inoculação (DAI) e  $1,42 \times 10^9$  aos 10 DAI. Já em experimento realizado com vasos utilizando areia como substrato por estes mesmos autores, o número de cópias de DNA bacteriano por grama de raiz foi em média de  $3,4 \times 10^6$  até os 10 DAI. Esses valores são superiores aos encontrados no presente trabalho e isso provavelmente se deve ao fato de que naquele experimento o tempo de coleta foi menor e a inoculação foi feita em plântulas de milho, o que proporciona condições mais favoráveis para a efetiva colonização quando comparado a uma inoculação realizada nas sementes.

No presente trabalho, o ensaio *q*PCR usando os iniciadores HERBAS1 utilizados para quantificação de *H. seropedicae* SmR1 se mostrou específico para esta estirpe, uma vez que esta não foi constatada nas plantas não inoculadas. Além disso, não houve detecção da bactéria no solo coletado a campo utilizado, como mostra a Tabela 1.

A comunidade de bactérias do solo sofre influência de diferentes fatores ambientais em sua sobrevivência, como a umidade, a temperatura, a competição entre os microrganismos do solo, entre outros (BRANDÃO, 1992). Em condições de campo ou em casa de vegetação utilizando solo não estéril, a competição entre os microrganismos do solo é maior, podendo afetar a colonização na planta pela bactéria inoculada, fato que deve ser levado em conta para o estudo da produção de um inoculante. Porém, como observa Dartora et al. (2013), as respostas positivas à inoculação quando *H. seropedicae* foi combinada com uma BPCV de colonização rizosférica, se deu pela maior contribuição de *H. seropedicae* por ela ser um organismo diazotrófico endofítico, sobrevivendo pouco no solo e colonizando o interior dos tecidos vegetais. Esta colonização é rápida, portanto esta bactéria sofre menor competição com outros microrganismos edáficos (MOREIRA et al., 2010), demonstrando ser um potencial para utilização como inoculante.

Como afirma Moreira et al. (2010), a grande diversidade de bactérias diazotróficas associativas está sendo cada vez mais estudada, mas pouco se conhece do potencial de aplicações de muitas espécies já descritas, como é o caso de *H. seropedicae*, e esses estudos devem ser estimulados visando uma agricultura de menor custo e menor impacto ambiental, mas também valorizando o potencial biotecnológico que elas mostram.

## Conclusões

A bactéria *H. seropedicae* SmR1 foi eficiente no incremento de produção de massa seca de raiz do milho em solo não esterilizado.

A inoculação com *H. seropedicae* influenciou o aumento do teor de N nas plantas em relação às plantas controle não inoculadas somente aos 14 DAE.

Houve o estabelecimento de *H. seropedicae* SmR1 nas raízes das plantas inoculadas nos diferentes tempos de coleta evidenciado pela quantificação de DNA, sendo que a maior quantidade foi encontrada aos 7 DAE.

O ensaio *q*PCR com iniciadores HERBAS1 utilizado foi específico para a estirpe estudada e a *q*PCR se mostrou uma técnica rápida e confiável para detecção do DNA desses microrganismos nas plantas.

Diante dos resultados, percebe-se que ensaios adicionais são necessários para avaliar a efetividade de *H. seropedicae* a campo em todo o ciclo da cultura.

## Referências

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

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

ARAÚJO, E. de O. et al. **Inoculação de *Herbaspirillum seropedicae* no desenvolvimento de genótipos de milho sob diferentes níveis de nitrogênio**. In: Seminário Nacional de Milho Safrinha, 2013, Dourados. Estabilidade e produtividade: anais. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013a.

ARAÚJO, F. F. de. et al. Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 3, p. 1043-1054, maio/jun. 2013b.

ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, jan. 2013.

BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen-nov, sp-nov, a root-associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86-93, jan. 1986.

BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.911-922, maio/jun. 1997.



BALSANELLI, E. et al. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 8, p. 2233-44, mar. 2010.

BASTIAN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A<sub>1</sub> and A<sub>3</sub> by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 1, p. 7-11. 1998.

BRANDÃO, E. M. Os componentes da comunidade microbiana do solo. In: CARSOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 1-15.

CHUBATSU, L. S. et al. Nitrogen fixation control in *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, 2012.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - CQFSRS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10.ed. Porto Alegre, SBCS - Núcleo Regional Sul/UFRGS, 2004. 400p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos 2013/14**, n. 12, 12º levantamento. Brasília, p. 1-127, set. 2014.

CONCEIÇÃO, P. M. da et al. Recobrimento de sementes de milho com ácidos húmicos e bactérias diazotróficas endofíticas. **Pesquisa Agropecária Brasileira**, Brasília, v.43, n.4, p. 545-548. 2008.

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

DARTORA, J. et al. Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.10, p. 1023-1029. 2013.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, 1995. 60 p.

