

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA**

**WILLIAN YUITI TAKAHASHI**

**ESTUDO DA MOBILIDADE DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE EM GRAMÍNEAS  
SOB DIFERENTES FORMAS DE INOCULAÇÃO**

**PONTA GROSSA**

**2022**

**WILLIAN YUITI TAKAHASHI**

**ESTUDO DA MOBILIDADE DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE EM GRAMÍNEAS  
SOB DIFERENTES FORMAS DE INOCULAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, curso de Mestrado da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Área de concentração: Ciência do Solo e Recursos Ambientais. Linha de Pesquisa: Uso e Manejo de Recursos Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto  
Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Dario Cassán

**PONTA GROSSA  
2022**

T136 Takahashi, Willian Yuiti  
Estudo da mobilidade de Azospirillum brasilense em milho sob diferentes métodos de inoculação / Willian Yuiti Takahashi. Ponta Grossa, 2022. 97 f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Ciência do Solo e Recursos Ambientais), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Mazer Etto.  
Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Dario Cassán.

1. Bactérias promotoras - crescimento vegetal. 2. Qpcr. 3. Interação planta-bactéria. I. Etto, Rafael Mazer. II. Cassán, Fabrício Dario. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciência do Solo e Recursos Ambientais. IV.T.

CDD: 633



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: "**Estudo da mobilidade do Azospirillum brasiliense em gramíneas sob diferentes formas de inoculação**".

Nome: **WILLIAN YUITI TAKAHASHI**

Orientador: Rafael Mazer Etto

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Rafael Mazer Etto

Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

Prof. Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos

Ponta Grossa 30, de junho, de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **André Luiz Martinez de Oliveira, Usuário Externo**, em 04/07/2022, às 19:39, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Mazer Etto, Professor(a)**, em 05/07/2022, às 10:40, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Humberto Josué de Oliveira Ramos, Usuário Externo**, em 06/07/2022, às 15:30, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **1031635** e o código CRC **C0615814**.

Dedico aos meus pais, irmãs,  
familiares, amigos e mestres.

## AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer à minha família. Agradeço especialmente aos meus pais, Walter e Cecília, que me apoiaram ao longo dessa longa caminhada e por proporcionarem essa incrível oportunidade. Agradeço às minhas irmãs, Letícia e Andressa, pelo incentivo incondicional. Agradeço a Biga pelo companheirismo.

Agradeço aos Ditchans Pedro e Takao, Batchan Hiromi e Sakurai – tios, tias, primos e primas.

Um agradecimento muito especial aos meus orientadores, “os profs” Carol e Rafa, que me guiaram, acolheram, aconselharam, incentivaram e inspiraram durante esses sete anos iniciais da minha trajetória acadêmica. Horas e horas de reuniões produtivas, divertidas e inspiradoras. Incontáveis experimentos. Inúmeros *insights* de experimentos que gerariam um *short*. Nossa viagem juntos para o RELARE em Puerto Varas. Foram 7 anos constituídos de pequenos momentos que com toda certeza lembrarei com todo o carinho.

Agradeço ao meu coorientador, o prof. Dr. Fabrício Cassán, por acreditar em mim, pelo apoio e disponibilidade.

Agradeço enormemente ao melhor grupo de pesquisa que poderia pedir. Minha mãe, irmã e filha científicas: Salomé, Laís e Anna Cecília. Sem vocês nada disso seria possível.

Agradeço a todos que me ajudaram na execução desse projeto de mestrado: Anna Cecília, Salomé, Marília, Calistene, Flávia, Laís e Maria Isabel.

Agradeço a todos os colegas com quem compartilhei meus dias no LABMOM durante esses anos: Ana Kelly, Anna Cecília, Breno, Calistene, Daiane, Daniel, Diego, Douglas, Erick, Fer, Flávia, Hely, Laís, Letícia, Lígia, Marcia, Marília, Michele, Nicolý, Pedro, Rapha, Rennan, Rodrigo, Ronaldo, Salo, Satomi, Sílvia, Tami, Veni e Well.

Agradeço à Universidade Estadual de Ponta Grossa, aos docentes, coordenadores, administradores e demais servidores.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e Fundação Araucária por tornar o trabalho possível.

“O segredo da vida é o solo, porque do solo dependem as plantas, a água, o clima e a nossa vida. Tudo está interligado. Não existe ser humano sadio se o solo não for sadio” (Ana Primavesi)

## RESUMO

A inoculação de *Azospirillum brasilense* em milho se tornou uma prática comum entre os agricultores latino-americanos, possibilitando aumentos produtivos, eficiência no uso de água e nutrientes e resistência a estresses ambientais. Bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* podem ser de vida livre, rizosféricas, epifíticas ou endofíticas facultativas. Conhecer o nível de associação entre a planta e a bactéria é importante para a escolha do método apropriado de inoculação. Diante disso, o objetivo do projeto foi monitorar a colonização de três estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5, Az39 e HM053) inoculadas por três métodos de inoculação (semente, foliar e solo) em plantas de milho. Para isso, foram cultivadas plantas de milho em casa de vegetação por 42 dias. Ao longo do experimento as populações de *A. brasilense* nas raízes e parte aérea foram mensuradas por qPCR, variando entre  $10^3$  e  $10^7$  UFC planta<sup>-1</sup>, a depender do método de inoculação e do estágio de desenvolvimento do milho. As estirpes Ab-V5 e HM053 colonizam eficientemente a rizosfera e raízes, não apresentando mobilidade pela planta. Por outro lado, Az39 demonstrou comportamento sistêmico, podendo translocar das raízes para a parte aérea e vice-versa. A inoculação de Ab-V5 e Az39 demonstraram os melhores resultados com relação a promoção de crescimento quando inoculado via solo, enquanto para HM053 a inoculação via sementes gerou melhores resultado em relação aos demais métodos.

Palavras-chave: Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal; qPCR; interação planta-bactéria

## ABSTRACT

Inoculation of *Azospirillum brasilense* in maize has become a standard practice among Latin American farmers, providing greater productivity, efficiency in the use of water and nutrients and resistance to environmental stresses. Members of the genus *Azospirillum* can be free-living, rhizospheric, epiphytic or facultative endophytes. Knowing the level of association between the plant and the bacterium is important for choosing the appropriate inoculation method. Therefore, the objective of the project was to monitor the colonization of three *A. brasilense* strains (Ab-V5, Az39 and HM053) inoculated by three inoculation methods (seed, foliar and soil) in maize plants. For this, maize plants were grown in a greenhouse for 42 days. Throughout the experiment, *A. brasilense* populations in the roots and shoots were accessed by qPCR ranging from  $10^3$  to  $10^7$  CFU plant<sup>-1</sup>, depending on the inoculation method and the maize development stage. The Ab-V5 and HM053 strains showed to efficiently colonize the rhizosphere and roots, showing no mobility through the plant. On the other hand, Az39 showed systemic behavior, being able to translocate from roots to shoots and vice versa. The inoculation of Ab-V5 and Az39 presented the best results in terms of growth promotion when inoculated via soil, while for HM053 inoculation via seeds got better results than the other methods.

Keywords: Plant Growth Promoting Bacteria; qPCR; plant-bacteria interaction

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do experimento em casa de vegetação .....	33
Figura 2 - Curva de crescimento de <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 em formulação FORM15, sob agitação orbital (180 rpm) a 30 °C. ....	37
Figura 3 - Fase Exponencial da curva de crescimento de <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5 (A), Az39 (B) e HM053 (C) em formulação FORM15, sob agitação orbital (180 rpm) a 30 °C. ....	39
Figura 4 - População de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 nas raízes de plantas inoculadas via sementes (A) e na parte aérea de plantas inoculadas via foliar (B). As plantas foram cultivadas em solo esterilizado. ....	41
Figura 5 - Massa Fresca de Parte Aérea (A) e Raízes (B) de milho inoculado com <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 via Sementes e Foliar. ....	44
Figura 6 - Curva de Desnaturação ( <i>melting curve</i> ) resultantes do produto da amplificação por qPCR utilizando o par de primers Azo-2 (A) e Azo-WM (B). ....	50
Figura 7 - Anelamento inespecífico do primer Azo-2F em <i>A. brasilense</i> Az39 .....	50
Figura 8 - Otimização da concentração do par de primer Azo-WM (F e R).....	51
Figura 9 - Curva padrão para a quantificação de <i>A. brasilense</i> por qPCR utilizando o par de primers Azo-WM em parte aérea (A) e raízes (B) de plantas de milho .....	52
Figura 10 - População de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via sementes, folhas e solo na parte aérea (A) e raízes (B). ....	54
Figura 11 - População nas raízes de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via semente na 1ª Coleta (7 dias após a emergência). ....	55
Figura 12 - População nas raízes de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via semente na 2ª Coleta (14 dias após a emergência). ....	56
Figura 13 - População de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via semente, folha e solo, na 3ª Coleta (21 dias após a emergência) na parte aérea (A e B) e raízes (C e D). ....	58
Figura 14 - População de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via semente, folha e solo, na 4ª Coleta (28 dias após a emergência) na parte aérea (A e B) e raízes (C e D). ....	60
Figura 15 - População de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via semente, folha e solo, na 5ª Coleta (42 dias após a emergência) na parte aérea (A e B) e raízes (C e D). ....	62
Figura 16 - Distribuição dos tratamentos baseados em parâmetros biométricos (MSPA, MSR, DC) por análise de componentes principais em 42 dias após a emergência (5ª coleta). ....	63
Figura 17 - Dendrograma baseado em BLAST genômico. ....	64
Figura 18 - Proteômica comparativa entre as estirpes de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053. ....	65
Figura 19 - Clusters gênicos codificadores de proteínas do sistema de secreção tipo VI (T6SS) das estirpes <i>A. brasilense</i> FP2, Ab-V5 e Az39- I (cromídeo) e Az39-II (plasmídeo). ....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise química do solo utilizado no experimento <i>in vitro</i> .....	32
Tabela 2 - Análise química do solo e substrato utilizado (solo+areia) antes da calagem e fertilização do experimento em casa de vegetação.....	34
Tabela 3 - Efeito da inoculação de três estirpes de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por dois métodos (Semente e Foliar) na massa fresca da parte aérea (MFPA) de plantas de milho. ....	44
Tabela 4 - Efeito da inoculação de três estirpes de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por dois métodos (Semente e Foliar) na massa fresca da raiz (MFR) de plantas de milho. ....	45
Tabela 5 - Efeito da inoculação de três estirpes de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por três métodos (Semente, Foliar e Solo) na massa fresca da parte aérea (MFPA) de plantas de milho. ....	46
Tabela 6 - Efeito da inoculação de três estirpes de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por três métodos (Semente, Foliar e Solo) na massa seca da parte aérea (MSPA) de plantas de milho. ....	47
Tabela 7 - Efeito da inoculação de três estirpes de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por três métodos (Semente, Foliar e Solo) na massa fresca de raízes (MFR) de plantas de milho.....	47
Tabela 8 - Efeito da inoculação de três estirpes de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por três métodos (Semente, Foliar e Solo) na massa seca de raízes (MSR) de plantas de milho.....	48
Tabela 9 - Efeito da inoculação de três estirpes de <i>A. brasilense</i> Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por três métodos (Semente, Foliar e Solo) no diâmetro do colmo (DC) de plantas de milho.....	49

## LISTA DE SIGLAS

BPCV	Bactérias Promotoras de Crescimento Vegetal
DAE	Dias Após a Emergência
DC	Diâmetro de Colmo
MFPA	Massa Fresca de Parte Aérea
MFR	Massa Fresca de Raiz
MSPA	Massa Seca de Parte Aérea
MSR	Massa Seca de Raiz
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)</b> ...	<b>16</b>
2.2	AZOSPIRILLUM BRASILENSE .....	18
2.3	CULTURA DO MILHO .....	21
2.4	COLONIZAÇÃO DE PLANTAS POR MICRORGANISMOS COM ÊNFASE EM AZOSPIRILLUM .....	22
2.5	MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE BPCV .....	24
2.5	MONITORAMENTO DE BPCV .....	26
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1</b>	<b>CURVA DE CRESCIMENTO DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE</b> .....	<b>31</b>
4.2	PREPARO DO INOCULANTE .....	31
4.3	ENSAIO “IN VITRO” .....	31
4.4	ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	33
4.5	QUANTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE <i>A. BRASILENSE</i> POR QPCR .....	34
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
4.7	GENÔMICA COMPARATIVA.....	36
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
5.1	.....CURVA DE CRESCIMENTO DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE EM FORM15 .....	37
5.2	ENSAIO IN VITRO .....	40
5.2.1	Quantificação e Detecção de <i>A. brasilense</i> em Milho por Método de Cultivo em Placa Associado a PCR de Colônia.....	40
5.2.2	Promoção de crescimento vegetal por <i>a. Brasilense</i> .....	42
5.3	ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO .....	45
5.3.1	Efeito da Inoculação de <i>A. brasilense</i> na Promoção de Crescimento Vegetal .....	45
5.3.1.1	Massa fresca e seca de parte aérea .....	45
5.3.1.2	Massa fresca e seca de raiz .....	47

5.3.1.3	Diâmetro de Colmo .....	48
5.3.2	Quantificação da População de <i>A. brasilense</i> por PCR em Tempo Real (qPCR) ...	49
5.3.2.1	Desenho do <i>primer</i> específico para <i>A. brasilense</i> .....	49
5.3.2.2	Construção da curva padrão para quantificação de <i>A. brasilense</i> por qPCR.....	51
5.3.2.3	Quantificação da população de <i>A. brasilense</i> em milho .....	52
5.3.2.3.1	<i>Coleta 1 (7 DAE)</i> .....	54
5.3.2.3.2	<i>Coleta 2 (14 DAE)</i> .....	55
5.3.2.3.3	<i>Coleta 3 (21 DAE)</i> .....	56
5.3.2.3.4	<i>Coleta 4 (28 DAE)</i> .....	58
5.3.2.3.5	<i>Coleta 5 (42 DAE)</i> .....	60
5.3.3	Análise de Componentes Principais.....	62
5.4	GENÔMICA COMPARATIVA.....	63
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>70</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>71</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A população mundial estimada para 2100 é de 10,9 bilhões de pessoas, tendo um aumento da densidade demográfica ocorrendo principalmente nos países da África subsaariana (ONU, 2019). Em face do rápido aumento populacional, o suprimento da demanda por fontes de alimentos, fibras e energia torna-se uma preocupação mundial (FOLEY *et al.*, 2011; ONU, 2019). Entretanto, é consenso entre a comunidade científica que o aumento da produção não deve ocorrer em detrimento do desmatamento de vegetações nativas para conversão em terras agricultáveis (TILMAN *et al.*, 2011). Diante desse contexto, o incremento na produção deve ocorrer ancorado em três pilares: aumento da produtividade, intensificação dos sistemas agrícolas e recuperação de pastagens degradadas (CASSMAN; GRASSINI, 2020; FELTRAN-BARBIERI; FÉRES, 2021; PARRY; HAWKESFORD, 2010). Além disso, a busca pela maior eficiência no uso de recursos ambientais e a resistência aos estresses ambientais decorrentes da mudança climática mostram-se necessários para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas (AMELUNG *et al.*, 2020; CASSMAN; GRASSINI, 2020; MEENA *et al.*, 2015).

Em comparação com a década de 1960 a produtividade mundial de produtos agrícolas aumentou em torno de 2,4 vezes enquanto o uso de fertilizantes nitrogenados aumentou quase sete vezes (GLASS, 2003; GOULDING; JARVIS; WHITMORE, 2008; TILMAN *et al.*, 2002; ZAHOOR; OTTEN; WENDISCH, 2014). Nesse intervalo, o milho, uma das principais culturas agrícolas cultivadas no mundo, teve aumento na produção em 4,67 vezes, a área dobrou e a produtividade triplicou (FAO, 2022). Um dos fatores preponderantes no aumento da produtividade de milho foi o desenvolvimento de híbridos com alta responsividade a fertilização nitrogenada. Entretanto apenas 20-50% do nitrogênio aplicado nos sistemas de produção são absorvidos (ABBASI; TAHIR; RAHIM, 2013, CONANT; BERDANIER; GRACE, 2013; CONIJN *et al.*, 2018) e o restante perdido por processos como a volatilização, lixiviação e perda pela desnitrificação (BOWLES *et al.*, 2018; LIU *et al.*, 2020).

Perante o exposto, a inoculação de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) é uma técnica viável para suprir a demanda por insumos nutrientes e protetores, que são demandados por um modelo de agricultura sustentável. As BPCV são procariotos capazes de colonizar o solo e plantas, provendo benefícios aos seus hospedeiros através de mecanismos como: fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios, solubilização de nutrientes e proteção contra estresses bióticos (p. ex. fitopatógenos) e abióticos (p. ex. déficit hídrico) (LOPES; DIAS-FILHO; GURGEL, 2021). Dessa maneira, a prática da inoculação com BPVC

possibilita a redução do uso de fertilizantes, a mitigação de estresses bióticos e abióticos e aumento da produtividade (GROVER *et al.*, 2021).

As BPCV podem ser caracterizadas de acordo com sua forma de interação com o hospedeiro, e podem ocorrer como bactérias de vida livre, ou formando associações estáveis com a planta, como bactérias rizosféricas, epifíticas e/ou endofíticas, em ordem crescente de intimidade com o hospedeiro (BACKER *et al.*, 2018). Os solos, ambientes naturalmente diversos, possuem uma riqueza e abundância de espécies microbianas fortemente influenciadas por fatores edafoclimáticos como pH, umidade e temperatura, assim como os tipos de uso e manejo do solo (ESTENDORFER *et al.*, 2017; FIERER; JACKSON, 2006). A rizosfera, que compreende a porção de solo sob direta influência das raízes, assim como o rizoplano, têm as suas comunidades microbianas moduladas pelo padrão de rizodeposição além de fatores edafoclimáticos e microbiológicos do solo não rizosférico (QU *et al.*, 2020). Por outro lado, as comunidades endofíticas são fortemente moduladas pelo genótipo, estágio de desenvolvimento e estado fisiológico da planta e pouco influenciadas pelas condições do solo (ESTENDORFER *et al.*, 2017; XIONG *et al.*, 2021).

O *Azospirillum* sp. tem sido um dos gêneros de BPCV mais estudados nos últimos 40 anos. Os principais mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal por *Azospirillum* sp. são: fixação biológica de nitrogênio; produção de fitormônios, especialmente auxinas, giberilinas, citocininas e etileno; produção de sideróforos; solubilização de fósforo; biocontrole de fitopatógenos; e proteção de plantas contra estresse salino e compostos tóxicos (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016).

A espécie *A. brasilense* foi inicialmente descrita como rizosférica e epifítica (TARRAND; KRIEG; DOBEREINER, 1978), entretanto estirpes endofíticas foram posteriormente descritas (GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012; MALINICH; BAUER, 2018; PUENTE *et al.*, 2020). Na América do Sul, *A. brasilense* Ab-V5 e Az39 são as estirpes com maior representatividade com relação a área inoculada (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2021) e número de inoculantes (CONIGLIO *et al.*, 2019), respectivamente.

No Brasil, são anualmente utilizadas 10,5 milhões de doses com *Azospirillum brasilense* das estirpes Ab-V5 e Ab-V6, sendo o milho a principal cultura inoculada (CASSÁN *et al.*, 2020; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2021). Diante desse contexto, vários experimentos de inoculação de *A. brasilense* em gramíneas têm sido conduzidos em condição controlada e a campo. No entanto, a eficiência da inoculação se mostrara bastante variável entre os diversos estudos, em função da diversidade de condições edafoclimáticas, genótipos do hospedeiro e métodos de inoculação (BARBOSA *et al.*, 2022; DÍAZ-ZORITA *et al.*, 2015).

O principal método de inoculação do *Azospirillum* é via sementes, entretanto, há incompatibilidade entre o tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas e a inoculação de *A. brasilense* (SANTOS *et al.*, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2021). Diante disso, outras metodologias de inoculação vêm sendo estudadas a fim de evitar essa incompatibilidade (FUKAMI *et al.*, 2016).

Sabe-se que a efetividade e prevalência de BPCV depende da capacidade em colonizar e competir com os membros da comunidade residente nos diferentes compartimentos do solo e da planta (THIJS *et al.*, 2016). Ademais, é sabido que o método de inoculação é relevante na capacidade e eficiência da colonização de BPCV em diferentes compartimentos do solo e planta (AFZAL *et al.*, 2012), e que a abundância da BPCV inoculada nas raízes é um fator importante a ser considerado a fim de maximizar a produtividade das culturas (ZHAO *et al.*, 2011).

Diante desse contexto, o presente trabalho foi conduzido a fim de compreender a colonização de diferentes estirpes de *A. brasilense* na cultura do milho sob diferentes formas de inoculação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL (BPCV)

As plantas estão intimamente associadas a vários microrganismos que conferem um papel crucial no crescimento, tolerância a estresses e prevenção contra doenças (BERG, 2009; MENDES *et al.*, 2011; TRIVEDI *et al.*, 2020). Dentre esses microrganismos, as estirpes bacterianas foram denominadas bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) ou *plant growth-promoting bacteria (PGPB)* por Kloepper e Schroth (1981). Desde então, várias BPCV foram isoladas da rizosfera, endosfera e filosfera de uma ampla variedade de plantas. As BPCV promovem o crescimento de plantas por mecanismos como fixação biológica de nitrogênio, solubilização de minerais, produção de fitormônios, biodisponibilização de micronutrientes e biocontrole de insetos e fitopatógenos.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) consiste na transformação do gás dinitrogênio ( $N_2$ ), constituinte de 78% da atmosfera terrestre, em amônia ( $NH_3$ ). Esse mecanismo é amplamente distribuído entre bactérias simbióticas, associativas e de vida livre, em diversos filos, incluindo Pseudomonadota (Proteobacteria), Bacillota (Firmicutes), Actinomycetota (Actinobacteria), Cyanobacteria e Verrucomicrobiota (Verrucomicrobia) (DIXON; KAHN, 2004; FALLAH *et al.*, 2021; LIANG *et al.*, 2020). A FBN confere importante função no fornecimento de nitrogênio para as plantas, fornecendo parte (OLIVEIRA *et al.*, 2017; PEDROSA *et al.*, 2019) ou todo nitrogênio necessário para o desenvolvimento da planta (HUNGRIA *et al.*, 2006; VAN DEYNZE *et al.*, 2018), a depender do nível de associação entre as bactérias e a planta hospedeira. Embora a FBN confira vantagens evolutivas às bactérias diazotróficas, este é um processo energeticamente custoso que em condições ótimas gasta 16 MgATP para a conversão de  $N_2$  a amônia (SEEFELDT *et al.*, 2018). Além disso, a nitrogenase é sensível ao oxigênio, o que limita a realização a FBN em condição de alta tensão de  $O_2$  (DIXON; KAHN, 2004). Diante desses fatores, as bactérias realizam a regulação da FBN a nível transcricional e pós traducional, levando-se em conta os níveis de  $NH_4^+$  e  $O_2$  nas células (DIXON; KAHN, 2004), reduzindo gastos energéticos desnecessários.

Algumas BPCV são conhecidas por produzir e excretar uma grande variedade de fitormônios que proporcionam crescimento e reposta a estresses abióticos (KHAN *et al.*, 2020). Os fitormônios são reguladores de crescimento e desenvolvimento das plantas que também agem como sinais moleculares em resposta a estresses ambientais (FAHAD *et al.*, 2015). Além dos fitormônios produzidos pelas próprias plantas. O ácido indol acético (AIA), um dos

principais fitormônios produzidos por BPCV, é uma auxina capaz de induzir raízes mais longas, maior número de raízes secundárias, aumentar a biomassa radicular e reduzir o número e tamanho dos estômatos (ALARCÓN; SALGUERO; LLORET, 2019; KOLB; MARTIN, 1985; SOUSA *et al.*, 2021).

Em adição à biossíntese de fitormônios, algumas BPCV possuem a capacidade de solubilizar fósforo e potássio que se encontram no solo na forma não-lábil e torná-los disponíveis para absorção pelas plantas (AERON *et al.*, 2020). O fósforo e potássio em conjunto com o nitrogênio são os elementos requeridos em maior quantidade pelas plantas, sendo denominados macronutrientes primários. A solubilização de minerais ocorre através de mecanismos como liberação de ácidos orgânicos, lançamento de enzimas extracelulares na matriz do solo e mineralização biológica (liberação em decorrência da degradação do substrato) (HAN; LEE, 2006; SHARMA *et al.*, 2013).