DOTTO, A. P. et al. Produtividade do milho em resposta à inoculação com *Herbaspirillum seropedicae* sob diferentes níveis de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n. 03, p.376-382, jul/set. 2010.

DUARTE, J. de O. et al. Economia da produção. In: CRUZ, J. C. (Ed.). **Cultivo do milho**. 6. ed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Embrapa Milho e Sorgo. Sistemas de produção, 1).

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**, v.61, p. 125-133, nov. 2013.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras (UFLA), v. 35, n. 6, p. 1039-1042. 2011.

FERREIRA, J. S.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Seleção de inoculantes à base de turfa contendo bactérias diazotróficas em duas variedades de arroz. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 179-185. 2010.

FIGUEIREDO, M. do V. B. et al. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, 2008. 568 p.

GYANESHWAR, P. et al. Herbaspirillum colonization increases growth and nitrogen accumulation in aluminium-tolerant rice varieties. **New Phytologist**, New York, v. 154, n. 2, p. 131-145. 2002.

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

KLASSEN, G. et al. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMR1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 887-891, set. 1997.

MACHADO, A. T. et al. Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com bactérias diazotróficas no comportamento bioquímico da cultivar de milho Nitroflint. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 961-970, jun. 1998.

MALAVOLTA, E. A.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 201 p.

MARIN, V. A. et al. **Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999. 24p. (Documentos, 91).

MENDONÇA, M. M.; URQUIAGA, S. S.; REIS, V.M. Variabilidade genotípica de milho para acumulação de nitrogênio e contribuição da fixação biológica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 11, p. 1681-1685. 2006.

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

MOREIRA, F. M. de S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: Diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, p.74-99, 2010.

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**, v. 21, n. 3, p. 197-200, fev. 1996.

PEDROSA, F. et al. Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses. **Plos Genetics**, v. 7, n. 5, maio. 2011.

PEREIRA, T.P. et al. Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 07, p. 660-670, fev. 2014.

RIGGS, P. J. et al. Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n.9, p. 829-836. 2001.

RODRÍGUEZ-SALAZAR, J. et al. Trehalose accumulation in *Azospirillum brasilense* improves drought tolerance and biomass in maize plants. **Fems Microbiology Letters**, v. 296, n. 1, p. 52-59, jul. 2009.

SANTOS, J. da S. et al . Inoculation and isolation of plant growth-promoting bacteria in maize grown in Vitoria da Conquista, Bahia, Brazil. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, Viçosa, v. 39, n. 1, p. 78-85, Feb. 2015 .

SHAHZAD, S. et al. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 57, p. 27-34, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2009. 849p.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 147p. (Boletim Técnico, 5)

ZILLI, J. E. et al. **Rendimento de grãos da cultura do milho inoculado com *Herbaspirillum seropedicae* no cerrado de Roraima**. In: FERTBIO 2008, Londrina. Anais. Londrina: SBCS, 2008. CD Rom.