Outro mecanismo presente em BPCV que atua na facilitação da nutrição de plantas envolve o suprimento de ferro, presente em várias enzimas e proteínas de importância para o metabolismo energético. O ferro é um dos elementos mais abundantes do planeta, entretanto em solos aerados encontram-se na forma de íon férrico ( $Fe^{+3}$ ) que é pouco solúvel e por isso está disponível em pequenas quantidades para assimilação pelas plantas (MA, 2005). Diante disso, alguns microrganismos evoluíram mecanismos especializados de assimilação do ferro, como a produção de sideróforos. Os sideróforos são moléculas de baixo peso molecular que agem como quelantes de ferro, permitindo a absorção do ferro pelas raízes das plantas (ARORA; TEWARI; SINGH, 2013; WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004).

Além da ação direta e indireta no fornecimento de nutrientes, as BPCV podem atuar na mitigação de efeitos prejudiciais ao desenvolvimento causados por fitopatógenos. As doenças de plantas podem causar consequências ecológicas, econômicas e sociais devastadoras. É estimado que os estresses bióticos causam em torno de 20 a 40% em perdas diretas nas principais culturas agrícolas (SAVARY *et al.*, 2012). Diante disso, o uso de pesticidas sintéticos tem se tornado uma prática consolidada na agricultura. Embora reduza as perdas, o uso intensivo de pesticidas causa problemas ambientais e na saúde humana (TUDI *et al.*, 2021). Nesse contexto, algumas BPCV têm sido usadas como agentes de biocontrole de fitopatógenos através do antagonismo, competição por recursos e indução de resistência sistêmica (HEO; KOO; CHOI, 2022; MENDES *et al.*, 2011; SHALEV *et al.*, 2022).

## 2.2 AZOSPIRILLUM BRASILENSE

O gênero *Spirillum* foi descrito pela primeira vez por Beijerinck (1925). Após a descoberta da capacidade dessas bactérias em fixar nitrogênio foi reclassificado como *Azospirillum* (TARRAND *et al.*, 1978). Desde a descoberta do comportamento diazotrófico, o *Azospirillum* tem sido um dos gêneros de bactérias promotoras de crescimento vegetal mais estudados nos últimos 40 anos.

O gênero *Azospirillum* está inserido na família Azospirillaceae, ordem Rhodospirillales, classe Alphaproteobacteria e filo Pseudomonadota (ou Proteobacteria, antes da mudança de nomenclatura (OREN; GARRITY, 2021)). Curiosamente, a maior parte dos gêneros filogeneticamente próximos ao *Azospirillum* possuem representantes de habitat aquático, enquanto as espécies de *Azospirillum* se encontram principalmente no solo e/ou associados às plantas. A partir de estudos genômicos foi constatado que a transição de *Azospirillum* da água para a terra ocorreu a aproximadamente 400 milhões de anos, coincidindo com o surgimento das plantas vasculares (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011). Durante essa transição, vários genes relacionados a funções críticas para a sobrevivência no solo e em associação com plantas foram horizontalmente transferidos de bactérias terrestres (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011).

O genoma de *Azospirillum* é constituído pelo cromossomo circular único e mais 3 a 6 replicons, de tamanho total entre 6,5 e 7,6 Mb (CABALLERO-MELLADO; LOPEZ-REYES; BUSTILLOS-CRISTALES, 1999; HUNGRIA; RIBEIRO; NOGUEIRA, 2018; KANEKO *et al.*, 2010; KWAK; SHIN, 2015; MARTIN-DIDONET *et al.*, 2000; RIVERA *et al.*, 2014; SANT'ANNA *et al.*, 2011; WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2018). Os replicons podem ser classificados como plasmídeos ou cromídeos, sendo que para cumprir o critério de cromídeo o replicon deve conter genes considerados como essenciais (HARRISON *et al.*, 2010). Juntos, cromídeos e plasmídeos compõe a maior parte do genoma de *Azospirillum*, de 55 a 60% do genoma, e possui o maior número de cromídeos entre todos os genomas bacterianos sequenciados (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2012).

Vinte e três espécies do gênero *Azospirillum* foram validamente publicadas e catalogadas de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura de Procariotos (ICNP), sendo as espécies *A. brasilense* e *A. lipoferum* (TARRAND *et al.*, 1978) as primeiras a serem descritas e *A. baldaniorum* (FERREIRA *et al.*, 2020), *A. cavernae* (ZHU *et al.*, 2021) e *A. thermophilum* (ZHAO *et al.*, 2020) as últimas (acesso em 05/07/2022). Essas espécies estão distribuídas ao redor de todo o mundo e têm sido isoladas em diversos habitats, como solo,

rizosfera e diferentes órgãos vegetais (BALDANI *et al.*, 1986; ELBELTAGY *et al.*, 2001, REIS *et al.*, 2015; TARRAND *et al.*, 1978).

Os principais mecanismos envolvidos na promoção de crescimento vegetal por *Azospirillum* sp. são: fixação biológica de nitrogênio; produção de fitormônios, especialmente auxinas, giberilinas, citocininas e etileno; produção de sideróforos; solubilização de fosfato; biocontrole de patógenos; e proteção de plantas contra estresse salino e compostos tóxicos (CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016).

A fim de compreender o crescimento de plantas promovido por *Azospirillum* alguns autores propuseram suas hipóteses a respeito do modo de ação dessa BPCV. A primeira hipótese foi proposta pelos pesquisadores Yoav Bashan e Hanna Levanony em 1990, a “Hipótese Aditiva” defendia que o crescimento de plantas promovido por *Azospirillum* sp. acontece em decorrência de múltiplos mecanismos operando ao mesmo tempo ou consecutivamente (BASHAN; LEVANONY, 1990). Após 20 anos, Bashan e de-Bashan (2010) propuseram a “Hipótese dos Múltiplos Mecanismos”, onde em cada caso de inoculação, uma combinação de poucos ou vários mecanismos são responsáveis pela promoção de crescimento vegetal por *Azospirillum*. Recentemente, Cassán e colaboradores (2020) propuseram a “Hipótese da Aquisição Eficiente de Nutrientes”, a qual defende que a promoção de crescimento ocorre por dois mecanismos principais: a fixação biológica de nitrogênio e a produção de fitormônios, os quais são induzidos por bactérias que efetivamente colonizaram as plantas hospedeiras.

Na última atualização, existiam na América Latina 106 produtos biológicos registrados à base de *Azospirillum brasilense*, dos quais 79 possuem como ingrediente ativo a estirpe Az39 e 18 Ab-V5 e Ab-V6 (CASSÁN *et al.*, 2020). No Brasil, todos os inoculantes contendo *Azospirillum* sp. são formulados com a estirpe *A. brasilense* Ab-V5 podendo estar associado à estirpe Ab-V6.

As estirpes Ab-V5 e Ab-V6 – derivadas de Sp7 – são as estirpes oficialmente autorizadas como inoculantes para a cultura do milho (HUNGRIA *et al.*, 2010; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2021), sendo aplicados anualmente 10,5 milhões de doses dos inoculantes a base dessas estirpes no Brasil (SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2021). A estirpe *A. brasilense* Sp7 foi isolada da rizosfera de capim-pangola (*Digitaria decumbens*) por Johanna Döbereiner no Rio de Janeiro (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978).

A estirpe Az39 foi isolada em Marco Juarez, Córdoba, Argentina em 1982 pelo programa de isolamento e seleção de estirpes de *Azospirillum* sp. do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária da Argentina (INTA). Essa estirpe foi obtida através do isolamento

de bactérias em raízes de trigo superficialmente esterilizadas (CONIGLIO *et al.*, 2019). A efetividade da inoculação em milho e trigo foi comprovada pelo aumento da produção de 13 a 33% (OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994; RODRIGUEZ-CÁCERES *et al.*, 1996). Com isso, a indústria Argentina se prontificou a produzir inoculantes a base de *A. brasilense* Az39, atualmente 75% dos inoculantes produzidos na América do Sul são formulados com essa estirpe (79 produtos) (CASSÁN *et al.*, 2020).

A promoção de crescimento e aumento de produtividade por *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 no Brasil e Az39 na Argentina é amplamente reportado na literatura. A partir de meta-análises foi observado a eficácia da inoculação de Ab-V5 e Ab-V6 em milho (BARBOSA *et al.*, 2022) e co-inoculado com *Bradyrhizobium* em soja (BARBOSA *et al.*, 2021). A partir de ensaios conduzidos na Argentina, a inoculação de Az39 também se mostrou efetiva em cereais de inverno, cereais de verão e na co-inoculação com leguminosas (DÍAZ-ZORITA; FERNANDEZ-CANIGIA, 2009; DÍAZ-ZORITA *et al.*, 2015; OKON; LABANDERA-GONZALEZ, 1994).

Além das estirpes empregadas em inoculantes comerciais foram descritas na literatura várias outras estirpes de *A. brasilense* com ação promotora do crescimento de plantas. Entre as diversas linhagens de *A. brasilense*, a estirpe HM053 (Sp7 ATCC 29145 Sm<sup>R</sup>, Nal<sup>R</sup>, EDA<sup>R</sup>), mutante espontâneo da estirpe FP2 (MACHADO *et al.*, 1991), se destaca por excretar amônio constitutivamente. O HM053 apresenta uma mutação pontual (citosina para timina na posição 1040) no gene *glnA* que codifica para a enzima glutamina sintetase (*GlnA*). Essa enzima participa da principal via de assimilação de nitrogênio, catalisando a síntese de glutamina a partir de glutamato e amônia. A mutação desse único nucleotídeo gera uma *GlnA* com baixa atividade, comprometendo a regulação da FBN, o que resulta na atividade constitutiva da fixação biológica de nitrogênio (GHENOV *et al.*, 2021; MACHADO *et al.*, 1991).

Ao fixar nitrogênio constitutivamente, a estirpe HM053 excreta grande parte do amônio fixado, disponibilizando essa fonte de nitrogênio para as plantas. A inoculação dessa estirpe em *Setaria viridis*, planta modelo na interação gramínea-bactéria, supriu todo o nitrogênio necessário para o desenvolvimento robusto da planta em condições controladas (PANKIEVICZ *et al.*, 2015). Em trigo, HM053 promoveu aumento de 30% de massa seca da parte aérea e 49% da massa seca de raiz, quando comparado às plantas não inoculadas (SANTOS *et al.*, 2016). Santos e colaboradores (2017) verificaram promoção de crescimento, colonização e expressão de genes *nif in vivo* em cevada inoculada com HM053. Recentemente, em condição de campo, o HM053 foi capaz de promover um aumento de até 29% na

produtividade do milho em comparação com plantas não inoculadas, e até 21,9% quando comparada com a estirpe comercial Ab-V5 (PEDROSA *et al.*, 2019).

A inoculação de diversas estirpes de *Azospirillum brasilense* em diversas culturas se mostrou bastante promissora em experimentos conduzidos ao redor do mundo (BARBOSA *et al.*, 2022; CASSÁN; DIAZ-ZORITA, 2016; CASSÁN *et al.*, 2020; DÍAZ-ZORITA *et al.*, 2015; HUNGRIA *et al.*, 2021). Entretanto, as respostas variam em função da diversidade de condições edafoclimáticas, genótipos do hospedeiro, métodos de inoculação e fertilização empregados nos ensaios (BARBOSA *et al.*, 2022; BASHAN *et al.*, 2014; DÍAZ-ZORITA *et al.*, 2015; FAGERIA; STONE, 2006).

### 2.3 CULTURA DO MILHO

Estudos genéticos e arqueológicos indicam que o milho foi domesticado a cerca de cinco mil anos no México (KISTLER *et al.*, 2018; MATSUOKA *et al.*, 2002; PIPERNO *et al.*, 2009; RANERE *et al.*, 2009; VAN HEERWAARDEN *et al.*, 2011). Durante a difusão, o milho se adaptou a diversos habitats resultando em uma ampla distribuição, tanto em latitude (do vale central chileno ao Canadá) quanto em altitude (de zero a 3.400 m) (VIGOUROUX *et al.*, 2008).

Segundo os dados da FAO (2022), na safra 2020/2021 o milho foi cultivado em 202 milhões de hectares ao redor do mundo. Sendo que a maior área plantada se encontra na China, onde foram cultivados 41,3 mi ha (20,4% do total da área plantada). Entretanto, a maior produção é tida nos EUA, com produção anual de 360,2 milhões de toneladas (31,0% do total produzido). Juntos, Estados Unidos e China são responsáveis pela produção de 53,4% da produção mundial de milho.

O Brasil por sua vez é o terceiro maior produtor de milho, representando 8,9% (103,9 mi toneladas) da produção mundial e 9,0% (18,3 mi hectares) da área total cultivada (FAO, 2022). Os principais estados produtores são Mato Grosso, Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul, representando 35,4%; 16,5%; 9,8% e 9,8%, respectivamente (CONAB, 2022). Juntos, os quatro estados são responsáveis por mais de 70% da produção nacional de milho (CONAB, 2022).

O cultivo de milho no Brasil é caracterizado pelo plantio em duas safras principais: a safra de verão (primeira safra) e a safrinha (segunda safra). Os plantios de verão são realizados por todo o Brasil durante o período chuvoso, que ocorre no final de agosto no Sul e entre os meses de outubro e novembro no Sudeste e Centro-Oeste. A safrinha é semeada geralmente no primeiro trimestre do ano após o cultivo de soja precoce, principalmente no Centro-Oeste, Sudeste e no Paraná. De acordo com a Conab, na safra 2020/2021 a safrinha foi responsável

por 60,7 milhões de toneladas (69,7% da safra total), enquanto a primeira safra foi responsável por apenas 24,7 milhões de toneladas (28,4%). Os 1,9% restantes são provenientes da chamada 3ª safra, que ocorre em alguns estados do norte e nordeste brasileiro, com as semeaduras ocorrendo entre abril e junho.

O milho (*Zea mays* L.) pertence a família Poaceae (anteriormente denominada Gramineae), possui metabolismo de fixação de carbono do tipo C4 e é uma das plantas mais eficientes em acumular energia na forma de fotoassimilados. No entanto, o milho necessita de grandes quantidades de fertilizantes, dentre eles destacam-se os nitrogenados (TEIXEIRA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017).

Atualmente o milho é considerado alimento básico para diversas populações ao redor do mundo, suprimindo aproximadamente 6% das calorias para humanos, além de ser utilizada amplamente na alimentação animal (FAO, 2022). Por ser base alimentar de populações americanas e africanas, o milho tem um importante papel para alcançar a segurança alimentar (NUSS; TANUMIHARDJO, 2010). Estima-se que o aumento populacional ocorrerá principalmente em decorrência da explosão da população dos países da África subsaariana (ONU, 2019). Diante disso, a fim de suprir a crescente demanda desse cereal serão necessárias medidas para o aumento da produção, melhoria da resiliência e incremento da sustentabilidade dos sistemas agrícolas (SHIFERAW *et al.*, 2011).

#### 2.4 COLONIZAÇÃO DE PLANTAS POR MICRORGANISMOS COM ÊNFASE EM AZOSPIRILLUM

O microbioma associado às plantas compreende um diverso grupo de microrganismos que interagem e colonizam solos e plantas em diferentes nichos, como regiões entre agregados do solo, rizosfera, rizoplano, endofítico radicular, endofítico sistêmico, filosfera, flores, frutos e sementes (MÜLLER *et al.*, 2016; VAN DER HEIJDEN; HARTMANN, 2016).

A rizosfera, porção de solo sob direta influência das raízes, e o rizoplano, camada epidérmica das raízes, são regiões de alta diversidade microbiana e nichos ecológicos de grande parte das BPCV isoladas (BERG *et al.*, 2005; THOMPSON *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2022). A colonização dessa região é modulada, principalmente, pelos exsudatos radiculares e pela biodiversidade da comunidade bacteriana do solo (PASCALE *et al.*, 2020). Sabe-se que parte do carbono fotossinteticamente fixado pelas plantas é exsudado pelas raízes na forma de carboidratos, ácidos orgânicos, aminoácidos entre outros compostos, os quais servem de fonte de nutrientes para os microrganismos associados (BAIS *et al.*, 2006; WALKER *et al.*, 2003).

Em relação a colonização da rizosfera e rizoplane por *Azospirillum* foram relatadas a importância da motilidade (ROSSI *et al.*, 2016), produção de polissacarídeos (SANTOYO *et al.*, 2016), receptores quórum-sensing (FUKAMI *et al.*, 2018) e quimiotaxia (O'NEAL; VO; ALEXANDRE, 2020). Além disso, alguns fatores extrínsecos como: fonte e dose de nitrogênio (NAHER *et al.*, 2018); pH (PINHEIRO *et al.*, 2002); espécie, cultivar e fase de desenvolvimento da planta (BASHAN, 1999; O'NEAL; VO; ALEXANDRE, 2020; SCHLOTTER; HARTMANN, 1998); textura e umidade do solo (BASHAN, 1999); e interações com a comunidade microbiana local (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; PINHEIRO *et al.*, 2002) podem interferir no processo de colonização da planta por *Azospirillum*, direta ou indiretamente.

Após estabelecer uma população na rizosfera e no rizoplane radicular, algumas bactérias colonizam o interior das raízes com subpopulações que variam de  $10^5$ - $10^7$  UFC g<sup>-1</sup> de raiz (GARRIDO-OTER *et al.*, 2018; HALLMANN, 2001; SESSITSCH *et al.*, 2012). Habilidades como produção de lipopolissacarídeos, flagelo, pili e capacidade de locomoção do tipo “twitching” afetam a colonização endofítica e a mobilidade de bactérias em direção ao interior da planta hospedeira (BALSANELLI *et al.*, 2010; 2013; 2016; BÖHM; HUREK; REINHOLD-HUREK, 2007; BUSCHART *et al.*, 2012). A diversidade de espécies na endosfera (endofíticas) é menor do que na rizosfera e no rizoplane, uma vez que existem requerimentos específicos de compatibilidade (genótipo vegetal- genótipo microbiano) para que um microrganismo colonize esse nicho sem causar patogenicidade (BULGARELLI *et al.*, 2012; HARDOIM *et al.*, 2015; PINSKI *et al.*, 2019). A colonização endofítica das raízes ocorre apenas por algumas estirpes de *Azospirillum*, como *A. baldaniorum* Sp245 (BALDANI; BALDANI; DOBEREINER, 1987; SCHLOTTER; HARTMANN, 1998), *A. lipoferum* B510 (ELBELTAGY *et al.*, 2001; KANEKO *et al.*, 2010), *A. brasilense* REC3 (GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012; PEDRAZA *et al.*, 2007), D7 (CORTÉS-PATIÑO *et al.*, 2021; PARDO-DÍAZ *et al.*, 2021) e Az39 (GARCIA *et al.*, 2020; MASCIARELLI *et al.*, 2013). O processo de colonização inicia principalmente através da zona de alongação e de pelos radiculares, especificamente nas rachaduras da epiderme causadas pela emergência de raízes laterais (NAHER *et al.*, 2018; O'NEAL; VO; ALEXANDRE, 2020; RAMOS *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2017a).

Ao penetrarem nas raízes, as bactérias se deparam com uma barreira na zona cortical, denominada endoderme (estrias de Caspary). Alguns endofíticos são capazes de secretar enzimas degradadoras de parede celular permitindo a colonização pela endoderme. Outros atravessam passivamente durante o crescimento de raízes secundárias, as quais partem do periciclo e rompem a barreira endodérmica (GREGORY, 2007). Após atravessar a barreira

endodérmica, as bactérias endofíticas penetram o periciclo e atingem os vasos do xilema (COMPANT *et al.*, 2005, 2008; JAMES *et al.*, 2002). Ao atingir os vasos do xilema, populações de  $10^3$ - $10^4$  UFC  $g^{-1}$  de tecido são translocadas para o caule, folhas, frutos e sementes (HALLMANN, 2001). Os flagelos e a transpiração governam o movimento dessas bactérias no interior da planta (COMPANT *et al.*, 2005; JAMES *et al.*, 2002). O movimento de *Azospirillum* das raízes para a parte aérea foi reportado anteriormente em *A. lipoferum* B510 (KANEKO *et al.*, 2010), *A. brasilense* REC3 (GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012) e *A. brasilense* Sp7 (MALINICH; BAUER, 2018).

Embora a colonização de bactérias ocorra prioritariamente via raízes, algumas bactérias possuem a capacidade de colonizar a superfície foliar (filosfera). Recentemente foi reportado que a estirpe de *A. brasilense* Az19, filogeneticamente próxima a Az39, possui sinais de comportamento filosférico (GARCÍA *et al.*, 2020). Por outro lado, as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 não parecem ter sucesso na colonização desse nicho (FUKAMI *et al.*, 2017).

## 2.5 MÉTODOS DE INOCULAÇÃO DE BPCV

É amplamente aceito que a efetividade e prevalência de BPCV depende da versatilidade de assimilação de rizodeposições, capacidade de adaptação a mudanças ambientais, habilidade de colonização e competição com o microbioma nativo das plantas por nichos específicos (BRIMECOMBE; DE LEIJ; LYNCH, 2007; THIJIS *et al.*, 2016). Diante disso, a variabilidade de respostas em decorrência da inoculação de BPCV tem como uma das possíveis causas o método de inoculação utilizado, que pode facilitar ou dificultar a colonização dessas bactérias. Portanto, a fim de aumentar as taxas de sucesso no uso de inoculantes a base de BPCV, é necessário que se conheça a melhor forma, dose e momento de inoculação.

Os métodos de inoculação têm por objetivo colocar as BPCV em contato com a planta hospedeira, permitindo o estabelecimento da bactéria e conseguinte promoção de crescimento (HERNÁNDEZ-MONTIEL *et al.*, 2017). Diante disso, a inoculação de BPCV deve ser feita visando a proximidade da bactéria com a planta hospedeira, principalmente quando a estirpe possui uma motilidade reduzida ou uma baixa competitividade (LOPES; DIAS-FILHO; GURGEL, 2021). Dentro desse contexto, várias técnicas de inoculação foram desenvolvidas, sendo a inoculação via sementes a mais comumente empregada.

A inoculação de BPCV via sementes consiste na aplicação de quantidade conhecida de inoculante nas sementes, podendo ser em forma líquida ou sólida. Outra forma de inocular nas sementes é por meio da sua imersão em suspensão bacteriana de concentração conhecida por

tempo determinado (LI *et al.*, 2019). O processo de germinação das sementes libera grande quantidade de carboidratos e aminoácidos na forma de exsudados seminais, e estas fontes de carbono são utilizadas pelas BPCVs como fonte nutricional até a emergência das raízes seminais (MARTINS *et al.*, 2018; SCHILTZ *et al.*, 2015). Esse método de inoculação tem como vantagens o contato direto do inoculante com a planta desde o início de seu desenvolvimento, e a facilidade do processo de inoculação. Entretanto, a incompatibilidade dos microrganismos presentes no inoculante com alguns fungicidas e inseticidas aplicados como tratamento de sementes é uma desvantagem importante do método (AHEMAD; KHAN, 2013; SANTOS *et al.*, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2022).

Outra importante forma de inoculação é a inoculação via solo. Essa forma de inoculação engloba vários métodos, como inoculação no sulco de semeadura, pulverização sobre o solo e incorporação no substrato. As inoculações no sulco de semeadura e pulverização sobre o solo foram propostas visando evitar o contato direto das bactérias com os pesticidas aplicados via sementes, no entanto são necessárias doses mais altas e os resultados são variáveis (FUKAMI *et al.*, 2016; HUNGRIA, NOGUEIRA, ARAUJO; 2013, 2015). A inoculação via incorporação no substrato é inviável de ser realizada em cereais, entretanto pode ser uma solução para culturas propagadas por mudas, como hortaliças, frutíferas e espécies arbóreas.

A inoculação via foliar de BPCV é um método raro e pouco utilizado (LOPES; DIAS-FILHO; GURGEL, 2021). As inoculações via pulverização foliar são mais comuns para microrganismos de controle de doenças foliares e insetos praga (GARRIDO-JURADO *et al.*, 2017; MINCHEV *et al.*, 2021). Entretanto, outras BPCV têm sido inoculadas via foliar como *H. seropedicae* (CANELLAS *et al.*, 2015), *A. agilis* (RAMIREZ-ORDOICA *et al.*, 2020), *Pseudomonas* (ESITKEN *et al.*, 2006), *Bacillus* (ESITKEN *et al.*, 2006) e *A. brasilense* (FUKAMI *et al.*, 2016; HUNGRIA *et al.*, 2021; PUENTE *et al.*, 2018). A inoculação de rizobactérias via foliar parece ser contraintuitivo, no entanto algumas BPCV possuem a capacidade de acessar o interior das plantas por meio de aberturas naturais como os estômatos e hidatódios, estabelecendo uma população ativa no interior da planta (COMPANT; CLEMENT; SESSITSCH, 2010; OROZCO-MOSQUEDA *et al.*, 2018).

Além desses métodos, alguns métodos de inoculação alternativos têm surgido recentemente. O encapsulamento de BPCV se apresenta como uma alternativa para a liberação gradual e proteção das bactérias contra estresses bióticos e abióticos, entretanto desafios como adequação das propriedades físico-químicas, degradabilidade, estabilização das bactérias e custo do preparo ainda precisam ser enfrentados (MEFTAH-KADMIRI *et al.*, 2021; PEREZ *et al.*, 2018; RISEH *et al.*, 2021; SCHOEBITZ; LÓPEZ; ROLDÁN, 2013; SZOPA *et al.*, 2022;

VEJAN *et al.*, 2019). Outra tecnologia emergente a ser aplicada futuramente consiste na inoculação de bactérias endofíticas por meio de insetos vetores, visto que alguns insetos inoculam BPCV diretamente nos vasos condutores ao se alimentarem da seiva (FRENCH *et al.*, 2021; GALAMBOS *et al.*, 2021; LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2017).

No que se refere a inoculação de *Azospirillum brasilense*, os métodos de inoculação mais comuns são através do trato das sementes com inoculantes líquidos (CAIRES *et al.*, 2021; HUNGRIA *et al.*, 2010; PEDROSA *et al.*, 2019; URREA-VALÊNCIA *et al.*, 2021), bem como aplicando-os diretamente no sulco de semeadura (MORAIS *et al.*, 2016; LIBORIO *et al.*, 2020; NAOE *et al.*, 2020). A aplicação via foliar também é uma opção de inoculação, entretanto possuem resultados controversos e recomendações não totalmente elucidadas (CARDOZO *et al.*, 2022; FILIPINI *et al.*, 2021; FUKAMI *et al.*, 2016, 2017; HUNGRIA *et al.*, 2021; PUENTE *et al.*, 2018). A inoculação feita nas sementes é realizada em conjunto com fungicidas, inseticidas, micronutrientes e polímeros os quais afetam a viabilidade do *A. brasilense* (SANTOS *et al.*, 2020; TAKAHASHI *et al.*, 2021). Fukami e colaboradores (2016) compararam diversos modos de inoculação de *A. brasilense* e identificaram métodos alternativos à inoculação de sementes (pulverização foliar, pulverização no solo e no sulco de semeadura). Na meta-análise conduzida por Barbosa e colaboradores (2022) foi observado que em milho a inoculação de *A. brasilense* via sementes é mais efetiva do que a inoculação via foliar, e que o momento de aplicação via foliar interfere na efetividade da inoculação.

## 2.5 MONITORAMENTO DE BPCV

Nos últimos anos dez anos os estudos relacionados ao monitoramento de BPCV inoculadas nos ambientes, em especial em agro ecossistemas, tem aumentado significativamente. No entanto, menos de um quarto dos estudos publicados no tema BPCV consideraram métodos de monitoramento (RILLING *et al.*, 2019). Esse baixo número está relacionado a falta de disponibilidade de um método efetivo, barato e rápido para localizar, contar e avaliar a atividade das BPCV inoculadas (RILLING *et al.*, 2019).

As técnicas de monitoramento de BPCV podem ser classificadas em técnicas dependentes e independentes de cultivo. Os métodos dependentes de cultivo são os mais baratos e permitem a diferenciação de células viáveis e não viáveis. Entretanto a aplicação desses métodos em condição de campo é prejudicada pela diversidade bacteriana no solo cultivável em meio de cultura resultando em uma difícil diferenciação entre a estirpe inoculada e microrganismos não alvo (AL-AWARDHI *et al.*, 2013; NGOM; LIU, 2014). Além disso, ao

avaliar populações endofíticas através da desinfestação superficial dos tecidos pode-se superestimar as populações em decorrência de epifíticos resistentes ao protocolo de desinfestação (KANDEL *et al.*, 2017).

O principal método de monitoramento dependente de cultivo é a contagem em placas. Essa abordagem se baseia no cultivo de células bacterianas em meio sólido (ágar), que pode ter mais ou menos seletividade ao microrganismo-alvo. Fatores como disponibilidade (teores) e fonte (tipos) de nutrientes, pH e temperatura governam a seletividade do meio. Embora qualquer meio de cultura apresente certa seletividade, a ocorrência de microrganismos não alvo capazes de se multiplicar e formar colônias em um meio de cultura qualquer é um evento comum. Diante disso, a correta quantificação de uma estirpe bacteriana depende da identificação acurada de suas características morfo-fisiológicas quando cultivadas em um meio de cultura. Ademais, a técnica intrinsecamente subestima o tamanho da população, uma vez que parte das bactérias viáveis não se encontram em estado cultivável (AYRAPETYAN *et al.*, 2015; BODOR *et al.*, 2020; DAVIS, 2014). Com isso, o monitoramento realizado por essa abordagem permite apenas a verificação de morfologia, potencial atividade e características fisiológicas de determinados grupos bacterianos com funções específicas, mas não permitem sua verificação e quantificação acurada de espécies específicas (BLAGODATSKAYA; KUZYAKOV, 2013). No entanto, o uso de meios líquidos e semissólidos específicos para o isolamento resulta em culturas enriquecidas com o organismo alvo, podendo consistir em uma etapa prévia ao cultivo em placa (MALINICH; BAUER, 2018; VAN KESSEL *et al.*, 2015).

Os métodos independentes de cultivo aplicados ao monitoramento de microrganismos são geralmente baseados em características dos ácidos nucleicos, que são exploradas por ferramentas que em sua maioria são dependentes de PCR, como DGGE, T-RFLP, ARISA e ARDRA. Além das variantes da PCR, como MPN-PCR, C-PCR e qPCR. As técnicas baseadas na análise genética de polimorfismos (DGGE, T-RFLP, ARISA e ARDRA) são usadas para o estudo de comunidades complexas (CANFORA *et al.*, 2015; MAWARDA *et al.*, 2020), mas o monitoramento de espécies específicas por esses métodos mostrou não ser efetivo (HAN *et al.*, 2012; PELLEGRINO *et al.*, 2012).

Por outro lado, técnicas quantitativas de PCR, como MPN-PCR, C-PCR e qPCR, são promissoras para o monitoramento de estirpes microbianas em ambientes complexos é promissor (MANFREDINI *et al.*, 2021; MAUCLINE; KERRY; HIRSCH, 2002). Esses métodos são baseados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês, *Polymerase Chain Reaction*), a qual, possibilita a amplificação de regiões específicas do genoma através do uso de uma enzima DNA polimerase resistente a altas temperaturas, além de oligonucleotídeos

iniciadores (*primers*) e desoxirribonucleotídeos trifosfatados. As regiões amplificadas podem ser específicas a determinados grupos taxonômicos (gênero, espécie, estirpe) ou grupos funcionais (fixadores de nitrogênio, solubilizadores de fosfato, metanotróficos etc.).

A MPN-PCR, uma variação da técnica de contagem de microrganismos em meio de cultura, é baseada na combinação da PCR com o procedimento estatístico desenvolvido por McCrady (1915) denominado número mais provável (do inglês, *most probable number – MPN*). Esta técnica de contagem é baseada em diluições de amostras de DNA até a extinção seguida por replicatas técnicas de PCR para todas as diluições. Cada produto de PCR é pontuado como positivo ou negativo após a verificação da formação de bandas no gel de eletroforese. A partir das pontuações é estimado através da tabela de McCrady o número de cópias de determinado microrganismo ou gene por amostra. Por depender da avaliação probabilística de diluições seriadas de DNAs distintos é suscetível a resultados enviesados (GAMALERO *et al.*, 2003).

Por outro lado, a PCR competitiva (C-PCR) é uma técnica bastante acurada e barata. Entretanto, consiste em uma técnica trabalhosa e com maior chance de contaminação cruzada. A C-PCR consiste na coamplificação do DNA alvo e quantidades conhecidas de DNA competidor, o qual compartilha a maior parte da sequência nucleotídica com o DNA alvo. Dessa maneira, a C-PCR permite a quantificação absoluta do número de moléculas alvo em comparação com a quantidade de DNA competidor (ZENTILIN; GIACCA, 2007).

Por fim, a qPCR é o método mais utilizado, embora as demais técnicas sejam mais acessíveis (RILLING *et al.*, 2019). Nos últimos anos a qPCR tem sido a técnica escolhida para quantificação de populações bacterianas em amostras complexas uma vez que é altamente sensível, específica e relativamente rápida (COUILLEROT *et al.*, 2010; MANFREDINI *et al.*, 2021; SOARES *et al.*, 2021; STETS *et al.*, 2015; URREA-VALENCIA *et al.*, 2021). A técnica de PCR quantitativa em tempo real tem sido utilizada para o monitoramento de diversas espécies de BPCV em diferentes órgãos vegetais e tipos de solo, como *Azospirillum lipoferum* em raízes de milho (COUILLEROT *et al.*, 2010), *Pseudomonas fluorescens* em parte aérea de batata (HERNÁNDEZ *et al.*, 2020), *Bacillus bassiana* e *B. brongniartii* em solo (TARTANUS *et al.*, 2021), etc.

A metodologia de PCR em tempo real (qPCR) consiste no acompanhamento do número de cópias de um determinado fragmento de DNA a cada ciclo da reação de PCR. Esse acompanhamento é realizado através da leitura de fluorescência, a qual é proporcional ao número de fragmentos de DNA. Esta fluorescência é oriunda da intercalação de substâncias fluorescentes nas moléculas de DNA fita dupla (método SYBR Green) ou através da liberação de fluoróforo por uma sonda ao se ligar em uma região específica (método *TaqMan*).

O desenvolvimento da qPCR teve como propósito inicial estimar o número de cópias de um gene de interesse, monitorando a cinética ao longo da reação de PCR por meio da emissão de fluorescência (HIGUCHI, *et al.*, 1993; HOLLAND *et al.*, 1991). Posteriormente o seu uso foi estendido para outros propósitos como a quantificação de bactérias de importância clínica e mais recentemente, a qPCR está sendo utilizada para monitoramento de microrganismos de importância veterinária, ambiental e agrônômica, além de ser a base da análise de expressão gênica por RT-qPCR (BORCHARDT, *et al.*, 2021; KRALIK; RICCHI, 2017; VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008).

O termociclador de qPCR realiza a leitura da fluorescência a cada ciclo, e ao se cruzar o limite de fluorescência (na fase exponencial da amplificação) é determinado o ciclo de quantificação ou Cq. A partir do Cq obtido é possível quantificar o número inicial de gene alvo daquela amostra. Sendo que quanto maior a concentração de DNA inicial da amostra menor será o Cq, uma vez que esta amostra atingirá o limite de detecção com menos ciclos de amplificação.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Monitorar a população de três estirpes de *A. brasilense* (Ab-V5, HM053 e Az39) inoculadas via semente, raiz e folha na cultura do milho.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar a concentração e temperatura de anelamento do primer Azo-WM para quantificação de *A. brasilense* em tecidos de milho;
- Construir curvas padrões de PCR em tempo real (qPCR) com o primer Azo-WM para quantificação de *A. brasilense* nas partes aéreas e raízes de milho;
- Quantificar a população (em raiz e parte aérea) de *A. brasilense* (Ab-V5, HM053 e Az39) inoculadas via semente, raiz ou folha por qPCR sob condições monoxênicas em câmara de crescimento e não monoxênicas em casa de vegetação;
- Monitorar a promoção de crescimento vegetal por *A. brasilense* (Ab-V5, HM053 e Az39) inoculadas via semente, raiz e folha.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE

Colônias isoladas de *A. brasilense* Ab-V5, HM053 e Az39 foram obtidas em meio vermelho congo- RC (RODRIGUEZ-CÁCERES, 1982) a partir do estoque da coleção de microrganismos do LABMOM/UEPG e LFVIPM/UNRC. Estas colônias foram incubadas em 2 ml de meio NFb lactato (MACHADO *et al.*, 1991) formando pré inóculos bacterianos puros. Após 24 horas sob agitação orbital a 30 °C, foram inoculados o equivalente a  $1 \times 10^5$  UFC ml<sup>-1</sup> em 100 ml de meio FORM15 (OLIVEIRA *et al.*, 2017) através da contagem direta do número de bactérias em câmara de Neubauer ( $p=0,1$  mm). Para construção da curva de crescimento das estirpes foram realizadas contagens de UFC ml<sup>-1</sup> nos tempos: 0; 3; 6; 12; 18; 24; 36; 39; 45; 48; 60; 66; 72; 84 e 96 horas após a inoculação, através do plaqueamento pela técnica da microgota (NAGHILI *et al.*, 2013) em meio RC.

### 4.2 PREPARO DO INOCULANTE

Os inoculantes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 utilizados ao longo do trabalho foram cultivados em meio FORM15. Antes da inoculação foi realizada a correção da densidade bacteriana para  $10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> a partir da diluição do inóculo em meio FORM15 estéril, baseado na contagem realizada em câmara de Neubauer. As suspensões bacterianas resultantes foram submetidas a contagem do número de bactérias viáveis no momento da inoculação através da contagem do número de unidade formadoras de colônias, em meio RC, pela técnica da microgota (NAGHILI *et al.*, 2013).

### 4.3 ENSAIO “IN VITRO”

Tubos de ensaio nas dimensões de 25 cm de altura e 2 cm de diâmetro foram preenchidos com 30 g de solo autoclavado por 40 minutos a  $1 \text{ kgf cm}^{-2}$ . A eficiência da esterilização foi verificada através do espalhamento de 100 µl da solução proveniente da diluição de 1 g de solo em 9 ml de solução salina 0,85% em meio LB- ágar e meio RC. As sementes não foram previamente desinfestadas visando não alterar as características físico-químicas do tegumento. A irrigação do experimento ocorreu apenas anteriormente a semeadura, sendo que a quantidade de água aplicada corresponde a correção da umidade do solo para 70% da capacidade de campo. As análises química e física do solo encontram-se na Tabela 1, não

houve fertilização adicional.

Tabela 1 - Análise química do solo utilizado no experimento *in vitro*.

pH	H+Al	Al	Ca	Mg	K	SB	CTC	P	MO	V	m
(CaCl <sub>2</sub> )	mmolc. dm <sup>-3</sup>						(Melich)	mg.dm <sup>-3</sup>	%		
5,01	51,1	N.D.	72,7	34,2	1,3	108,4	159,5	45,3	40,18	67,97	0

Nota: SB= Soma de bases; V= Saturação de bases; m= Saturação de Alumínio; N.D.= não detectado.

Fonte: O autor.

Para o ensaio *in vitro*, as estirpes *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 foram inoculadas vias semente ou foliar, com cinco replicatas biológicas em delineamento inteiramente aleatorizado (DIA). A inoculação das sementes foi realizada 30 min antes da semeadura, na dose de  $1 \times 10^6$  UFC semente<sup>-1</sup> e a inoculação via foliar foi procedida cinco dias após a emergência, na dose de  $1 \times 10^6$  UFC planta<sup>-1</sup>. Para a inoculação foliar, uma gota de 10 µl foi espalhada nas superfícies adaxial e abaxial das folhas. As coletas foram realizadas 1; 5 e 10 dias após a emergência (DAE) e 6 e 10 DAE para as plantas inoculadas via semente e folha, respectivamente.

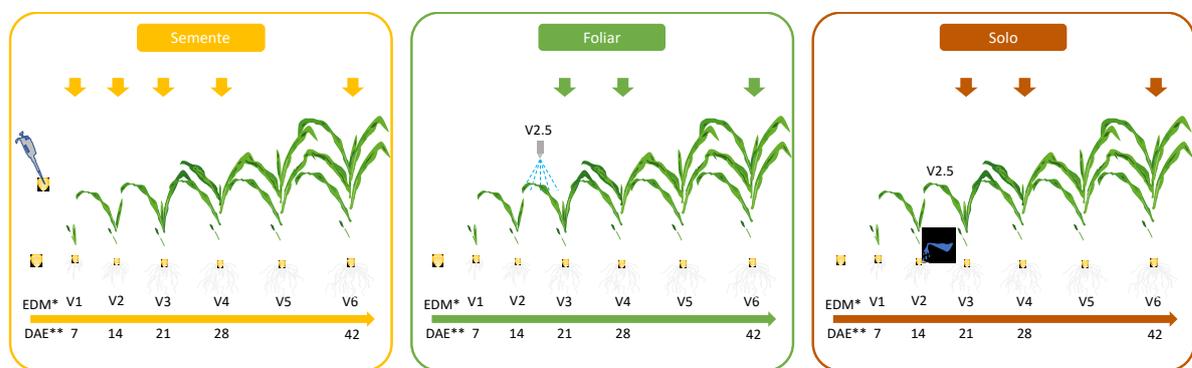
As plantas de milho foram cuidadosamente retiradas dos tubos e lavadas em solução salina de NaCl 0,85% (m/v). Aproximadamente 50% da massa de raízes foi superficialmente esterilizada e a outra metade apenas lavada em NaCl 0,85%. O protocolo de desinfecção superficial consistiu na imersão dos tecidos por 3 min em etanol 70%, 5 min em hipoclorito de sódio 2,5% de Cl ativo, 30 s em etanol 70% e 3 lavagens em NaCl 0,85% (m. v<sup>-1</sup>). As raízes lavadas (R), raízes superficialmente esterilizadas (RE) e parte aérea (PA) foram maceradas e o produto da maceração submetido a diluição seriada (1:10) até a diluição 10<sup>-5</sup>. Aliquotas de 100 µl de cada diluição foram espalhados em meio RC (sem adição de antibióticos para Az39 e com estreptomicina 80 µg. ml<sup>-1</sup> e ácido nalidixico 10 µg. ml<sup>-1</sup> para Ab-V5 e HM053). As colônias foram acompanhadas por 72 horas, e morfologias características de *A. brasilense* foram contabilizadas.

Concomitantemente, a fim de realizar uma análise qualitativa, foi realizado um procedimento de enriquecimento da população de *A. brasilense* adaptado de Malinich e Bauer (2018). Em síntese, 10 µl da diluição 10<sup>-1</sup> foram inoculados em 3 ml de meio NFb lactato. Após 48 horas a 30° C e 180 rpm, 100 µL da diluição 10<sup>-4</sup> foram inoculados em meio RC. O objetivo desse procedimento é aumentar a população de *A. brasilense* em relação aos contaminantes, visto que o meio NFb lactato é semisseletivo. As UFC de morfologias típicas de *A. brasilense* foram submetidas a PCR de colônia utilizando os primers Azo-2 (STETS *et al.*, 2015) e TP-5 (CONIGLIO *et al.*, 2019).

#### 4.4 ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

O ensaio foi implementado em delineamento inteiramente aleatorizado (DIA), com 6 replicatas, em arranjo fatorial com tratamento adicional (3x3+1), com 3 estirpes de *A. brasilense* x 3 métodos de inoculação e controle sem inoculação. As estirpes utilizadas foram: Ab-V5, Az39 e HM053 e os métodos de inoculação consistiram na inoculação via semente, foliar e solo. As coletas foram realizadas em 5 momentos para semente e 3 momentos para foliar e solo (Figura 1).

Figura 1 - Esquema do experimento em casa de vegetação



Nota: As setas indicam os momentos em que as coletas foram realizadas.

Fonte: O autor.

Vasos de 8 L de capacidade foram preenchidos com uma mistura de 50% solo coletado do horizonte superficial de um latossolo vermelho eutrófico e 50% areia lavada. As características químicas do solo e substrato utilizado (areia + solo) estão descritas na Tabela 2. A granulometria final do substrato foi de 73,2% areia, 23,15% argila e 3,65% silte, de classificação textural franco argiloso arenosa. Para a correção da acidez do solo foram adicionados 8,4 g de calcário (PRNT= 90%) por vaso, visando a elevação da saturação por bases para 60%. A fertilização foi procedida no momento da sementeira pela aplicação de 4 g de sulfato de amônio por vaso, 5,5 g de superfosfato simples (SSP) e 1,7 g de cloreto de potássio, correspondendo a 800; 880; 990 e 990 mg, ou ainda 40; 44; 50 e 50 kg. ha<sup>-1</sup> de N, S, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e K<sub>2</sub>O, respectivamente.

Foram semeadas uma semente de milho DKB360 (DEKALB/ Bayer, Alemanha) por vaso nos tratamentos de inoculação via sementes e quatro sementes por vaso nos demais tratamentos. As sementes cedidas pela Bayer foram armazenadas em saco de papel a 4 °C até o momento da inoculação, não foi procedido esterilização superficial das sementes. O desbaste foi procedido 2 DAE, deixando apenas uma planta por vaso. A umidade do solo foi mantida

entre 60 e 75% da capacidade de campo no decorrer do experimento através da irrigação com água de torneira.

Tabela 2 - Análise química do solo e substrato utilizado (solo+areia) antes da calagem e fertilização do experimento em casa de vegetação.

Amostra	pH (CaCl <sub>2</sub> )	H +Al	Al	Ca	Mg	K	SB	CT C	P (Melich)	C mg. dm <sup>-3</sup>	MO	V %	m
Solo	4,80	65,85	1,8 3	18,2 0	10,3 0	2,7 0	30,7	96,5 5	12,00	15,4 3	26,6 0	31,8 0	5,63
Solo +Areia	4,48	47,51	3,5 3	13,6 0	7,70	2,7 0	24,0 0	71,5 1	18,10	9,50	16,3 8	33,5 6	12,8 2

Nota: SB= Soma de bases; V= Saturação de bases; m= Saturação de Alumínio.

Fonte: O autor.

A inoculação consistiu em 10 µl de inóculos a  $3,8 \times 10^8$ ;  $5,2 \times 10^8$  e  $3,9 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup> equivalente a  $3,8 \times 10^6$ ;  $5,2 \times 10^6$  e  $3,9 \times 10^6$  UFC semente<sup>-1</sup> de Ab-V5, Az39 e HM053, respectivamente. Para a inoculação via foliar foi pulverizado  $2,4549 \pm 0,0288$  mL de inóculos com  $3,4 \times 10^6$ ;  $4,3 \times 10^6$  e  $4,8 \times 10^6$  UFC ml<sup>-1</sup> de Ab-V5, Az39 e HM053, respectivamente. Como a média da massa fresca da parte aérea no momento da inoculação foi de 1,7 g, pode-se afirmar que a inoculação foliar foi equivalente a  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> de massa fresca de parte aérea. A inoculação via foliar foi procedida com atomizador manual e teve o solo coberto por camadas de plástico polipropileno e papel tipo kraft para evitar a contaminação cruzada. A inoculação via solo foi procedida a partir da diluição do inóculo em água de irrigação, resultando na inoculação de 100 ml de soluções com  $3,4 \times 10^4$ ;  $4,3 \times 10^4$  e  $4,8 \times 10^4$  UFC ml<sup>-1</sup> de Ab-V5, Az39 e HM053, respectivamente. Como a média da massa fresca de raiz no momento da inoculação é de 1,5 g, pode-se afirmar que foi inoculado  $10^6$  UFC g<sup>-1</sup> de massa fresca de raízes.

A massa fresca da parte aérea e raízes foi procedida três horas antes da inoculação, a partir da mensuração da massa de dez plantas não inoculadas.