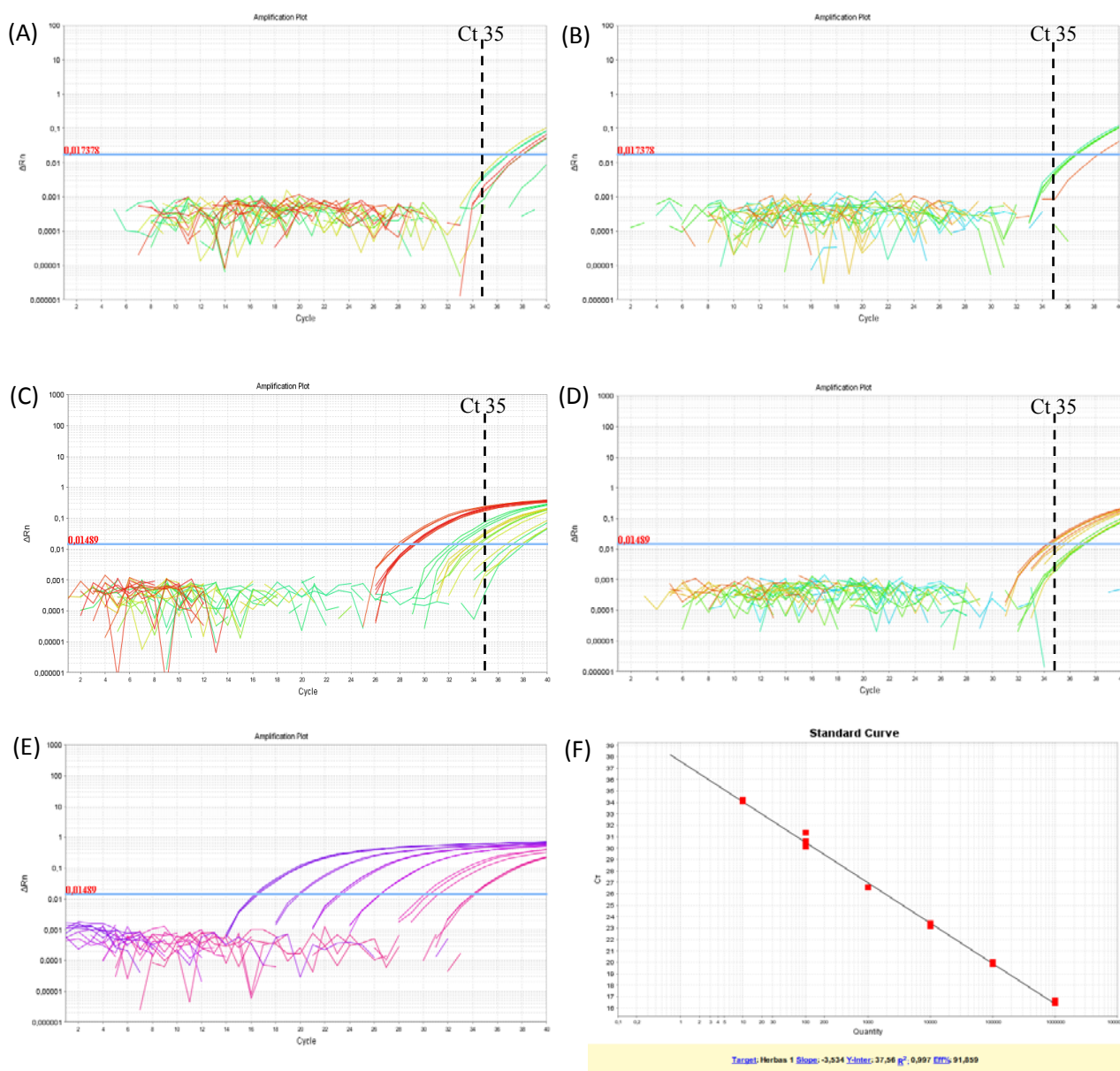
## APÊNDICE A

**Tabela 2.** Resumo da ANOVA para as variáveis analisadas, considerando-se o tratamento sem inoculação (controle baixo N e controle alto N) e com inoculação de *H. seropedicae* cepa SmR1 nos tempos de coleta 7, 14 e 21 DAE.

Variáveis	G.L.	Valor F	P ≤
<b>PRIMEIRO ENSAIO</b>			
<b>APA (cm)</b>			CV(%) = 7,36
(TR)	2	3,95	0,02
(T)	2	646,30	0,00
(TR) x (T)	4	9,86	NS
<b>MSPA (mg)</b>			CV(%) = 17,98
(TR)	2	0,01	NS
(T)	2	757,59	0,00
(TR) x (T)	4	0,20	NS
<b>CR (cm)</b>			CV(%) = 15,85
(TR)	2	2,27	NS
(T)	2	221,84	0,00
(TR) x (T)	4	2,36	NS
<b>MSR (mg)</b>			CV(%) = 16,58
(TR)	2	10,27	0,00
(T)	2	968,89	0,00
(TR) x (T)	4	6,93	0,00
<b>N (g/kg)</b>			CV(%) = 9,68
(TR)	2	1,52	NS
(T)	2	135,86	0,00
(TR) x (T)	4	2,83	NS
<b>SEGUNDO ENSAIO</b>			
<b>APA (cm)</b>			CV(%) = 3,87
(TR)	2	0,233	NS
(T)	2	2089,83	0,00
(TR) x (T)	4	2,21	NS
<b>MSPA (mg)</b>			CV(%) = 13,53
(TR)	2	1,72	NS
(T)	2	1310,72	0,00
(TR) x (T)	4	1,21	NS
<b>CR (cm)</b>			CV(%) = 11,46
(TR)	2	4,74	0,01
(T)	2	401,28	0,00
(TR) x (T)	4	1,59	NS
<b>MSR (mg)</b>			CV(%) = 13,68
(TR)	2	4,56	0,01
(T)	2	1430,48	0,00
(TR) x (T)	4	0,66	NS

TR = tratamento; T = tempo; CV = coeficiente de variação; APA = altura da parte aérea; MSPA = massa seca de parte aérea; CR = comprimento de raiz; MSR = massa seca de raiz; N = teor de nitrogênio.

## APÊNDICE B



**Figura 4.** Curvas de amplificação em *qPCR* de amostras de raiz de milho controle (A); Curvas de amplificação em *qPCR* de amostras de folha de milho controle (B); Curvas de amplificação em *qPCR* de amostras de raiz de milho inoculado com *H. seropedicae* SmR1 (C); Curvas de amplificação em *qPCR* de amostras de folha de milho inoculado com *H. seropedicae* SmR1 (D); curvas de amplificação em *qPCR* da diluição seriada de DNA de *H. seropedicae* SmR1 (E); Curva padrão obtida a partir da diluição seriada do DNA de *H. seropedicae* SmR1 (F).