Antes da implementação do experimento foi realizada a quantificação por qPCR da população de *A. brasilense* no solo e sementes, a fim de garantir a ausência dessa bactéria nessas fontes. As extrações do DNA foram realizadas utilizando o kit DNeasy PowerPlant Pro (QIAGEN, Alemanha) e PowerSoil (QIAGEN, Alemanha) para extrações do DNA de semente e solo, respectivamente.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO DE A. BRASILENSE POR QPCR

As seis plantas que compõe a amostra foram cortadas em pedaços de aproximadamente 2 mm e homogeneizadas, perfazendo uma amostra composta. A extração do DNA foi procedida

em 50 mg das amostras de tecido macerado em nitrogênio líquido, a partir do kit DNeasy PowerPlant Pro (QIAGEN, Alemanha). A quantificação e análise de qualidade do DNA extraído foi realizada por meio da técnica da espectrofotometria no equipamento NanoVue™ Plus (Cytiva, EUA). Para a análise de pureza foram considerados como padrão as relações 260/280 de 1,8 a 2,0 e 260/230 de 1,5 a 1,8. As amostras cujas relações não estiveram dentro dos parâmetros estabelecidos como ideais, passaram por mais um processo de purificação.

A quantificação por qPCR foi baseada no sistema de detecção SYBR Green. A reação consistiu em 12,5 µl de SYBR Green Brilliant III Ultrafast SYBR Green (Agilent Technologies, EUA), 0,75 µl de Azo-WMF e Azo-WMR (10 µM), 0,25 µl de BSA (20 ng. ml<sup>-1</sup>), 5 µl de amostra de DNA (10 ng. µl<sup>-1</sup>) e água ultrapura para perfazer 25 µl de volume final da reação. O par de *primers* utilizados na quantificação foi o Azo-WM (F- GTCCACCAAGCCAACAATG e R- TAACCATAAAAAGCCCACCCTG). A condição de termociclagem utilizada consistiu em 95° C por 10 minutos, 40 ciclos de amplificação de 2 passos (95° C por 15'' e 60° C por 20''), seguido por uma curva de desnaturação (*melting curve*) com detecção em intervalos de 0,5° C. A quantificação foi realizada no termociclador de PCR em tempo real AriaMx (Agilent Technologies, EUA). As reações de qPCR foram realizadas em triplicata técnica e quando ao menos uma das triplicatas amplificaram, as amostras eram submetidas a uma nova corrida em triplicata técnica a fim de confirmar os resultados positivos de amostras que obtiveram valores inferiores ao limite de quantificação da técnica (LOQ).

Para a construção da curva padrão, a estirpe Ab-V5 foi cultivada em FORM15 por 36 h até atingir concentração de  $2 \times 10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>. Cinco mililitros deste cultivo foram distribuídos em cinco microtubos (1 ml em cada) e centrifugados a 6000 x g (rcf) por dez minutos. Os pellets foram ressuspensos em 200 µL de tampão fosfato e dispostos em um único microtubo, em seguida foi procedida uma nova centrifugação. Após a formação do pellet contendo  $\sim 10^{10}$  células ( $5 \times 2 \times 10^9$  UFC ml<sup>-1</sup>) foram procedidas 3 lavagens com tampão PBS. O pellet ressuspense em um mililitro resultou na solução a partir da qual foi procedida a diluição seriada na proporção de 1:5,66. Cem microlitros das diluições resultantes foram inoculadas em 100 mg de tecido vegetal macerado. A mistura (tecido vegetal + bactéria) foi incubada a 4° C por 2 horas, permitindo a interação entre a bactéria e o tecido vegetal (STETS *et al*, 2015). As extrações de DNA foram realizadas conforme descrito anteriormente. A diluição na proporção de 1:5,66 permite a criação de quatro pontos a cada dez ciclos (1 ponto/2,5 ciclos), diferentemente da diluição convencional de 1:10, a qual permite a criação de apenas três pontos a cada dez ciclos de PCR (1 ponto/3,32 ciclos).

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O número de unidades formadoras de colônias é expresso em UFC planta<sup>-1</sup>, porém, para as análises estatísticas foi realizada a transformação logarítmica  $\text{LOG}_{10}+1$  ( $\log \text{ UFC planta}^{-1} + 1$ ). Os dados experimentais de MFPA, MSPA, MFR, MSR, DC, QPA e QR foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e comparação de médias pelos testes de Tukey ( $p= 0,05$ ) para comparação entre amostras e Dunnett para comparação de amostras inoculadas e o controle (não inoculado), usando linguagem R (Versão Windows 3.5.1), e pacotes estatísticos ExpDes (FERREIRA; CAVALCANTI; NOGUEIRA, 2013) e Tratamentos.ad (AZEVEDO, 2021). Os parâmetros biométricos foram submetidos à análise de componentes principais (PCA) na matriz de correlação, em linguagem R (R Core Team, 2017) com pacote MultivariateAnalysis (AZEVEDO, 2021).

#### 4.7 GENÔMICA COMPARATIVA

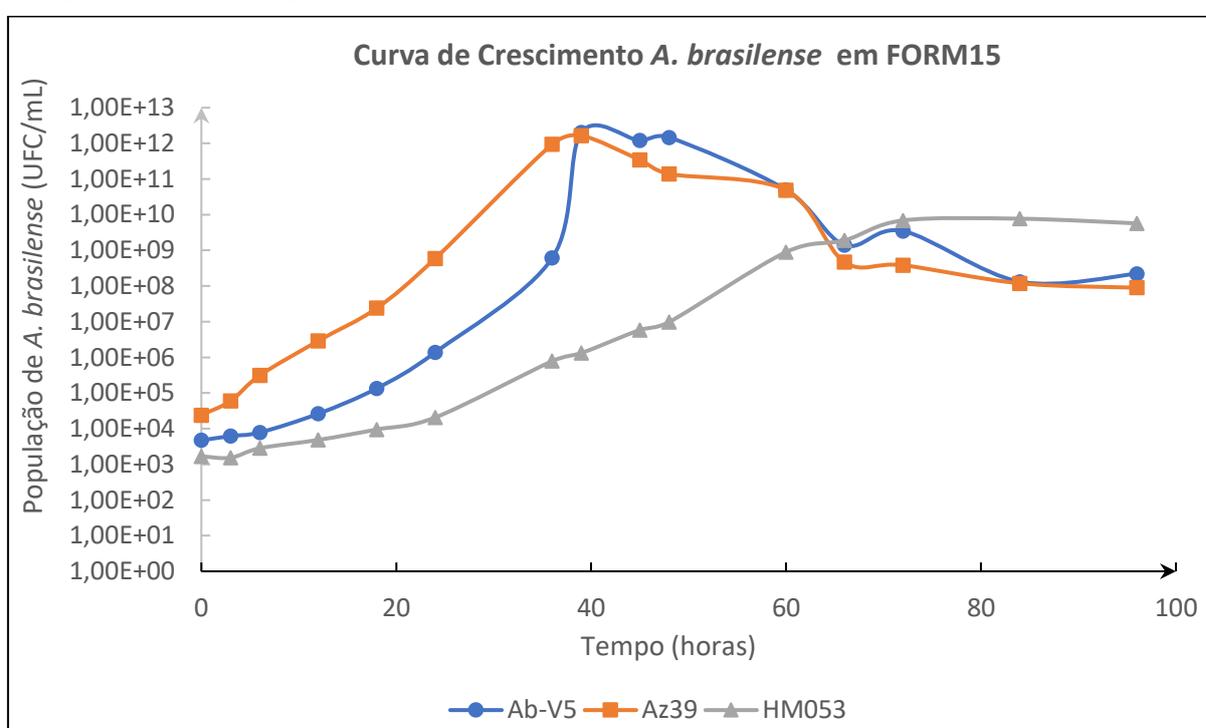
As análises de genômica comparativa foram realizadas através do sistema PATRIC (Pathosystems Resource Integration Center) (WATTAM *et al.*, 2013; 2018) em 27/02/2022. As sequências de proteínas das estirpes *A. brasilense* Ab-V5 (Nº de acesso:192.82), Az39 (Nº de acesso:192.45) e FP2 (Nº de acesso:1262469.3) foram comparadas considerando Az39 como referência através da ferramenta de comparação de proteomas. Os genomas das três estirpes também foram comparados acessando a presença de PATRIC PLfams (famílias gênero específicas) para identificação de proteínas únicas. A comparação entre os proteomas foi realizada utilizando BLASTp com os parâmetros limiares de E-value=  $1\text{E}^{-50}$ , 50% de cobertura e 50% de identidade.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE AZOSPIRILLUM BRASILENSE EM FORM15

A escolha da formulação FORM 15 foi decorrente da necessidade de obtermos um inoculante de qualidade, com altos teores de exopolissacarídeos e polihidroxibutirato, que proporcionem o bom estabelecimento e colonização de *A. brasilense* nas sementes, nas folhas e no solo. As curvas de crescimento de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 em meio FORM15 (OLIVEIRA et al., 2017) estão representadas na Figura 2.

Figura 2 - Curva de crescimento de *Azospirillum brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 em formulação FORM15, sob agitação orbital (180 rpm) a 30 °C.



Fonte: O autor.

As porções exponenciais das curvas de crescimento foram selecionadas e plotadas nos gráficos da Figura 3. Foram considerados como intervalo de crescimento exponencial os conjuntos de valores que apresentassem o melhor coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de acordo com o modelo exponencial. Sabe-se que durante a fase “log” da curva de crescimento, há uma duplicação do número de células a cada intervalo de tempo ( $T_d$ ). A equação que representa a fase exponencial da curva pode ser genericamente descrita como:

$$N = N_0 \times e^{ke \times t}$$

onde,  $N$  = Número final de bactérias em solução,  $N_0$  = Número de bactérias no início da fase exponencial,  $e$  = número de Euler = 2,71828,  $ke$  = constante de duplicação,  $t$  = tempo decorrido entre o início da fase log e o momento da observação. A constante de duplicação ( $ke$ ) por sua vez, pode ser descrita como:

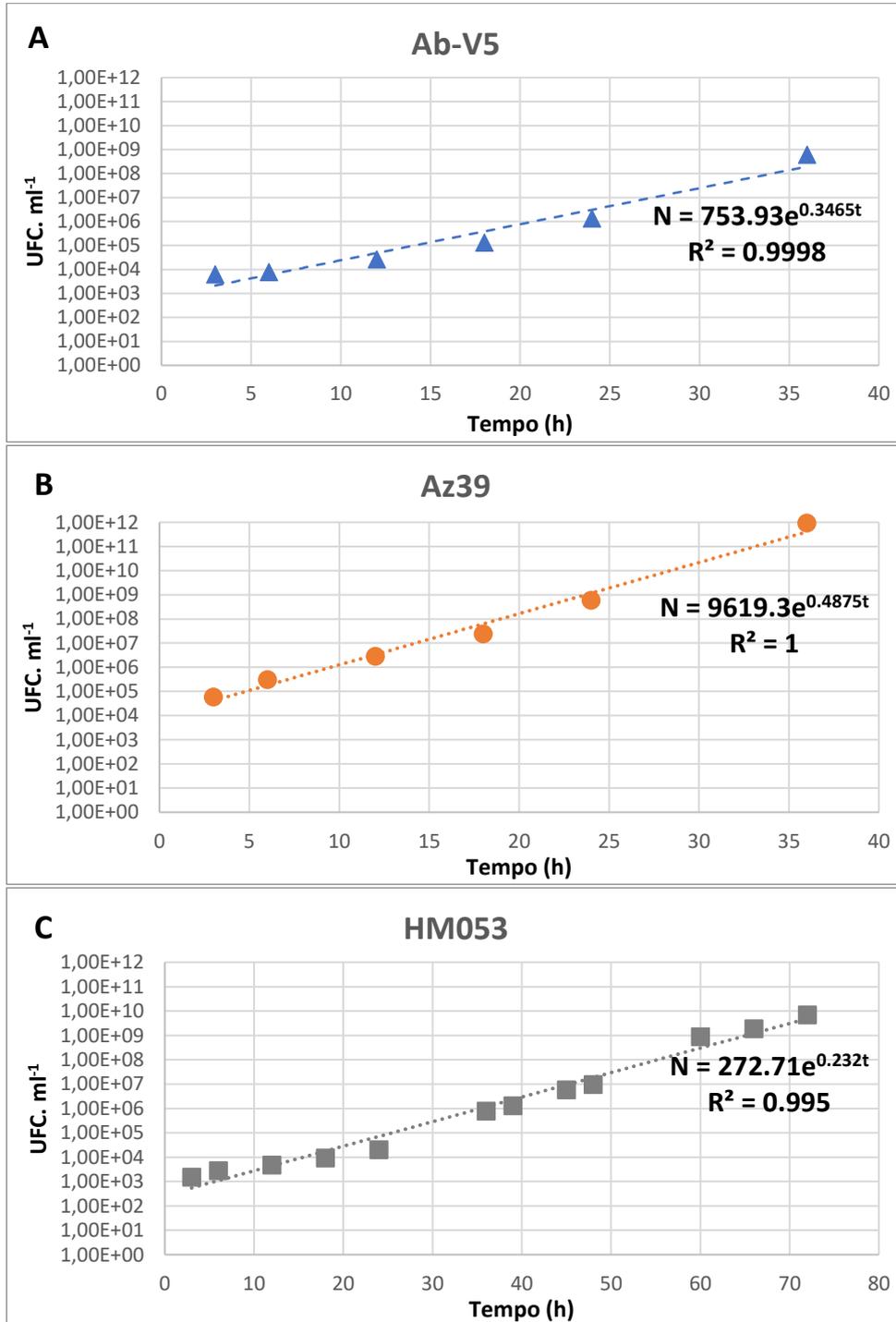
$$ke = \frac{\ln 2}{td} \cong \frac{0,693}{td}$$

onde  $td$  representa o tempo de duplicação ou tempo de geração. De forma simplificada, assume-se que o número final de bactérias presentes na solução é dependente da concentração de bactérias no início da fase exponencial, do tempo de duplicação e do tempo entre o início da fase exponencial e o momento da observação.

A fase log da curva de crescimento em meio FORM15 diferiu entre as estirpes de *A. brasilense*. Essa fase para as estirpes Ab-V5 e Az39 compreendeu no intervalo de 3 a 36 horas, e para HM053 foi de 3 a 72 horas. O tempo de duplicação ou geração ( $T_d$ ) foi de 2,00; 1,42 e 2,99 para as estirpes Ab-V5, Az39 e HM053.

A formulação FORM 15 utilizada ao longo do experimento tem o glicerol e a sacarose como fontes de carbono principais, além do carbono presente no extrato de levedura, usada como fonte de fatores de crescimento (aminoácidos, peptídeos, vitaminas hidrossolúveis e carboidratos). O glicerol pode ser convertido em gliceraldeído-3-fosfato através de poucos processos e assim metabolizado facilmente por *Azospirillum*. As enzimas responsáveis pelo metabolismo do glicerol são a glicerol quinase (glicerol  $\rightarrow$  glicerol-3-fosfato), glicerol-3-fosfato desidrogenase (glicerol-3-fosfato  $\rightarrow$  dihidroxiacetona fosfato) e triose fosfato isomerase (dihidroxiacetona fosfato  $\rightarrow$  gliceraldeído-3-fosfato) (WESTBY; CUTSHALL; VIGILT, 1983). Por outro lado, o *A. brasilense* é considerado incapaz de utilizar a sacarose como fonte de carbono, embora seu genoma codifique enzimas relacionadas ao metabolismo de glicose e frutose (WISNIEWSKI-DYÉ *et al.*, 2011). A adição de sacarose na formulação reduz a biomassa de *A. brasilense*, mas proporciona maior produção de exopolissacarídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Figura 3 - Fase Exponencial da curva de crescimento de *Azospirillum brasiliense* Ab-V5 (A), Az39 (B) e HM053 (C) em formulação FORM15, sob agitação orbital (180 rpm) a 30 °C.



Fonte: O autor.

## 5.2 ENSAIO IN VITRO

### 5.2.1 Quantificação e Detecção de *A. brasilense* em Milho por Método de Cultivo em Placa Associado a PCR de Colônia

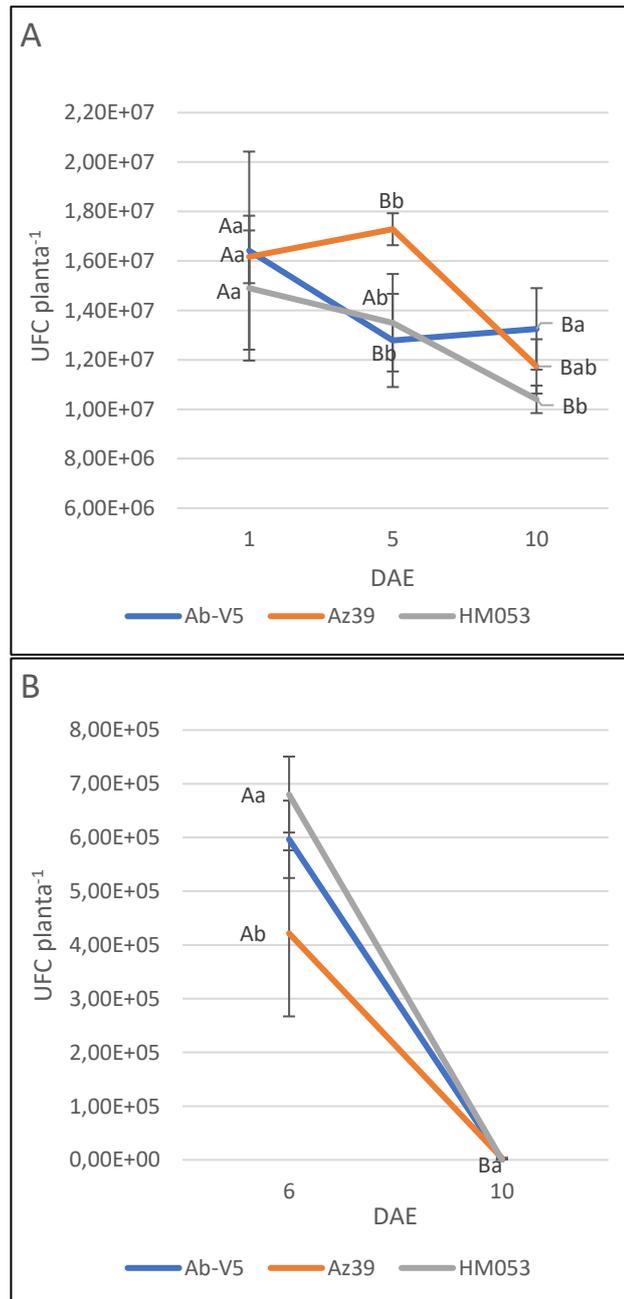
A quantificação de *A. brasilense* por cultivo em placa foi realizada baseada na identificação de morfologias típicas de colônias de *A. brasilense* no meio RC. Entretanto, em todos os tratamentos foi possível identificar colônias indicadoras da presença de outras espécies bacterianas e até mesmo colônias fúngicas. É sabido que as sementes possuem um microbioma bastante diverso, contendo até 9.000 espécies e dois bilhões de células bacterianas (BERG; RAAIJMAKERS, 2018). Johnston-Monje e colaboradores (2016) relataram que parte do microbioma das raízes e rizosfera de plantas de milho é proveniente das sementes. Portanto, sabendo que a eficácia da esterilização do solo foi eficiente, e que as sementes de milho podem carrear grupos microbianos que irão compor o microbioma das plântulas, é possível supor que as sementes utilizadas continham microrganismos que se estabeleceram no sistema de cultivo utilizado.

Foi possível quantificar as populações de *A. brasilense* nas raízes das plantas inoculadas via sementes e nas folhas de plantas inoculadas via foliar. A mobilidade de *A. brasilense* das raízes para a parte aérea e vice-versa não pode ser confirmada pelo método de contagem em placa. Ademais, a quantificação da população de *A. brasilense* em raízes superficialmente esterilizadas foi possível apenas para a estirpe Az39, indicando um possível comportamento endofítico. Ao longo do experimento as populações de *A. brasilense* nas raízes de plantas inoculadas via sementes se mantiveram em torno de  $10^7$  UFC planta<sup>-1</sup>, independentemente da estirpe. Por outro lado, quando inoculado via foliar, as populações reduziram de  $10^6$  UFC planta<sup>-1</sup> 12 h após a inoculação para  $10^3$  UFC de Az39 planta<sup>-1</sup> 5 dias após a inoculação. Não foi possível quantificar a população de Ab-V5 e HM053 inoculadas via foliar 5 dias após a inoculação, ou 10 DAE (Figura 4).

A quantificação de *Azospirillum* em raízes superficialmente esterilizadas só foi possível nas contagens feitas em 10 DAE em sementes inoculadas com Az39, esta população endofítica foi de  $1,77 \times 10^3 \pm 0,07$  UFC planta<sup>-1</sup>. Embora não tenha sido possível quantificar a população de *A. brasilense* Ab-V5 e HM053 em raízes superficialmente esterilizadas, a partir da técnica de enriquecimento em Nfb lactato seguida pela PCR de colônia foi possível detectar colônias de *A. brasilense* em todas as coletas. Similarmente, foi detectado *A. brasilense* na parte aérea de plantas que tiveram as folhas inoculadas pelas três estirpes. Entretanto, ao verificar a mobilidade bacteriana das raízes para a parte aérea foi possível detectar colônias de *A.*

*brasilense* apenas em plantas inoculadas com a estirpe Az39. A detecção de *A. brasilense* em raízes de plantas inoculadas via foliar ocorreu nos tratamentos sob inoculação de Az39 e Ab-V5.

Figura 4 - População de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 nas raízes de plantas inoculadas via sementes (A) e na parte aérea de plantas inoculadas via foliar (B). As plantas foram cultivadas em solo esterilizado.



Nota: Os resultados são médias da população de *A. brasilense* em 5 plantas. A população em número de células por planta foi quantificada em placas, com 2 réplicas técnicas da diluição seriada e 3 réplicas técnicas do espalhamento, perfazendo 6 réplicas por tratamento.

Fonte: O autor.

A detecção de *Azospirillum* na parte aérea de plantas já havia sido relatada anteriormente, entretanto este é o primeiro indício demonstrando a capacidade de Az39 translocar das raízes para a parte aérea das plantas (ELBELTAGY *et al.*, 2001; GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012; MALINICH; BAUER, 2018). A rota contrária, isto é, das folhas para as raízes não é comum. Diante disso, deve ser levado em consideração uma possível contaminação das raízes através do escorrimento de gotas condensadas nas paredes dos tubos. Embora não seja uma rota comum, algumas bactérias possuem a capacidade de se locomoverem da parte aérea para as raízes por meio do floema (LÓPEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2017; GALAMBOS *et al.*, 2021).

A partir das características morfológicas, foram selecionadas no decorrer do experimento 113 colônias. As colônias selecionadas foram aquelas de morfologia redonda (~1-3 mm de diâmetro), convexas, bordas levemente levantadas, de coloração rosada quando jovens e vermelhas escarlate quando maduras. Através das reações de PCR de colônia foi possível confirmar a identidade de 42 colônias (37,16%) pertencentes a espécie *A. brasilense*. A baixa proporção de resultados positivos (37,16%) indica que (a) a seleção visual de colônias características de *A. brasilense* não foi efetiva e/ou (b) a técnica de PCR de colônia pode ter levado a ineficiência da reação de PCR em decorrência de inibidores de reação presentes na biomassa microbiana.

### 5.2.2 Promoção de Crescimento Vegetal por *A. brasilense*

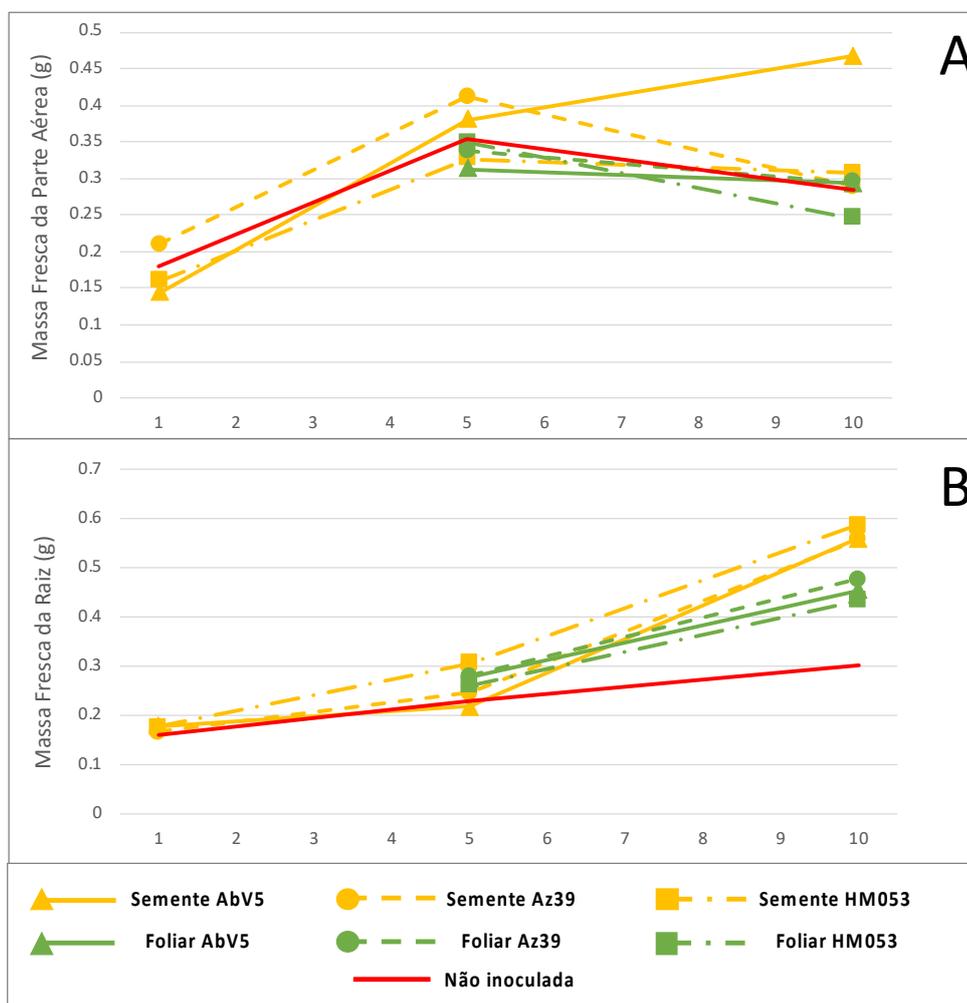
O desenvolvimento do milho foi prejudicado em decorrência do déficit hídrico gerado no decorrer do experimento. Diante disso, a massa fresca de parte aérea (MFPA) reduziu entre a coleta 5 e 10 DAE para todos os tratamentos, com exceção para as plantas inoculadas com Ab-V5 via sementes (Figura 5A). A inoculação de *A. brasilense* Ab-V5 via sementes propiciou o aumento da MFPA em 68% em relação ao controle negativo (Tabela 3). Esse aumento mesmo em condição de estresse hídrico revela capacidade da estirpe Ab-V5 em reduzir os efeitos da falta de umidade no solo (BULEGON *et al.*, 2019). A maior tolerância de plantas ao estresse hídrico pela inoculação de BPCV está relacionada principalmente à produção de fitormônios, que resultam no maior desenvolvimento radicular e controle da abertura e fechamento estomático (KHAN *et al.*, 2020).

Embora a parte aérea tenha apresentado sintomas de estresse hídrico, a massa fresca de raízes (MFR) não reduziu entre os dias cinco e dez, mesmo em plantas não inoculadas (VAUGHAN *et al.*, 2015). Entretanto, plantas inoculadas mostraram possuir maior biomassa

de raízes em relação às plantas não inoculadas 10 DAE (Figura 5 B). A inoculação via sementes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 demonstrou aumentar significativamente a MFR, gerando aumentos de 86%, 97% e 86% em relação às plantas não inoculadas, respectivamente (Tabela 4). Por outro lado, a inoculação via foliar promoveu aumento da MFR apenas quando inoculadas com Ab-V5 (aumento de 60%) (Tabela 4). A promoção de crescimento de raízes é um dos principais resultados decorrentes da inoculação com *A. brasilense* (BARBOSA *et al.*, 2022; CASSÁN *et al.*, 2020).

O desenvolvimento das raízes em decorrência da aplicação de *A. brasilense* via pulverização foliar foi demonstrado anteriormente em milho (FUKAMI *et al.*, 2016), trigo (FUKAMI *et al.*, 2016; GALINDO *et al.*, 2019), soja (PUENTE *et al.*, 2019; RONDINA *et al.*, 2020) e braquiária (HUNGRIA *et al.*, 2021). A inoculação de *A. brasilense* via foliar gera desenvolvimento radicular por meio de vias de sinalização da parte aérea para as raízes, principalmente por meio de alteração da concentração de fitormônios (FUKAMI *et al.*, 2017, PUENTE *et al.*, 2018, 2019).

Figura 5 - Massa Fresca de Parte Aérea (A) e Raízes (B) de milho inoculado com *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 via Sementes e Foliar.



Fonte: O autor.

Tabela 3 - Efeito da inoculação de três estirpes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por dois métodos (Semente e Foliar) na massa fresca da parte aérea (MFPA) de plantas de milho.

Inoculação	Estirpe	DAE			
		1	5	6	10
Semente	Ab-V5	0,14 ± 0,06 a	0,38 ± 0,05 ab		0,47 ± 0,05 Aa*
Semente	Az39	0,21 ± 0,03 a	0,41 ± 0,03 a		0,29 ± 0,05 Ab
Semente	HM053	0,16 ± 0,04 a	0,33 ± 0,06 b		0,31 ± 0,05 Ab
Foliar	Ab-V5			0,31 ± 0,08 a	0,29 ± 0,07 Ba
Foliar	Az39			0,34 ± 0,02 a	0,29 ± 0,05 Aa
Foliar	HM053			0,35 ± 0,02 a	0,25 ± 0,06 Aa
Não inoculado		0,18 ± 0,04	0,35 ± 0,03	0,38 ± 0,01	0,28 ± 0,03

Nota: Letras maiúsculas diferentes entre os métodos de inoculação de uma mesma estirpe bacteriana representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas de um mesmo método de inoculação representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* representam diferença estatística entre os tratamentos inoculados e o controle negativo (Não inoculado) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Os resultados apresentados representam médias de 6 replicas biológicas, seguidas pelos respectivos desvios-padrões, em gramas (g) de massa fresca por planta.

Fonte: O autor.

Tabela 4 - Efeito da inoculação de três estirpes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por dois métodos (Semente e Foliar) na massa fresca da raiz (MFR) de plantas de milho.

Inoculação	Estirpe	DAE			
		1	5	6	10
Semente	Ab-V5	0,17 ± 0,05 a	0,25 ± 0,02 ab		0,56 ± 0,10 a*
Semente	Az39	0,18 ± 0,04 a	0,31 ± 0,07 a		0,59 ± 0,09 a*
Semente	HM053	0,18 ± 0,05 a	0,22 ± 0,05 b		0,56 ± 0,14 a*
Foliar	Ab-V5			0,28 ± 0,10 a	0,48 ± 0,08 a*
Foliar	Az39			0,26 ± 0,05 a	0,43 ± 0,1 a
Foliar	HM053			0,28 ± 0,07 a	0,45 ± 0,13 a
Não inoculado		0,16 ± 0,02	0,23 ± 0,06	0,24 ± 0,06	0,30 ± 0,02

Nota: Letras maiúsculas diferentes entre os métodos de inoculação de uma mesma estirpe bacteriana representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas de um mesmo método de inoculação representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* representam diferença estatística entre os tratamentos inoculados e o controle negativo (Não inoculado) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Os resultados apresentados representam médias de 6 replicas biológicas, seguidas pelos respectivos desvios-padrões, em gramas (g) de massa fresca por planta.

Fonte: O autor.

### 5.3 ENSAIO EM CASA DE VEGETAÇÃO

#### 5.3.1 Efeito da Inoculação de *A. brasilense* na Promoção de Crescimento Vegetal

##### 5.3.1.1 Massa fresca e seca de parte aérea

Em casa de vegetação, a inoculação de *A. brasilense* em milho mostrou não aumentar a massa fresca da parte aérea (MFPA) nas coletas realizadas 7, 14 e 21 DAE. Na quarta coleta, 28 dias após a emergência, a inoculação da estirpe Ab-V5 proporcionou aumento da MFPA em relação ao controle, independente da forma de inoculação utilizada. Entretanto, na quinta coleta, 42 DAE, o aumento da MFPA foi observado em tratamentos inoculados pelos três métodos de inoculação. A inoculação via sementes de *A. brasilense* Az39 e HM053, demonstrou um aumento de 57,4 e 171,0 % em relação ao tratamento não inoculado, a inoculação de Az39 via foliar aumentou em 64,7%, e a inoculação via solo de Ab-V5 e Az39 apresentaram aumento de 148,7 e 139,5% em relação a testemunha não inoculada, respectivamente. Entretanto, as inoculações de Ab-V5 via semente e foliar, e HM053 via foliar e solo não proporcionaram aumento da MFPA (Tabela 4).

Tabela 5 - Efeito da inoculação de três estirpes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por três métodos (Semente, Foliar e Solo) na massa fresca da parte aérea (MFPA) de plantas de milho.

Inoculação	Estirpe	Coleta				
		1 (7 DAE)	2 (14 DAE)	3 (21 DAE)	4 (28 DAE)	5 (42 DAE)
Semente	Ab-V5	0,71 ± 0,16 a	1,79 ± 0,46 a	3,59 ± 0,78 Aa	4,71 ± 1,39 Aa*	7,31 ± 1,01 Bb
Semente	Az39	0,78 ± 0,15 a	1,42 ± 0,27 a	2,92 ± 0,51 Aa	3,95 ± 0,83 Aa	8,17 ± 1,17 Bb*
Semente	HM053	0,74 ± 0,08 a	1,74 ± 0,28 a	3,50 ± 0,65 Aa	3,73 ± 0,85 Aa	14,07 ± 2,71 Aa*
Foliar	Ab-V5			3,04 ± 0,49 Aa	4,94 ± 1,08 Aa*	6,79 ± 0,80 Ba
Foliar	Az39			2,59 ± 0,79 Aa	3,92 ± 1,91 Aa	8,55 ± 1,54 Ba*
Foliar	HM053			3,16 ± 0,87 Aa	3,87 ± 1,01 Aa	7,44 ± 1,81 Ba
Solo	Ab-V5			3,41 ± 0,97 Aa	3,84 ± 0,89 Aa*	12,91 ± 2,5 Aa*
Solo	Az39			3,23 ± 0,72 Aa	4,51 ± 0,76 Aa	12,43 ± 1,73 Aa*
Solo	HM053			2,77 ± 0,51 Aa	3,46 ± 0,76 Aa	7,35 ± 1,73 Bb
Não inoculado		0,75 ± 0,08	1,72 ± 0,6	2,77 ± 0,44	3,09 ± 0,60	5,19 ± 1,36

Nota: Letras maiúsculas diferentes entre os métodos de inoculação de uma mesma estirpe bacteriana representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas de um mesmo método de inoculação representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* representam diferença estatística entre os tratamentos inoculados e o controle negativo (Não inoculado) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Os resultados apresentados representam médias de 6 replicas biológicas, seguidas pelos respectivos desvios-padrões, em gramas (g) de massa fresca por planta.

Fonte: O autor.

Assim como para MFPA, a inoculação de *A. brasilense* não mostrou resposta estatisticamente significativa nas 4 coletas iniciais para massa seca de parte aérea (MSPA). No entanto, na coleta 5 foi observado que a inoculação de Ab-V5 via solo, HM053 via sementes, e Az39 via semente, foliar e solo apresentaram aumento significativo em relação ao controle. Os aumentos foram de 55,8 e 169,5% para inoculação de Az39 e HM053 via sementes, 63,2% para inoculação de Az39 via foliar, e 147,4 e 136,8% para inoculação via solo de Ab-V5 e Az39, respectivamente. A inoculação de Ab-V5 via semente e foliar, e HM053 via foliar e solo não mostraram aumento significativo em relação ao controle não inoculado (Tabela 5).

Tabela 6 - Efeito da inoculação de três estirpes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por três métodos (Semente, Foliar e Solo) na massa seca da parte aérea (MSPA) de plantas de milho.

Inoculação	Estirpe	Coleta				
		1 (7 DAE)	2 (14 DAE)	3 (21 DAE)	4 (28 DAE)	5 (42 DAE)
Semente	Ab-V5	0,13 ± 0,03 a	0,32 ± 0,08 a	0,67 ± 0,13 Aa	0,85 ± 0,25 Aa	1,33 ± 0,18 Bb
Semente	Az39	0,14 ± 0,03 a	0,25 ± 0,05 a	0,52 ± 0,09 Aa	0,71 ± 0,15 Aa	1,48 ± 0,21 Bb*
Semente	HM053	0,13 ± 0,01 a	0,31 ± 0,05 a	0,64 ± 0,11 Aa	0,68 ± 0,15 Aa	2,56 ± 0,49 Aa*
Foliar	Ab-V5			0,55 ± 0,09 Aa	0,90 ± 0,20 Aa	1,24 ± 0,14 Ba
Foliar	Az39			0,47 ± 0,13 Aa	0,71 ± 0,35 Aa	1,55 ± 0,28 Ba*
Foliar	HM053			0,57 ± 0,15 Aa	0,71 ± 0,18 Aa	1,35 ± 0,33 Ba
Solo	Ab-V5			0,61 ± 0,17 Aa	0,70 ± 0,16 Aa	2,35 ± 0,46 Aa*
Solo	Az39			0,59 ± 0,13 Aa	0,82 ± 0,14 Aa	2,25 ± 0,31 Aa*
Solo	HM053			0,50 ± 0,09 Aa	0,63 ± 0,14 Aa	1,34 ± 0,32 Bb
Não inoculado		0,14 ± 0,02	0,26 ± 0,16	0,49 ± 0,09	0,56 ± 0,10	0,95 ± 0,25

Nota: Letras maiúsculas diferentes entre os métodos de inoculação de uma mesma estirpe bacteriana representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas de um mesmo método de inoculação representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* representam diferença estatística entre os tratamentos inoculados e o controle negativo (Não inoculado) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Os resultados apresentados representam médias de 6 replicas biológicas, seguidas pelos respectivos desvios-padrões, em gramas (g) de massa seca por planta.

Fonte: O autor.

### 5.3.1.2 Massa fresca e seca de raiz

O aumento da massa fresca de raízes (MFR) nas coletas 1, 2, 3 e 4 não foi observado. A estirpe Ab-V5 não apresentou aumento da MFR sob nenhum método de inoculação. O efeito positivo da inoculação na MFR foi observado na inoculação via solo de Az39 e HM053 inoculado via sementes, com aumentos de 62,3 e 78,6%, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 7 - Efeito da inoculação de três estirpes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por três métodos (Semente, Foliar e Solo) na massa fresca de raízes (MFR) de plantas de milho.

Inoculação	Estirpe	Coleta				
		1 (7 DAE)	2 (14 DAE)	3 (21 DAE)	4 (28 DAE)	5 (42 DAE)
Semente	Ab-V5	1,25 ± 0,33 a	1,13 ± 0,30 a	2,93 ± 0,25 Aa	3,34 ± 0,71 Aa	4,42 ± 0,92 Bb
Semente	Az39	1,23 ± 0,27 a	1,48 ± 0,35 a	2,60 ± 0,35 Aa	3,28 ± 0,40 Aa	5,20 ± 1,47 Bb
Semente	HM053	1,05 ± 0,15 a	1,41 ± 0,42 a	3,05 ± 0,58 Aa	3,14 ± 0,58 Aa	8,34 ± 1,43 Aa*
Foliar	Ab-V5			2,66 ± 0,49 Aa	3,44 ± 0,45 Aa	4,92 ± 0,93 Aa
Foliar	Az39			2,15 ± 0,56 Aa	3,12 ± 0,50 Aa	4,88 ± 1,40 Ba
Foliar	HM053			2,49 ± 0,49 Aa	3,03 ± 0,53 Aa	4,76 ± 1,60 Ba
Solo	Ab-V5			2,47 ± 0,39 Aa	3,04 ± 0,71 Aa	6,75 ± 1,40 Aa
Solo	Az39			2,72 ± 0,51 Aa	3,73 ± 0,63 Aa	7,58 ± 1,87 Aa*
Solo	HM053			2,31 ± 0,95 Aa	3,16 ± 0,46 Aa	4,37 ± 0,96 Bb
Não inoculado		1,03 ± 0,13	1,47 ± 0,47	2,65 ± 0,39	2,68 ± 0,25	4,67 ± 1,06

Nota: Letras maiúsculas diferentes entre os métodos de inoculação de uma mesma estirpe bacteriana representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas de um mesmo método de inoculação representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* representam diferença estatística entre os tratamentos inoculados e o controle negativo (Não inoculado) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Os resultados apresentados representam médias de 6 réplicas biológicas, seguidas pelos respectivos desvios-padrões, em gramas (g) de massa fresca por planta.

Fonte: O autor.

A promoção do aumento da MSR, assim como de MFR, não foi observado nas primeiras coletas. Os aumentos foram observados para a inoculação de HM053 via semente e Az39 via solo, nas proporções de 78,7 e 62,0%, respectivamente (Tabela 7).

A inoculação foliar não propiciou aumento da massa de raízes nas três estirpes testadas. A inoculação via solo de HM053 apresentou massa radicular inferior a inoculação de Ab-V5 e Az39 pelo mesmo método, e semelhante ao tratamento controle não inoculado, indicando a não efetividade desse método de inoculação para essa estirpe.

Tabela 8 - Efeito da inoculação de três estirpes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por três métodos (Semente, Foliar e Solo) na massa seca de raízes (MSR) de plantas de milho.

Inoculação	Estirpe	Coleta				
		1 (7 DAE)	2 (14 DAE)	3 (21 DAE)	4 (28 DAE)	5 (42 DAE)
Semente	Ab-V5	0,29 ± 0,08 a	0,26 ± 0,07 a	0,69 ± 0,06 Aa	0,78 ± 0,18 Aa	1,02 ± 0,22 Bb
Semente	Az39	0,28 ± 0,06 a	0,34 ± 0,08 a	0,59 ± 0,08 Aa	0,76 ± 0,10 Aa	1,21 ± 0,34 Bb
Semente	HM053	0,24 ± 0,03 a	0,33 ± 0,10 a	0,71 ± 0,14 Aa	0,73 ± 0,14 Aa	1,93 ± 0,33 Aa*
Foliar	Ab-V5			0,61 ± 0,11 Aa	0,79 ± 0,11 Aa	1,14 ± 0,21 Aba
Foliar	Az39			0,51 ± 0,14 Aa	0,73 ± 0,11 Aa	1,13 ± 0,33 Ba
Foliar	HM053			0,58 ± 0,11 Aa	0,70 ± 0,12 Aa	1,10 ± 0,39 Ba
Solo	Ab-V5			0,57 ± 0,09 Aa	0,71 ± 0,17 Aa	1,56 ± 0,33 Aa
Solo	Az39			0,64 ± 0,12 Aa	0,86 ± 0,15 Aa	1,75 ± 0,43 Aa*
Solo	HM053			0,54 ± 0,23 Aa	0,73 ± 0,12 Aa	1,01 ± 0,22 Bb
Não inoculado		0,23 ± 0,03	0,34 ± 0,11	0,61 ± 0,09	0,62 ± 0,06	1,08 ± 0,25

Nota: Letras maiúsculas diferentes entre os métodos de inoculação de uma mesma estirpe bacteriana representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas de um mesmo método de inoculação representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* representam diferença estatística entre os tratamentos inoculados e o controle negativo (Não inoculado) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Os resultados apresentados representam médias de 6 réplicas biológicas, seguidas pelos respectivos desvios-padrões, em gramas (g) de massa seca por planta.

Fonte: O autor.

### 5.3.1.3 Diâmetro de Colmo

Diferentemente das mensurações de massa fresca e seca de parte aérea e raízes, o diâmetro de colmo apresentou diferença significativa a partir da terceira coleta (21 DAE). Na coleta 3, foi observado aumento significativo do diâmetro de colmo nos tratamentos de inoculação via foliar de Az39 e via solo de HM053. Na coleta 4, foi observado aumento

significativo do DC apenas quando inoculado Ab-V5 e HM053 via sementes. Na quinta coleta, 42 DAE, foi observado aumento do diâmetro de colmo para a inoculação de todas as estirpes via semente e solo, além da inoculação de Az39 via foliar.

Tabela 9 - Efeito da inoculação de três estirpes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados por três métodos (Semente, Foliar e Solo) no diâmetro do colmo (DC) de plantas de milho.

Inoculação	Estirpe	Coleta				
		1 (7 DAE)	2 (14 DAE)	3 (21 DAE)	4 (28 DAE)	5 (42 DAE)
Semente	Ab-V5	3,13 ± 0,56 a	4,78 ± 0,78 a	4,51 ± 0,17 Aa	5,23 ± 0,28 Aa*	5,70 ± 0,35 Bb*
Semente	Az39	3,19 ± 0,46 a	3,99 ± 0,70 a	3,84 ± 0,23 Ab	4,03 ± 0,54 Ab	5,71 ± 0,62 Bb*
Semente	HM053	3,17 ± 0,11 a	4,36 ± 0,71 a	4,30 ± 0,59 Aab	4,53 ± 0,74 Aab*	9,61 ± 1,68 Aa*
Foliar	Ab-V5			3,68 ± 0,50 Ba	3,58 ± 0,42 Ba	4,88 ± 0,49 Ba
Foliar	Az39			3,31 ± 0,26 Bb*	3,57 ± 0,50 Aa	5,68 ± 1,02 Ba*
Foliar	HM053			3,80 ± 0,37 Bab	4,08 ± 0,94 Aba	4,96 ± 0,95 Ba
Solo	Ab-V5			3,53 ± 0,58 Ba	4,33 ± 0,33 Ba	8,35 ± 1,18 Aa*
Solo	Az39			3,51 ± 0,45 Bb	3,91 ± 0,40 Aab	8,34 ± 0,91 Aa*
Solo	HM053			3,28 ± 0,22 Bab*	3,43 ± 0,28 Bb	5,51 ± 0,75 Aa*
Não inoculado		3,30 ± 0,31	3,97 ± 0,36	4,05 ± 0,41	3,57 ± 0,41	3,94 ± 0,53

Nota: Letras maiúsculas diferentes entre os métodos de inoculação de uma mesma estirpe bacteriana representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas de um mesmo método de inoculação representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* representam diferença estatística entre os tratamentos inoculados e o controle negativo (Não inoculado) pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Os resultados apresentados representam médias de 6 replicas biológicas, seguidas pelos respectivos desvios-padrões, em milímetros (mm) de diâmetro do colmo.

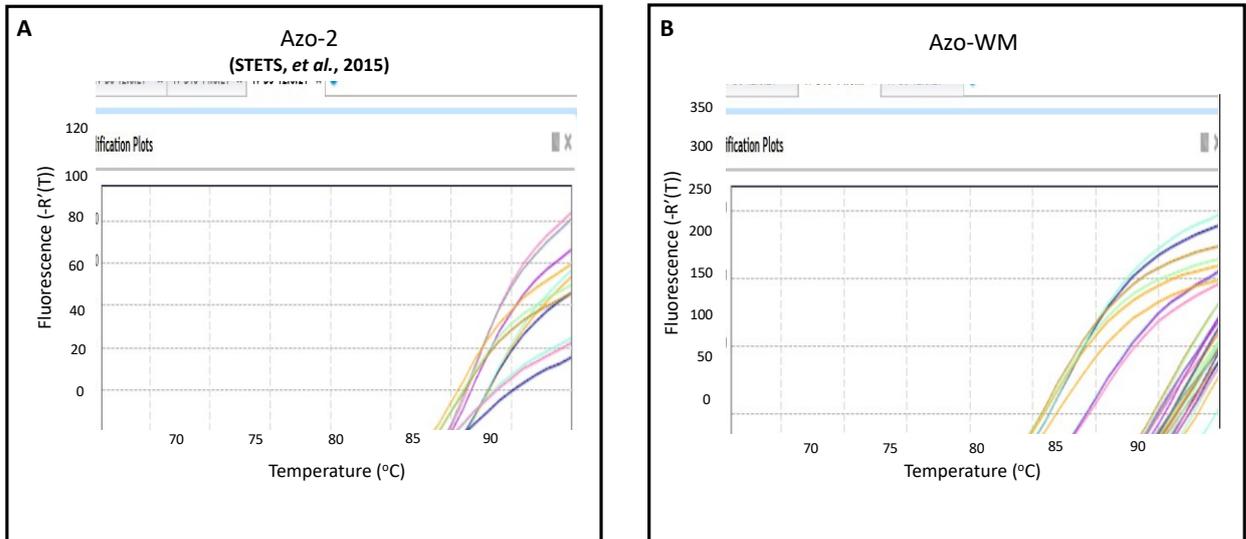
Fonte: O autor.

### 5.3.2 Quantificação da População de *A. brasilense* por PCR em Tempo Real (qPCR)

#### 5.3.2.1 Desenho do *primer* específico para *A. brasilense*

Inicialmente a quantificação da população de *A. brasilense* foi realizada utilizando o par de *primers* Azo-2 (STETS *et al.*, 2015). Entretanto, em amostras cuja população de *A. brasilense* eram baixas ( $10^3$ -  $10^4$  UFC  $ml^{-1}$ ) havia formação de produtos de amplificação inespecíficos, resultando em picos indefinidos na curva de dissociação (“*melting curve*”) e bandas inespecíficas no gel de eletroforese (Figura 6).

Figura 6 - Curva de Desnaturação (*melting curve*) resultantes do produto da amplificação por qPCR utilizando o par de primers Azo-2 (A) e Azo-WM (B).



Nota: A temperatura de *melting* esperada pela amplificação com o primer Azo-2 é de 84° -85° C e comprimento do amplicon de 90 pb. A resolução da curva de *melting* é de 0,5° C.

Fonte: O autor.

Além disso, o par de primers Azo-2, desenhado para a detecção de *A. brasilense* FP2, apresenta 2 *mismatches* em relação a região de anelamento no genoma de Az39. As incompatibilidades ocorrem no 7° e 17° nucleotídeo do primer *forward* (Azo-2F) com a região de anelamento no genoma de Az39 (Figura 7). A amplificação de Az39 utilizando o par de primers Azo-2 foi possível tanto por PCR quanto qPCR. Entretanto, estudos demonstram que um único *mismatch* próximo à extremidade 3' pode subestimar a quantificação por qPCR em mais de 1000 vezes em decorrência da redução de eficiência da enzima DNA polimerase em sintetizar novas moléculas (BRU; MARTIN-LAURENT; PHILIPPOT, 2008; YE *et al.*, 2012).

Figura 7 - Anelamento inespecífico do primer Azo-2F em *A. brasilense* Az39

```

5' GCGCGGGAAGTCCTGAAT 3' - Primer Azo-2
      I I I I I I I I I I I I I I I I I
3' CGCGCCATTCAGGACTAA 5' - Genoma Az39
  
```

Fonte: O autor.

Diante do exposto, o desenho de um novo par de primers específico para *A. brasilense* foi necessário. Para isso, foram desenhados primers na região específica para *A. brasilense* selecionada por Stets (2013), utilizando as ferramentas Primer3, PrimerBlast e Beacon Designer. A especificidade do par de primers selecionado foi testada *in silico* no banco de dados não redundantes do NCBI, resultando em alinhamentos com estirpes de *A. brasilense* e *A.*

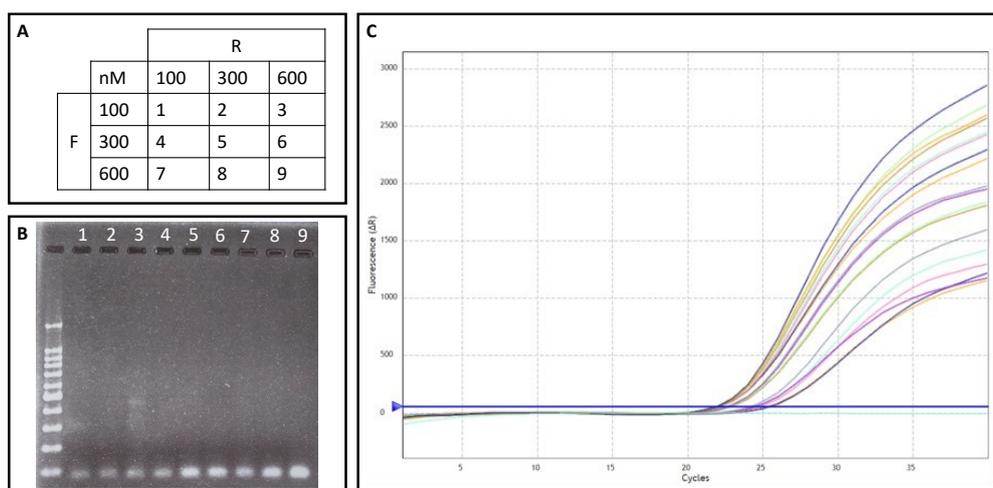
*baldaniorum*. O alinhamento do *primer* com o genoma de *A. baldaniorum* Sp245 era esperado por se tratar de uma espécie que foi recentemente desmembrada de *A. brasilense* (FERREIRA *et al.*, 2020). Esse novo par de *primers* será referido como Azo-WM no decorrer do texto.

A partir de ensaios de otimização do par de *primers* Azo-WM foi definida a concentração de 300 nM de cada *primer* (Figura 8). A temperatura de anelamento de 60° C (condição universal de termociclagem) foi escolhida, uma vez que não houve formação de bandas inespecíficas (Figura 8).

### 5.3.2.2 Construção da curva padrão para quantificação de *A. brasilense* por qPCR

Após a otimização das condições de reação (temperatura e concentração de *primers*) foram realizadas as curvas padrões, as quais são representadas por uma regressão logarítmica entre o ciclo de quantificação Cq e o número de UFC g<sup>-1</sup> de tecido vegetal fresco. As curvas (Figura 9) apresentaram valores de r<sup>2</sup>, Eficiência (E) e *slope* dentro dos limites ideais descritos na literatura, isto é, r<sup>2</sup> > 0,98; E entre 90 e 110%; e *slope* entre -2,98 e -3,65 (BUSTIN *et al.*, 2009; D'HAENE; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010; SVEC *et al.*, 2015). O limite inferior de quantificação (LOQ) foi definido como o ponto de menor número de células inoculadas que apresentaram diferença menor que 1 Cq entre a triplicata técnica. Os LOQs da técnica foram de 2,0 x 10<sup>3</sup> e 2,7 x 10<sup>3</sup> células. g<sup>-1</sup> de massa fresca de raízes e parte aérea, respectivamente.

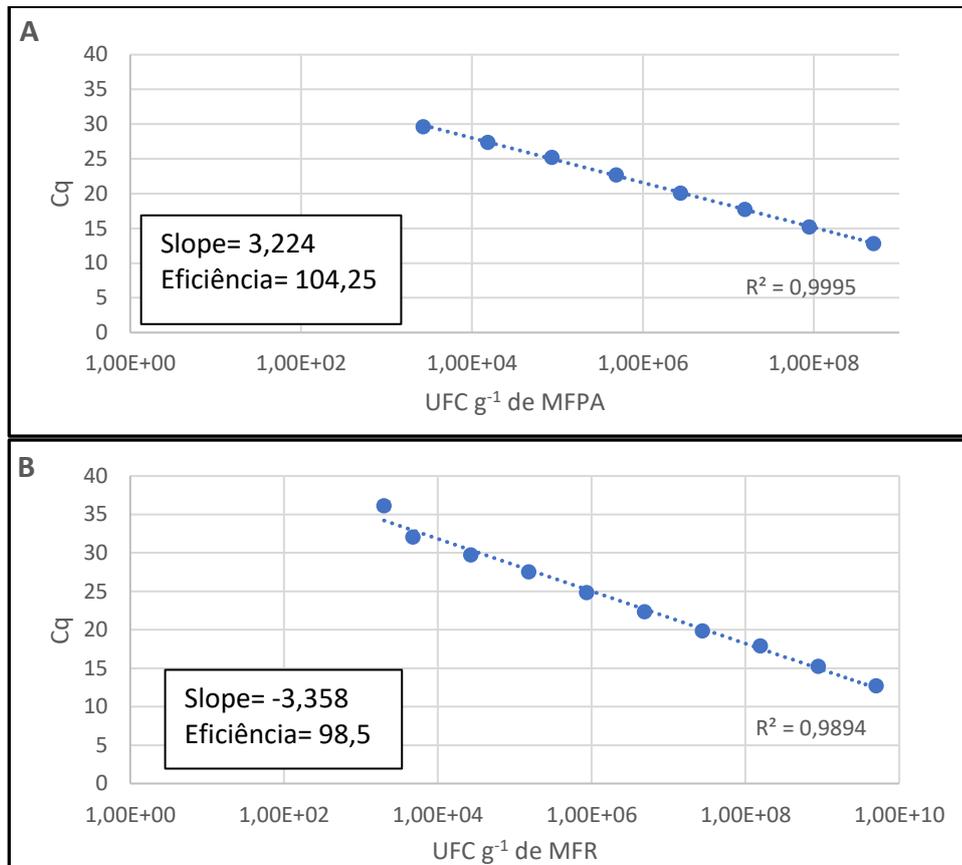
Figura 8 - Otimização da concentração do par de primer Azo-WM (F e R)



Nota: (A) concentrações de cada primer em nM, (B) gel de agarose 2% corado com brometo de etídio, (C) curva de amplificação por qPCR, onde eixo x= ciclos e y= fluorescência.

Fonte: O autor.

Figura 9 - Curva padrão para a quantificação de *A. brasilense* por qPCR utilizando o par de primers Azo-WM em parte aérea (A) e raízes (B) de plantas de milho



Nota: Cada ponto da curva representa uma concentração de *A. brasilense* inoculada em raízes e partes aéreas de plantas de milho não inoculadas, os resultados são oriundos de triplicata técnica da reação de qPCR.  
Fonte: O autor.

### 5.3.2.3 Quantificação da população de *A. brasilense* em milho

A dinâmica dos níveis populacionais de *A. brasilense* nas raízes de plantas inoculadas via sementes apresentou comportamento semelhante entre as estirpes Ab-V5, Az39 e HM053 (Figura 10). Foi observado um aumento expressivo da população de *A. brasilense* na primeira coleta (7 DAE). Entre a segunda e a terceira coletas (14-21DAE) ocorreu um decréscimo populacional na ordem de 99,7- 99,9%, reduzindo a população da ordem de  $10^7$  para  $10^4$  UFC planta<sup>-1</sup>. E do 21° ao 42° DAE (coletas 4 e 5) houve aumento da população de *A. brasilense*, resultando em populações de  $10^5$ - $10^6$  UFC planta<sup>-1</sup> (Figura 10).

Por outro lado, a inoculação via foliar gerou comportamentos distintos entre as estirpes estudadas. Embora tenha sido possível a detecção das estirpes Ab-V5 e HM053 em todas as coletas, apenas a estirpe Az39 pode ser quantificada na parte aérea das plantas até 28 dias após a inoculação (última avaliação). A população de Az39 na parte aérea oscilou entre  $10^4$  e  $10^5$  células por planta, por outro lado a população de Ab-V5 e HM053 reduziu de 1,3 e  $3,8 \times 10^4$

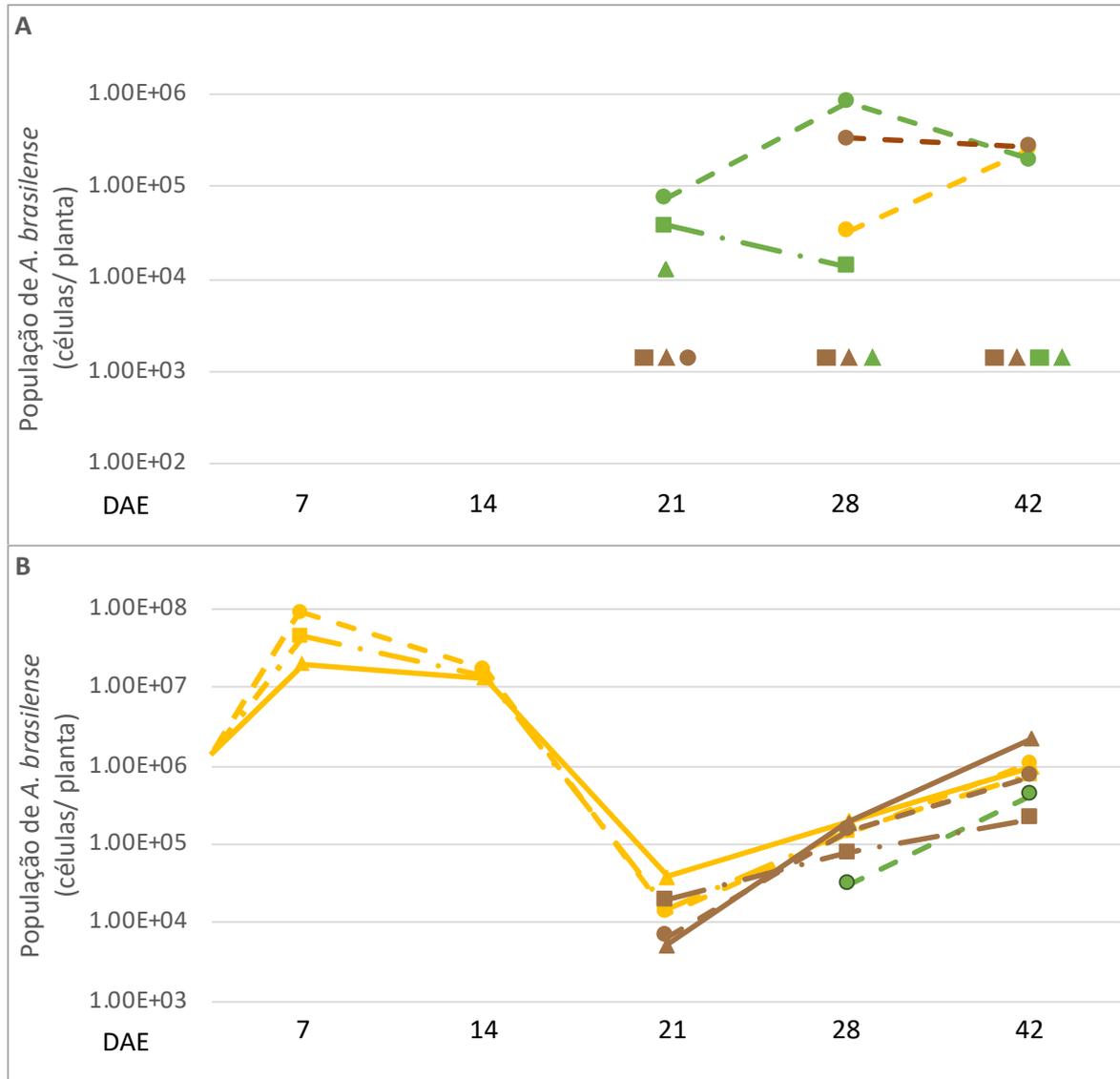
UFC planta<sup>-1</sup> uma semana após a inoculação para menos de  $2,7 \times 10^3$  UFC planta<sup>-1</sup> 28 dias após a inoculação (Figura 10).

Com relação a inoculação via solo, as três estirpes demonstraram aumento populacional no decorrer do experimento, aumentando de  $10^3$  na primeira semana após a inoculação e três semanas depois atingindo  $10^5$ - $10^6$  UFC planta<sup>-1</sup>. Entretanto, as estirpes Ab-V5 e Az39 mostraram possuir uma melhor capacidade de colonização das raízes em comparação com HM053. A população de HM053 nas raízes representou apenas 9,6% e 28,5% em relação à população de Ab-V5 e Az39 inoculadas pelo mesmo método, respectivamente.

No que se refere a mobilidade de *A. brasilense* das raízes para a parte aérea foi observado que na coleta 3, embora não tenha sido possível quantificar as populações de *A. brasilense*, células inoculadas via solo foram detectadas na parte aérea do milho em populações inferiores a 2700 células. g<sup>-1</sup> de MFPA para as três estirpes. Ademais, do estágio V4 ao V6 (4ª a 5ª coleta) a população de Az39 na PA era de  $10^4$  a  $10^5$  UFC planta<sup>-1</sup> em plantas inoculadas via sementes e solo. Por outro lado, a inoculação via sementes de Ab-V5 e HM053 não propiciaram a colonização da parte aérea.

No entanto, deve-se ressaltar que a detecção do DNA pela técnica da PCR não necessariamente indica a presença de células viáveis; o DNA detectado pode ser proveniente de células dormentes ou mortas (CANGELOSI; MESCHKE, 2014; NYSTRÖM, 2001;2003) e DNAs livres de células (NIELSEN *et al.*, 2007; FOUCHER *et al.*, 2020) que persistem em superfícies e sedimentos por longos períodos antes de sofrerem degradação.

Figura 10 - População de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via sementes, folhas e solo na parte aérea (A) e raízes (B).



Nota: Para os tratamentos de inoculação via semente, a população de *A. brasilense* foi quantificada nas 5 coletas, e para a inoculação via foliar e solo nas coletas 3, 4 e 5. Os resultados são médias da população de *A. brasilense* em 6 plantas. A população em número de células por planta foi quantificada em triplicata técnica por PCR em tempo real (qPCR) e a média multiplicada pela massa fresca por planta.

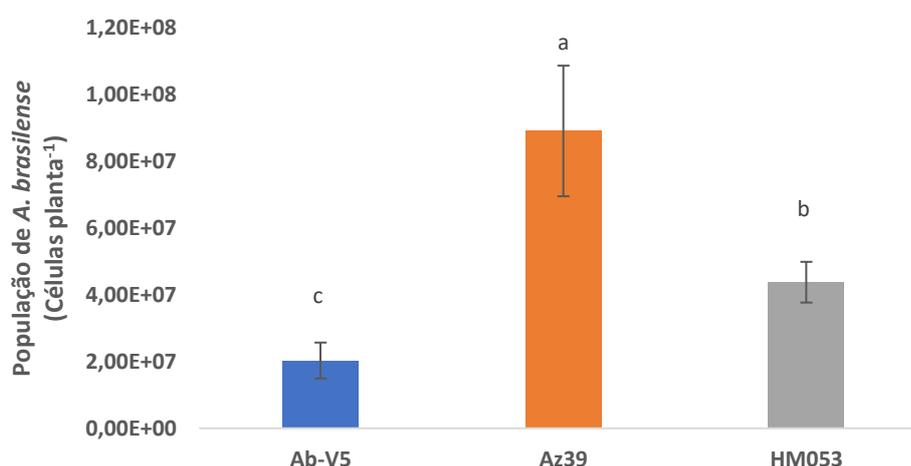
Fonte: O autor.

#### 5.3.2.3.1 Coleta 1 (7 DAE)

Foram inoculadas  $\sim 5 \times 10^6$  UFC por semente, entretanto na coleta 1 (7 DAE) foi observado uma população de  $2,0 \times 10^7$  UFC planta<sup>-1</sup> (310% a população inoculada),  $8,9 \times 10^7$  UFC planta<sup>-1</sup> (1680% a população inoculada) e  $4,4 \times 10^7$  UFC planta<sup>-1</sup> (780% a população inoculada) em raízes de plantas provenientes de sementes inoculadas com Ab-V5, Az39 e HM053, respectivamente (Figura 11). Esse aumento inicial da população bacteriana nas raízes indica o estabelecimento e a multiplicação dessas bactérias junto à planta nessa primeira semana

de desenvolvimento, e pode ser explicado pela multiplicação dessas bactérias em decorrência do consumo de fontes de carbono oriundas da exsudação e debrís celulares radiculares (MOSTAJERAN *et al.* 2007, O'NEAL *et al.* 2020, PEREIRA *et al.* 2020, ZHALNINA *et al.* 2018). Resultados similares foram obtidos anteriormente na inoculação de outras BPCV como *Azotobacter chroococcum* (VELMOUROUGANE *et al.*, 2017), *Bacillus subtilis* (QIAO *et al.*, 2017), *Burkholderia contaminans* (HEO *et al.*, 2022), *Herbaspirillum seropedicae* (BALSANELLI *et al.*, 2013; TADRA-SFEIR *et al.*, 2015) e *Pseudomonas* sp. (NIELSEN *et al.*, 2005). Não foi detectada a presença de *A. brasilense* na parte aérea de plantas inoculadas via sementes.

Figura 11 - População nas raízes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via semente na 1ª Coleta (7 dias após a emergência).



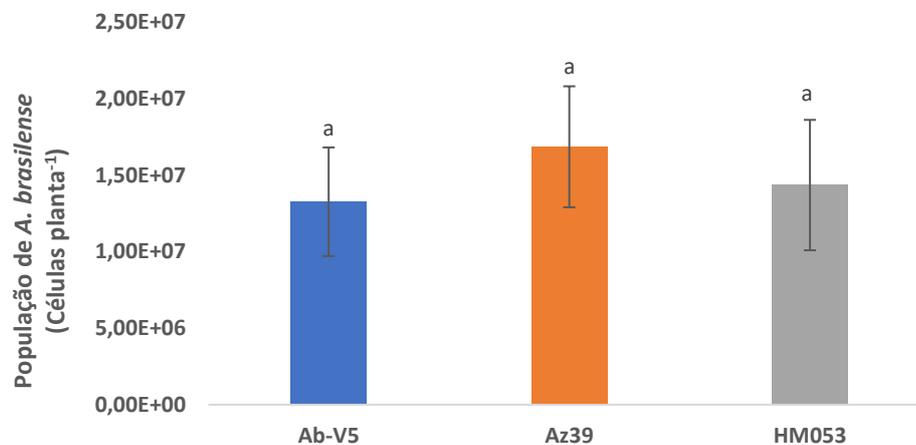
Nota: Os resultados são médias das populações de *A. brasilense* em 6 plantas, seguidas pelo desvio padrão. Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: O autor.

#### 5.3.2.3.2 Coleta 2 (14 DAE)

Na segunda coleta, realizada 14 DAE, a planta de milho se encontrava em estágio vegetativo V2. A população de *A. brasilense* para todas as estirpes na Coleta 2 foi de aproximadamente  $1,5 \times 10^7$  UFC planta<sup>-1</sup> (Figura 12). A alta capacidade de colonização de *A. brasilense* em raízes de gramíneas na fase inicial de desenvolvimento já foi reportada anteriormente. Em trigo, Stets e colaboradores (2015) reportaram aproximadamente  $10^7$  UFC g<sup>-1</sup>. Na cultura do milho, Cunha e colaboradores (2020) reportaram valores de  $3,2 \times 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> em sistema fechado. Por outro lado, em condição de campo, Cotta (2015) e Urrea-Valência e colaboradores (2021) reportaram valores mais baixos ( $10^3$  UFC g<sup>-1</sup>) na cultura do milho.

Diferentemente do que foi observado no experimento *in vitro*, no 14º DAE a presença de *A. brasilense* Az39 na parte aérea de plantas inoculadas via sementes não foi detectada. Sabe-se que a diversidade da microbiota do solo interfere na capacidade de colonização do microrganismo invasor inoculado (FERREIRA *et al.*, 2021, LIU; ROUX; SALLES, 2022; MALLON, VAN ELSAS; SALLES, 2015; VAN ELSAS, 2012). Diante disso, é esperado que haja diferença na dinâmica de colonização de *A. brasilense* entre os ensaios realizados em solos esterilizados e não esterilizados.

Figura 12 - População nas raízes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via semente na 2ª Coleta (14 dias após a emergência).



Nota: Os resultados são médias das populações de *A. brasilense* em 6 plantas, seguidas pelo desvio padrão. Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).  
Fonte: O autor.

#### 5.3.2.3.3 Coleta 3 (21 DAE)

Na coleta realizada no 21º DAE, a planta se encontrava em estágio V3. A população de *A. brasilense* inoculado via sementes reduziu abruptamente. A estirpe Ab-V5 embora tenha sofrido uma significativa redução da população, teve sua população próxima de  $4 \times 10^4$  UFC planta<sup>-1</sup>, enquanto as estirpes Az39 e HM053 tiveram suas populações reduzidas para  $1,35 \times 10^4$  e  $1,52 \times 10^4$  UFC planta<sup>-1</sup> (Figura 13). A expressiva redução da população de  $10^7$  para  $10^3$  UFC planta<sup>-1</sup> pode ser explicada pelo estágio V3 ser caracterizado pelo desenvolvimento das raízes nodais e pela transição entre a nutrição heterotrófica (sementes) para a autotrófica (fotossíntese) (CHEN *et al.*, 2016; LU *et al.*, 2021; MAGALHÃES e DURÃES, 2006). Sabe-se que durante a conversão das plântulas heterotróficas para as plantas autotróficas, há acúmulo de espécies reativas de oxigênio (HA *et al.*, 2017) e que a taxa fotossintética altera o padrão de

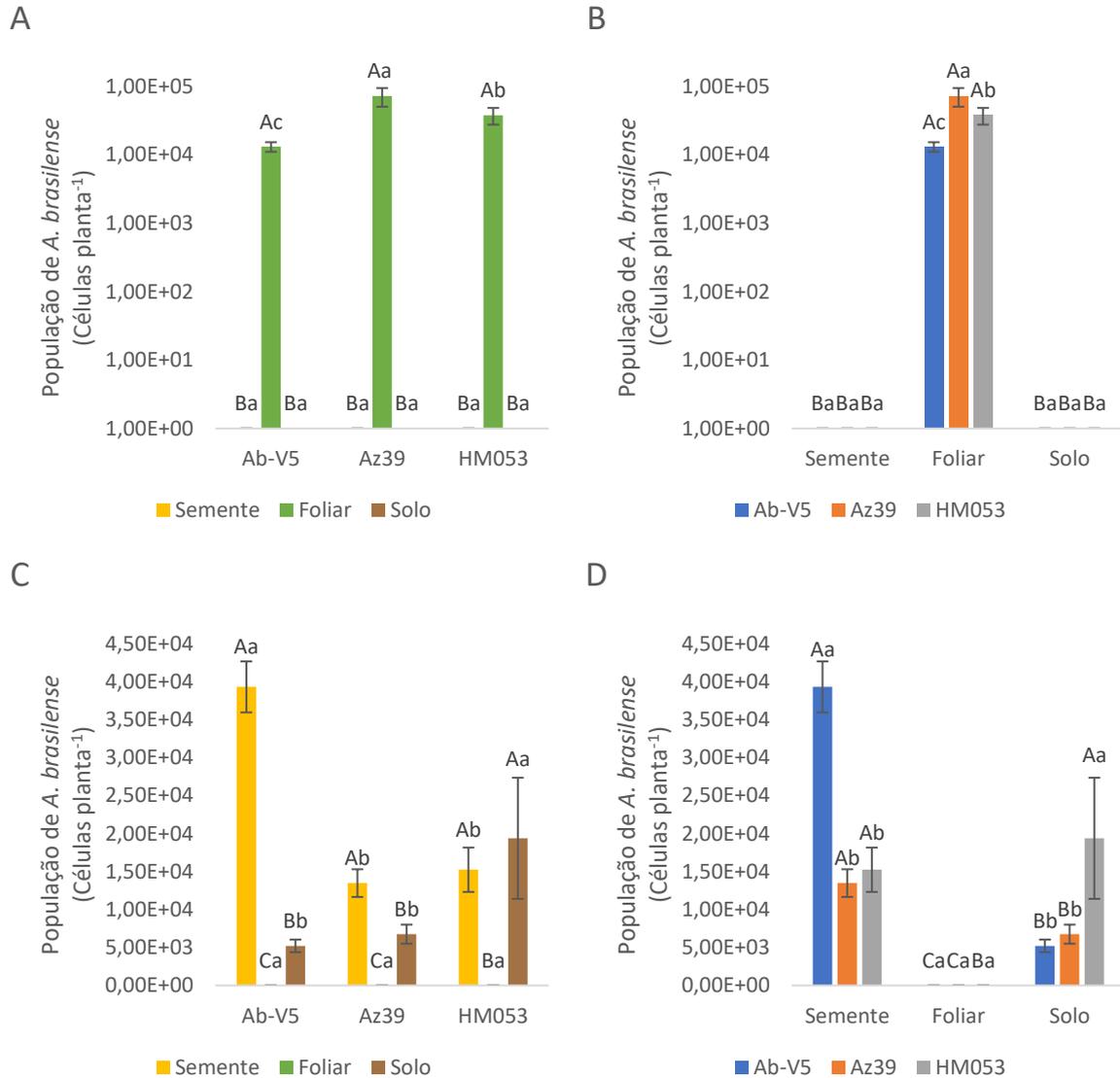
exsudação radicular (DILKES; JONES; FAHAR, 2004). Ademais, sabe-se que o *Azospirillum brasilense* é repellido por peróxido de hidrogênio, uma das formas mais comuns de EROs (O'NEAL; VO; ALEXANDRE, 2020).

A inoculação via foliar foi realizada no estágio V2 aos 14 DAE, a partir da pulverização de suspensões bacterianas em água, adicionando aproximadamente  $5 \times 10^6$  UFC planta<sup>-1</sup>. Sete dias após a inoculação, aos 21 DAE, a população de Az39, HM053 e Ab-V5 reduziu para aproximadamente  $10^4$  UFC planta<sup>-1</sup> (Figura 13). Não foi possível quantificar a população de *A. brasilense* nas raízes das plantas inoculadas via foliar.

Assim como a inoculação via foliar, a inoculação via solo ocorreu 14 DAE (V2), na quantidade de  $5 \times 10^6$  UFC planta<sup>-1</sup>. No 21 DAE, sete dias após a inoculação, foi verificado que a estirpe HM053 colonizou o sistema radicular do milho com maior eficiência em relação às estirpes Ab-V5 e Az39, obtendo populações de  $1,94 \times 10^4$ ;  $5,21 \times 10^3$  e  $6,76 \times 10^3$  UFC planta<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 13).

A respeito da mobilidade de *A. brasilense* na planta, não obtivemos êxito na quantificação da população de *Azospirillum* na parte aérea, por estar em valores inferiores ao limite de quantificação (LOQ). Entretanto, nos tratamentos cuja inoculação foi realizada via solo, foi possível detectar a presença de Ab-V5 e Az39 em 4 de 6 reações de qPCR, e HM053 em 3 das 6 reações, todas elas apresentaram pico esperado na curva de melting. A detecção de *A. brasilense* na parte aérea das plantas de milho inoculadas via solo pode ter ocorrido em função da inoculação ter sido realizada em estágio vegetativo V2. Nessa fase de desenvolvimento a gema apical do caule se encontra abaixo do nível do solo (MAGALHÃES e DURÃES, 2006), possibilitando o contato das bactérias inoculadas com o ponto de crescimento dos órgãos superiores. Ou seja, as conclusões a respeito desse resultado devem ser obtidas com parcimônia, podendo não necessariamente indicar mobilidade das raízes para a parte aérea.

Figura 13 - População de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via semente, folha e solo, na 3ª Coleta (21 dias após a emergência) na parte aérea (A e B) e raízes (C e D).



Nota: Os resultados são médias das populações de *A. brasilense* em 6 plantas, seguidas pelo desvio padrão. Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas e maiúsculas entre os métodos de inoculação representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor.

#### 5.3.2.3.4 Coleta 4 (28 DAE)

Na quarta coleta (28 DAE) as plantas se encontravam em estágio vegetativo V4. Nesse momento, a população de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 nas raízes de plantas inoculadas via sementes aumentou 410%; 940% e 840% em relação a coleta anterior, respectivamente (Figura 14). Esse incremento populacional sinaliza a multiplicação das bactérias nas raízes, indicando que a transição para a nutrição autotrófica havia finalizado, com os níveis de EROs retornado à normalidade. Similarmente, em um ensaio a campo, Urrea-Valência e

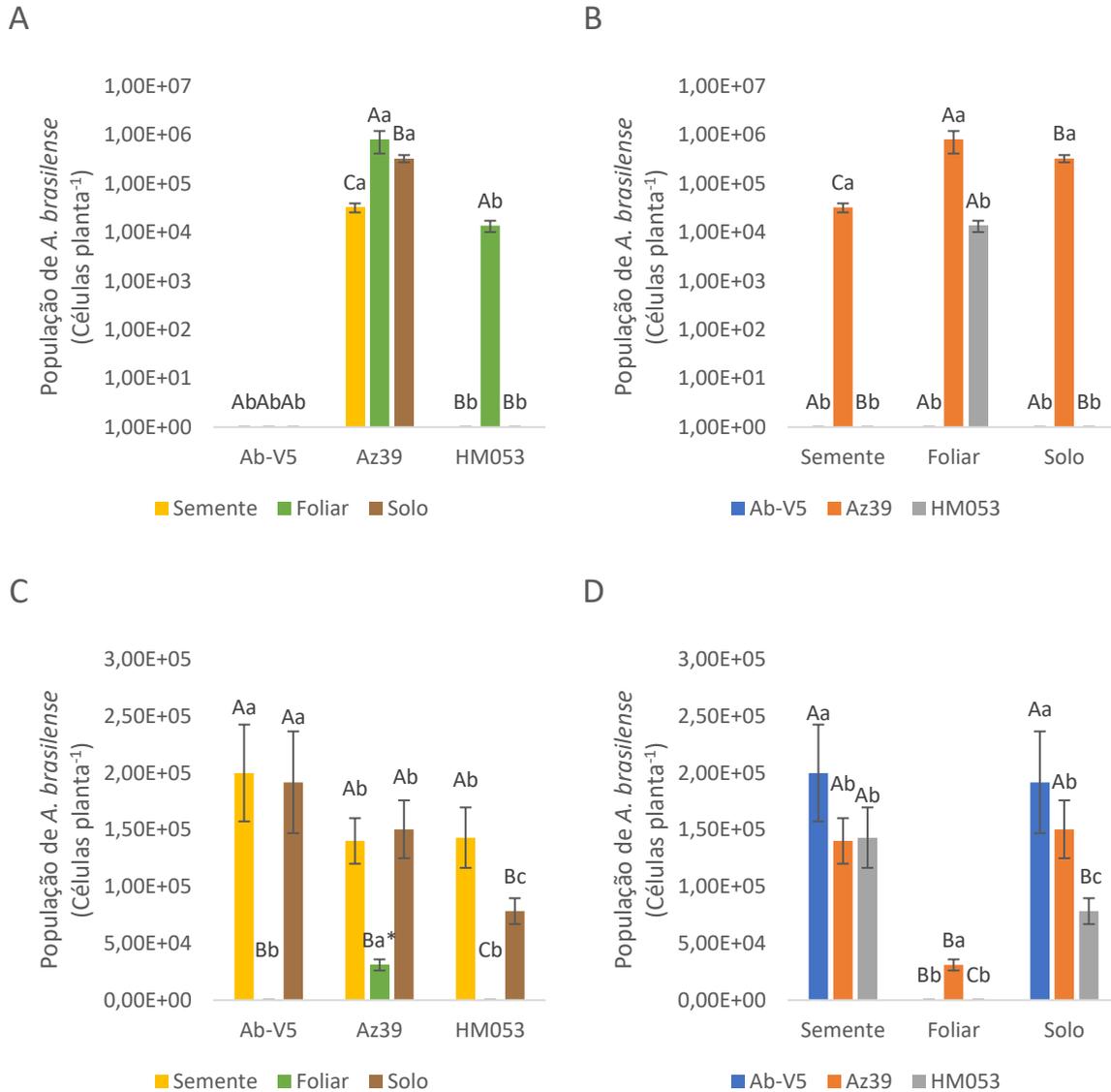
colaboradores (2021) identificaram uma queda da população de *A. brasilense* em raízes de milho no estágio V2-V3 seguido pela recuperação em V4-V5.

A população da estirpe Az39 na PA de plantas inoculadas via foliar foi de  $8,1 \times 10^5$  UFC planta<sup>-1</sup>, representando um aumento de mais de 10 vezes em relação a população da coleta anterior. Essa multiplicação celular nas folhas indica um possível comportamento filosférico ou endofítico foliar como reportado em Az19 e Az39, respectivamente (PUENTE *et al.*, 2020; GARCÍA *et al.*, 2020). Por outro lado, a população da estirpe HM053 reduziu 64,1% em relação a coleta anterior e a de Ab-V5 não pôde ser quantificada (<LOQ) (Figura 14).

A inoculação de Ab-V5 e Az39 via solo proporcionou uma colonização eficiente nas raízes de milho, alcançando populações similares a inoculação via sementes. Por outro lado, a estirpe HM053 apresentou população 45,2% inferior a inoculação via sementes (Figura 14).

Os dados obtidos nesta coleta corroboram os resultados obtidos no experimento *in vitro*, onde também foi possível observar a habilidade da estirpe Az39 realizar uma colonização sistêmica da planta inoculada, com capacidade de dispersão das raízes para a parte aérea e vice-versa. Foi possível observar uma população de  $3,3 \times 10^4$  e  $3,31 \times 10^5$  UFC na parte aérea de plantas inoculadas com Az39 via semente e solo, respectivamente. Até então, a mobilidade dessa estirpe de *A. brasilense* das raízes para a parte aérea não havia sido reportada. Entretanto, esse comportamento já havia sido descrito para as estirpes *A. brasilense* REC3 (GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012) e Sp7 (MALINICH; BAUER, 2018). A mobilidade de bactérias do sistema radicular para a parte aérea ocorre principalmente via vasos do xilema, através do fluxo de seiva gerado pela transpiração e da mobilidade ativa através dos flagelos bacterianos (BRADER *et al.*, 2017; JAMES *et al.*, 2002; COMPANT *et al.*, 2005, 2010), outra rota possível é a locomoção das bactérias através do tecido externo. Além disso, inesperadamente, foi verificado uma população de  $3,1 \times 10^4$  UFC em raízes de plantas inoculadas com Az39 via foliar, indicando a mobilidade das folhas para as raízes. Embora a rota oposta já tenha sido descrita, como discutido anteriormente, a colonização de raízes através da inoculação via foliar não havia sido relatada anteriormente para essa espécie.

Figura 14 - População de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via semente, folha e solo, na 4ª Coleta (28 dias após a emergência) na parte aérea (A e B) e raízes (C e D).



Nota: Os resultados são médias das populações de *A. brasilense* em 6 plantas, seguidas pelo desvio padrão. Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas e maiúsculas entre os métodos de inoculação representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor.

### 5.3.2.3.5 Coleta 5 (42 DAE)

A última coleta foi realizada 42 dias após a inoculação (estádio V6), 14 dias após a coleta 4. Nessa coleta foi observado que as populações de *A. brasilense* nas raízes de plantas inoculadas via sementes com Ab-V5, Az39 e HM053 aumentaram 388%; 624% e 428% em relação à população quantificada na coleta anterior (Figura 15).

Ao inocular o *A. brasilense* via foliar, a quantificação na PA foi possível apenas para a estirpe Az39 (Figura 15), indicando que a estirpe apresenta capacidade de colonização das

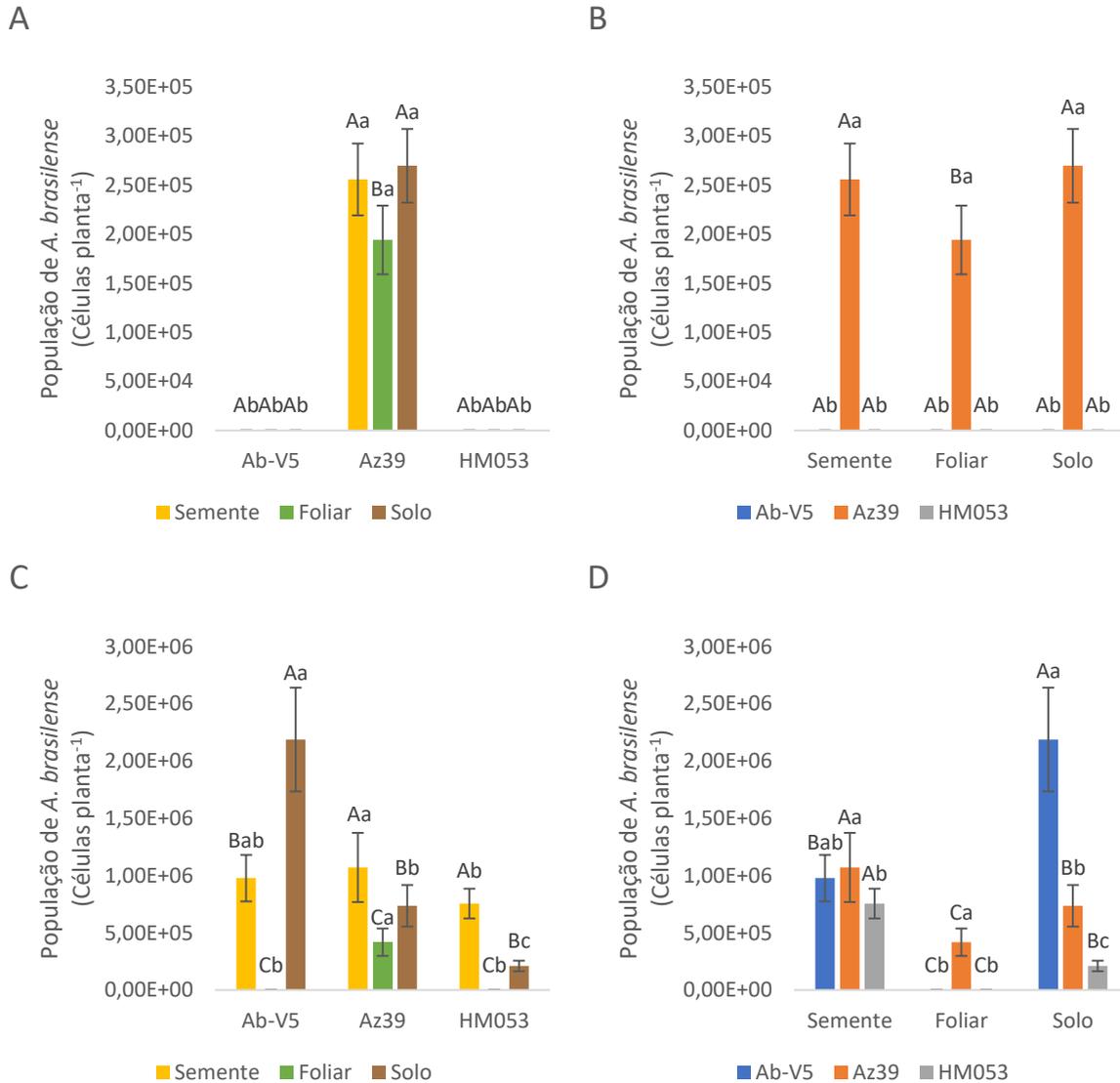
folhas de milho. Fukami e colaboradores (2017) relataram a ausência de Ab-V5 em folhas de milho 48 horas após a inoculação foliar. Por outro lado, a estirpe Az19, filogeneticamente próxima a Az39, aparenta ter comportamento filosférico (GARCÍA *et al.*, 2020).

Com relação à população inoculada via solo, houve aumento de 293%; 391% e 168% em relação à população quantificada no sistema radicular das plantas, na coleta 4 (28 DAE). Nas raízes, a população de Ab-V5 inoculado via solo foi de  $2,2 \times 10^6$  UFC planta<sup>-1</sup>, 124% maior que a população obtida pela inoculação via sementes. Por outro lado, a inoculação de Az39 e HM053 via solo foi 31,2% e 72,2% menor do que a inoculação via sementes, respectivamente (Figura 15).

No tocante à população de Az39 que colonizou o sistema radicular de plantas de milho inoculadas na parte aérea, inesperadamente, as maiores populações de Az39 na parte aérea ocorreram a partir dos tratamentos inoculados via semente ( $2,56 \times 10^5$  UFC planta<sup>-1</sup>) e solo ( $2,7 \times 10^5$  UFC planta<sup>-1</sup>), enquanto a inoculação via foliar proporcionou  $1,94 \times 10^5$  UFC planta<sup>-1</sup> (entre 72 e 76% da população obtida pelos outros métodos). De maneira similar, a população de *A. brasilense* nas raízes de tratamentos inoculados com Az39 via foliar também representou apenas uma fração da população obtida pela inoculação via sementes (39%) e solo (56,8%) (Figura 15).

Diante dos resultados, ao analisar a população de *A. brasilense* e os parâmetros biométricos obtidos é possível afirmar que a inoculação de Ab-V5 foi mais eficiente via solo, embora a população de *A. brasilense* nas raízes após 42 DAE seja semelhante à da inoculação via sementes, o aumento de MFPA e MSPA só foi observado sob inoculação via solo. Por outro lado, a estirpe HM053 apresentou melhor resultado em plantas inoculadas via sementes, onde a população final de  $1,43 \times 10^5$  UFC planta<sup>-1</sup> promoveu aumento de MFPA, MSPA, MFR, MSR e DC. Com relação a estirpe Az39, os resultados indicaram que a inoculação via solo gera populações de  $7,36 \times 10^5$  nas raízes e  $2,7 \times 10^5$  UFC planta<sup>-1</sup> na PA, e proporcionou aumento de MFPA, MSPA, MFR, MSR e DC. Entretanto, a inoculação via sementes e foliar também promove aumento dos parâmetros MFPA, MSPA e DC, com populações de  $1,07 \times 10^6$  e  $4,18 \times 10^5$  UFC planta<sup>-1</sup> nas raízes e  $2,56 \times 10^5$  e  $1,94 \times 10^5$  UFC planta<sup>-1</sup> na parte aérea, respectivamente.

Figura 15 - População de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053 inoculados via semente, folha e solo, na 5ª Coleta (42 dias após a emergência) na parte aérea (A e B) e raízes (C e D).



Nota: Os resultados são médias das populações de *A. brasilense* em 6 plantas, seguidas pelo desvio padrão. Letras minúsculas diferentes entre as estirpes bacterianas e maiúsculas entre os métodos de inoculação representam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Fonte: O autor.

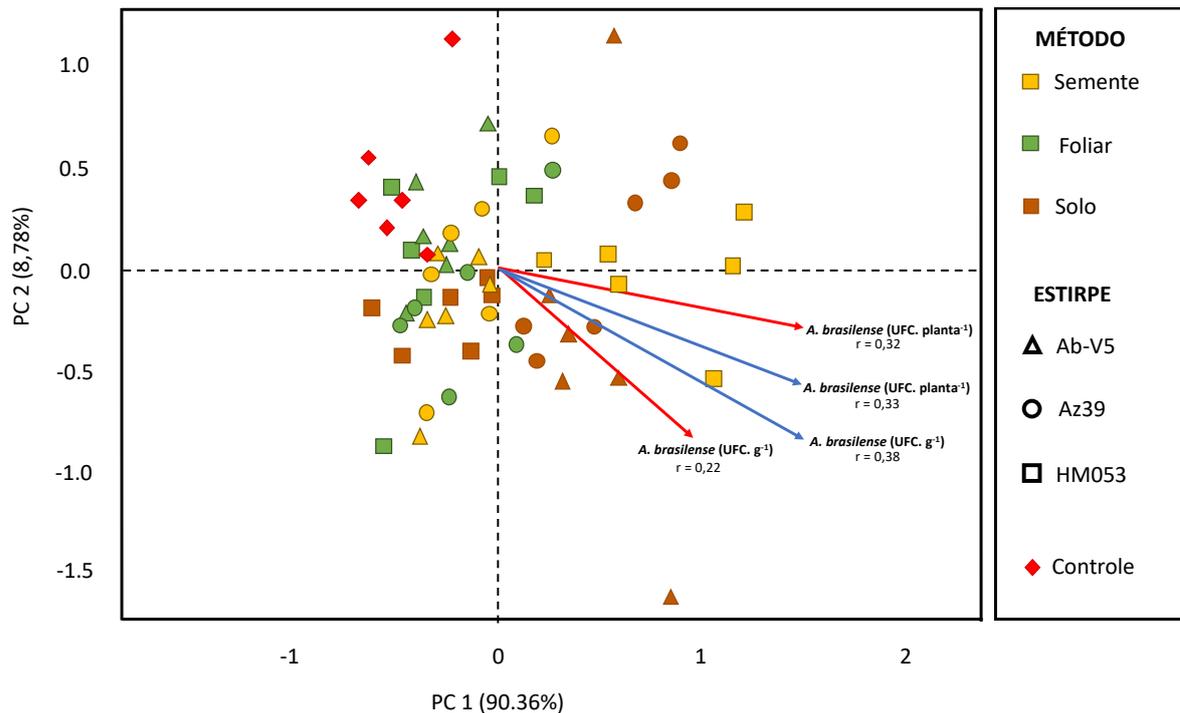
### 5.3.3 Análise de Componentes Principais

Para a análise de componentes principais os dados foram normalizados para obtenção de média igual a 0 e desvio padrão igual a 1. Foram consideradas apenas as duas primeiras dimensões (PC1 e PC2), que juntas explicam 99,14% da variação observada no experimento (Figura 16).

A população de *A. brasilense* nas raízes nas coletas 4 e 5 apresentaram significância ( $p < 0,01$ ) com a matriz de dados ordenados a partir de parâmetros biométricos da coleta 5 (42 DAE). A população de *A. brasilense* apresentou correlação positiva com os dados biométricos

(28 DAE,  $r = 0,33$  e  $0,38$ ; 42 DAE,  $r = 0,32$  e  $0,22$ ). A partir da PCA é possível observar que as amostras do tratamento Controle e da inoculação via foliar apresentaram correlação negativa com as populações de *A. brasilense* nas raízes. Por outro lado, a população de *A. brasilense* está correlacionada a plantas que apresentaram maiores teores de massa seca (MSR e MSPA), como as plantas inoculadas com Ab-V5 e Az39 via solo e HM053 via sementes.

Figura 16 - Distribuição dos tratamentos baseados em parâmetros biométricos (MSPA, MSR, DC) por análise de componentes principais em 42 dias após a emergência (5ª coleta).



Nota: Os vetores correspondem às populações de *A. brasilense* com  $p < 0,01$  de significância após 999 permutações. Cada vetor aponta para a direção do aumento para uma dada variável e seu comprimento indica a intensidade de correlação entre a variável e as pontuações da ordenação. Legenda: Vetores representam a população de *A. brasilense* nas raízes das plantas de milho na coleta 4 (28 DAE) em azul e a coleta 5 (42 DAE) representado em vermelho.

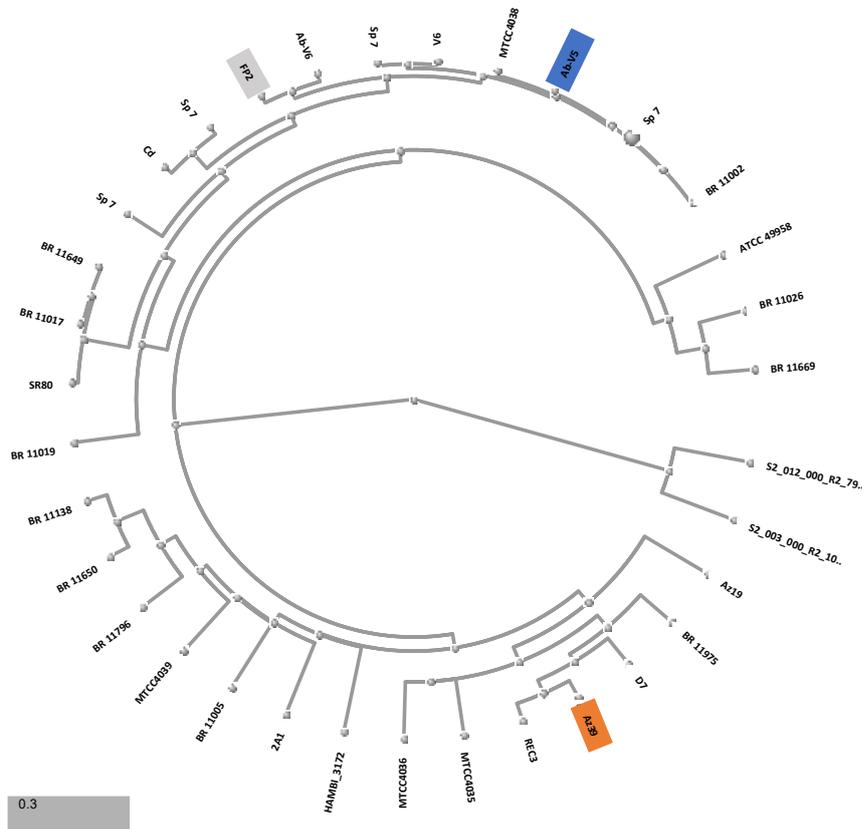
Fonte: O autor.

#### 5.4 GENÔMICA COMPARATIVA

O dendrograma representado na Figura 17 foi obtido a partir do BLAST genômico dos 34 genomas de *A. brasilense* depositados no NCBI. A partir do dendrograma é possível concluir que as estirpes Ab-V5 e HM053 são filogeneticamente próximas entre si. Embora a estirpe HM053 não possua genoma completo sequenciado, por ser derivado de FP2 é esperado que seus genomas apresentem alta similaridade. Por outro lado, a estirpe Az39 se encontra filogeneticamente distante das outras duas estirpes utilizadas, mas próxima das estirpes REC3 e D7. Tanto a estirpe REC3 quanto D7 foram anteriormente reportadas como endofíticas

facultativas (CORTÉS-PATIÑO *et al.*, 2021; GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012; PARDO-DÍAZ *et al.*, 2021).

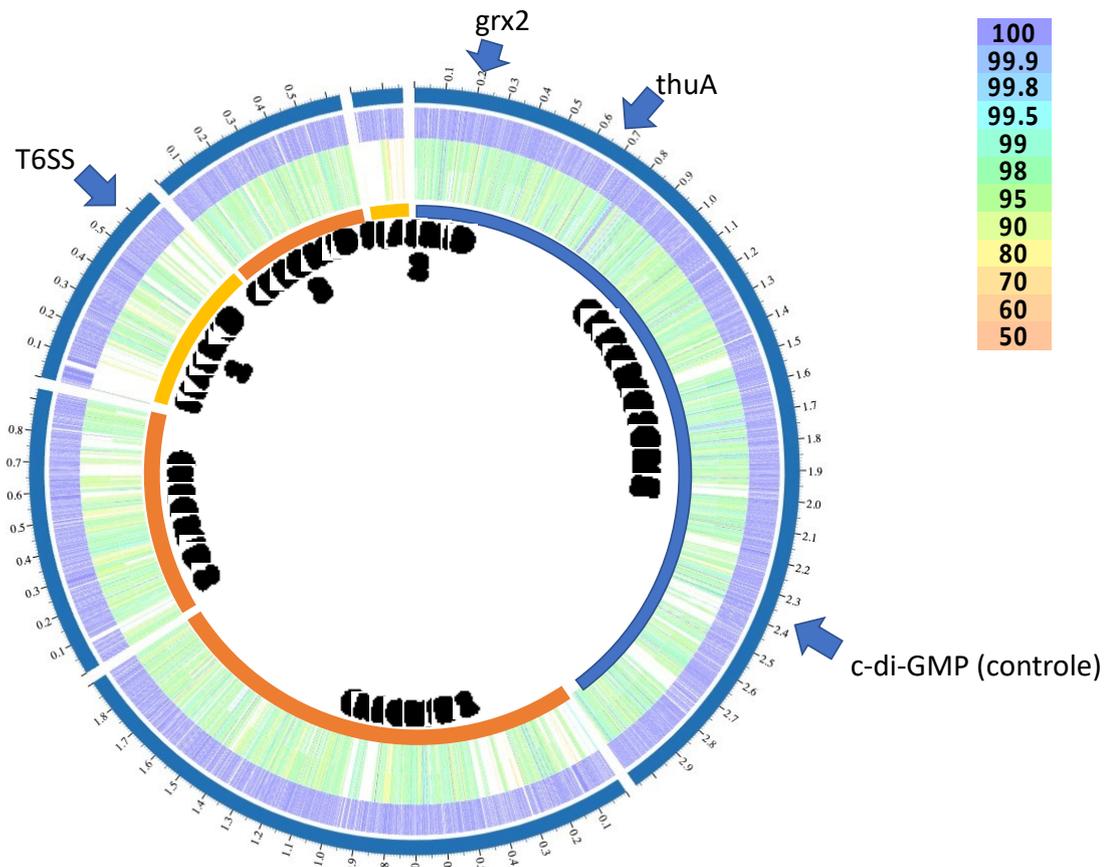
Figura 17 - Dendrograma baseado em BLAST genômico.



Fonte: Adaptado de NCBI/NLM/NIH (<https://go.usa.gov/xJUHs>)

A fim de compreender o comportamento endofítico de *A. brasilense* Az39 foi realizado um ensaio de comparação entre os genomas das estirpes utilizadas. Para isso, foi utilizado a ferramenta PATRIC (DAVIS *et al.*, 2020), com os parâmetros: 50% de cobertura mínima, 50% de identidade e BLAST e-value de  $1e^{-50}$ . O resultado obtido foi de 6699 proteínas codificadas por Az39, sendo divididas em 6 replicons: cromossomo (2923 proteínas), cromídeo 1 (1708 proteínas), cromídeo 2 (800 proteínas), cromídeo 3 (593 proteínas), plasmídeo 1 (552 proteínas) e plasmídeo 2 (123 proteínas) (Figura 18). Ademais, 1151 foram classificadas como proteínas hipotéticas.

Figura 18 - Proteômica comparativa entre as estirpes de *A. brasilense* Ab-V5, Az39 e HM053.



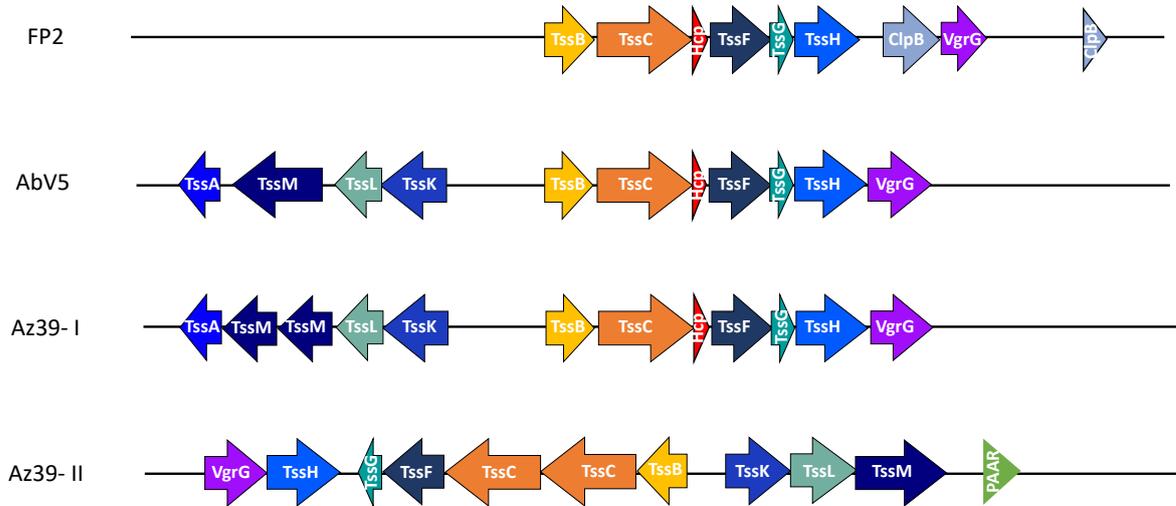
Nota: Representação circular do genoma de *A. brasilense* Az39. As cores do círculo mais interno representam os 6 replicons, cromossomo (azul), cromídeos (laranja) e plasmídeos (amarelo). A porcentagem de identidade entre as proteínas está representada por linhas coloridas de acordo com o diagrama de cores. De dentro para fora, estão representados os genomas de FP2, Ab-V5 e Az39. As setas azuis indicam a localização dos genes *grx2*, *thuA*, genes de controle do mensageiro secundário c-di-GMP e genes do cluster T6SS (sistema de secreção tipo VI).

Fonte: O autor, adaptado de PATRIC/BRC

Das 6699 proteínas, 1624 estão presentes exclusivamente em Az39, não sendo encontrada nos proteomas de Ab-V5 e FP2 (parental de HM053). Destas, 52 são pertencentes à superfamília dos transportadores ABC, 36 elementos móveis, 16 proteínas ribossomais, 16 transposases, 13 proteínas relacionadas aos sistemas de secreção, duas de quimiotaxia, duas de CRISPR e mais 326 proteínas. Dentre estas proteínas, as únicas que são codificadas fora do cromossomo são do cluster gênico que codifica proteínas relacionadas ao sistema de secreção do tipo VI (T6SS).

A partir destes dados, foi realizado uma busca na literatura visando encontrar genes que possam estar relacionados ao comportamento endofítico desta estirpe. A estirpe Az39, diferentemente de Ab-V5 e FP2, possui dois clusters gênicos que codificam para T6SS, um localizado no cromídeo 1 e outro no plasmídeo 1. O cluster presente no cromídeo é comum entre as estirpes, enquanto o cluster do plasmídeo é único para o Az39 (Figura 19).

Figura 19 - Clusters gênicos codificadores de proteínas do sistema de secreção tipo VI (T6SS) das estirpes *A. brasilense* FP2, Ab-V5 e Az39- I (cromídeo) e Az39-II (plasmídeo).



Nota: Os genes não estão representados em escala exata.

Fonte: O autor.

Várias bactérias encontram-se na natureza em associação íntima com outros microrganismos ou hospedeiros (STUBBENDIECK *et al.*, 2016). A fim de se adaptar e persistir nos nichos ecológicos, as bactérias desenvolveram ao longo da evolução vários mecanismos de proteção contra outros microrganismos e de colonização dos organismos hospedeiros. Dentre os diversos mecanismos, as bactérias desenvolveram vários sistemas de secreção, que podem ser classificados em 12 grupos ou classes. Dentre esses grupos, o sistema de secreção tipo VI (T6SS) é amplamente difundido entre as bactérias gram-negativas incluindo bactérias simbióticas de plantas (BERNAL; LLAMAS; FILLOUX, 2018).

A nível molecular, o T6SS age como uma seringa biológica semelhante ao encontrado em bacteriófagos. De forma simplificada, a estrutura consiste em um tubo feito de hexâmetros (Hcp) com um complexo proteico (VgrG e PAAR) como ponta, envolto por uma bainha contrátil (TssB-TssC). A contração dessa bainha faz com que o complexo proteico que forma a ponta do tubo interior penetre na célula alvo, permitindo a liberação de efetores (JURENAS; JOURNET, 2021).

Normalmente as bactérias apresentam ao menos um cluster de genes T6SS, a presença de dois ou mais, como ocorre em Az39 pode ser indicio de que cada sistema possui uma função dependendo da circunstância (BINGLE; BAILEY; PALLLEN, 2008). Cassán e colaboradores (2021) relataram recentemente a importância do T6SS1 de Az39 (localizado no cromídeo) no processo de anexação da bactéria no hospedeiro, na produção da auxina e na competição com fitopatógenos. O T6SS2 de Az39 não foi estudado até o momento, entretanto proteínas similares

aos presentes neste cluster são encontradas em outras estirpes de mesma espécie como *A. brasilense* MTCC4035 e MTCC 4036, espécies do mesmo gênero como *A. lipoferum* B510, e outros gêneros bacterianos como *Pseudomonas putida* PC2.

As estirpes de *A. brasilense* MTCC4035 e MTCC4036 foram isoladas da rizosfera de cana-de-açúcar e milho, respectivamente. Estas estirpes são filogeneticamente próximas à estirpe Az39 e possuem em seus plasmídeos genes idênticos aos encontrados no cluster T6SS2 de Az39. Diferentemente das estirpes de *A. brasilense*, as estirpes *A. lipoferum* B510 e *Pseudomonas putida* PC2 foram isoladas de tecidos superficialmente esterilizados (ELBELTAGY *et al.*, 2001; SONG *et al.*, 2017).

Sabe-se que a presença de T6SS parece ser mais comum entre bactérias de comportamento endofítico (FRANK, 2011; MITTER *et al.*, 2013; REINHOLD-HUREK e HUREK, 2011; SESSITSCH *et al.*, 2012). A importância do T6SS na colonização endofítica de plantas tem sido reportado recentemente para diversos gêneros, como em *Azoarcus olearius* (JIANG *et al.*, 2019), *Kosakonia* sp. (BECKER *et al.*, 2018; MOSQUITO *et al.*, 2020) e *Rhizobium etli* (SALINERO-LANZAROTE *et al.*, 2019). Diante do exposto, a função do sistema de secreção do tipo VI presente no plasmídeo 1 de Az39 (T6SS-2) na capacidade de colonização endofítica deve ser posteriormente investigado a fim de compreender a função desse grupo proteico na capacidade de colonização endofítica de Az39.

Além dos sistemas de secreção, outro importante fator relacionado ao processo de colonização de plantas é a motilidade no solo e formação de biofilme. Dentro desse contexto, o mensageiro secundário di-GMP cíclico (c-di-GMP) controla vários processos celulares, dentre eles a motilidade, formação de biofilme e virulência (JENAL; REINDERS; LORI, 2017, RÖMLING; GALPERIN; GOMELSKY, 2013). Esse mensageiro secundário universal é sintetizado por diguanilato ciclases (DGC) e degradado por fosfodiesterases específicas (PDE) (RÖMLING *et al.*, 2013, 2017). As estirpes Az39, Ab-V5 e FP2 possuem em comum oito genes codificadores para DGC/PDE, entretanto, Az39 possui um gene codificador de DGC/PDE extra. Esse gene extra codifica para uma proteína encontrada em outras estirpes de *Azospirillum* como *A. brasilense* Az19 e REC3, *A. baldaniorum* Sp245 e *A. lipoferum* B510. Curiosamente, essas quatro estirpes de *Azospirillum* já foram reportadas como endofíticas.

Recentemente, Sierra Cacho e colaboradores (2021) descreveram a importância de uma DGC de *A. baldaniorum* Sp245 na formação de biofilme e na colonização endofítica em raízes de trigo, confirmando a importância dessa enzima no processo de internalização de Sp245 através da modulação dos níveis de mensageiro secundário. Além disso, resultados semelhantes

foram encontrados na inoculação de *Azoarcus* sp. CIB em arroz (FÉRNANDEZ-LLAMOSAS; DÍAZ; CARMONA, 2021).

Ademais, além de proteínas relacionadas ao processo de colonização, proteínas relacionadas à manutenção delas no interior do hospedeiro são necessárias. Dentre os diversos genes relacionados a capacidade de se manterem viáveis nos tecidos internos de plantas, os genes relacionados a enzimas de detoxificação e resistência a estresses são algumas das mais amplamente difundidas em endofíticos (HARDOIM *et al.*, 2015).

As bactérias endofíticas ao penetrarem no interior dos tecidos vegetais devem enfrentar uma transição da rizosfera para a endosfera das plantas. Essa adaptação deve ocorrer pela significativa diferença de características como pH, pressão osmótica, interações bióticas, disponibilidade de nutrientes e concentração de oxigênio. Além disso, ao serem infectadas as plantas produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) como resposta, em um processo conhecido como “explosão oxidativa” (WOJTASZEK, 1997). Essa resposta da planta consiste na liberação de superóxido ( $O_2^-$ ) ou peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) no apoplasto celular, eliminando as bactérias invasoras suscetíveis (TORRES; JONES; DANGL, 2006). Portanto, as bactérias endofíticas a fim de superar as respostas de defesa da planta precisam detoxificar as EROs.

Diante disso, genes que codificam para enzimas relacionadas na detoxificação como superóxido dismutases, peroxidases e catalases são mais comuns em bactérias endofíticas em relação a fitopatogênicas e simbióticas noduladoras (HARDOIM *et al.*, 2015). As estirpes de *A. brasilense* utilizadas no trabalho possuem em comum em seus genomas genes que codificam para 2 superóxido dismutases, 7 peroxidases e 3 catalases. A estirpe Az39 não possui enzimas envolvidas diretamente na detoxificação de EROs que não estejam presentes também em Ab-V5 e FP2. Entretanto, Az39 possui a enzima glutaredoxina 3 (Grx2) a qual está envolvida no processo de reparo de resíduos oxidados de aminoácidos.

Os aminoácidos cisteína (Cys) e metionina (Met) são os mais suscetíveis a oxidação em decorrência do átomo de enxofre rico em elétrons na cadeia lateral (EZRATY *et al.*, 2017). Com isso, as enzimas e outras proteínas ricas em resíduos de Cys e Met são mais drasticamente afetadas pelo estresse oxidativo, como as proteínas de membrana. Por esse motivo, bactérias com genes do sistema GSH/grx nocauteados apresentam problemas na multiplicação, absorção e metabolização de fontes de carbono, colonização e nodulação (CHENG *et al.*, 2017; LUO *et al.*, 2020; SUZUKI *et al.*, 2007; TATÉ *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2020).

Pinski e colaboradores (2019) em uma revisão selecionaram estudos utilizando nocaute gênico a fim de definir a base genética da interação entre a planta e as bactérias

endofíticas. Nesse estudo, foram selecionados 8 genes relacionados a quimiotaxia e motilidade, 9 genes de adesão e formação do biofilme, 6 genes de proteínas de membrana e lipopolissacarídeos, 3 genes de modificação da parede celular, 8 relacionados ao transporte e utilização de substratos, 7 genes relacionados a proteção contra estresse, 4 genes de sistemas de secreção e 7 genes codificadores de proteínas reguladoras transcricionais. Dentre esses genes, o gene *thuA* relacionado a utilização de trealose está presente em Az39, mas ausente em Ab-V5 e FP2. A acumulação de trealose no interior da célula auxilia os microrganismos a lidar com o estresse oxidativo, dessecação, choque térmico e inanição (JENSEN *et al.*, 2005).

Diante desse contexto, o estudo das funções de cada um desses genes de forma isolada permitirá delimitar genes atuantes no comportamento sistêmico de algumas estirpes de *Azospirillum*.

## 6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação ao padrão de colonização, as estirpes Ab-V5 e HM053, filogeneticamente próximas de Sp7, mostraram possuir comportamento rizosférico/epifítico radicular restrito, não apresentando mobilidade das raízes para a parte aérea do milho. Por outro lado, a estirpe Az39 demonstrou capacidade em colonizar plantas de milho de forma sistêmica, translocando das raízes para a parte aérea e vice-versa.

As estirpes se diferiram quanto ao melhor método de inoculação. Para a estirpe Ab-V5 o melhor método consistiu na inoculação do solo em estágio V2.5, o qual permitiu aumento dos parâmetros biométricos e maior população final de *A. brasilense* nas raízes. Assim como em Ab-V5, a inoculação de Az39 via solo foi o método que proporcionou o melhor desenvolvimento das plantas, com uma população de *A. brasilense* nas raízes de  $7,4 \times 10^5$  UFC planta<sup>-1</sup>. Diferentemente das outras duas estirpes, para HM053 a resposta da inoculação via sementes foi superior aos demais métodos, apresentando o maior acúmulo de massa seca e população superior de *A. brasilense*.

A partir desse estudo foi possível observar que diferentemente das estirpes derivadas de Sp7, a estirpe Az39 possui comportamento endofítico com capacidade de propagação sistêmica. Diante disso, estudos objetivando a visualização do processo de colonização por microscopia se fazem necessários. Além disso, ensaios utilizando-se de mutantes com genes nocauteados permitirão conhecer as proteínas ou grupos proteicos que possibilitam a colonização endofítica das plantas por Az39.

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, M. K.; TAHIR, M. M.; RAHIM, N. Effect of N fertilizer source and timing on yield and N use efficiency of rainfed maize (*Zea mays* L.) in Kashmir–Pakistan. **Geoderma**, v. 195-196, p. 87-93, mar. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2012.11.013>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- AERON, A.; KHARE, E.; JHA, C. K.; MEENA, V.S.; AZIZ, S.M.A.; ISLAM, M.T.; KIM, K.; MEENA, S.K.; PATTANAYAK, A.; RAJASHEKARA, H. Revisiting the plant growth-promoting rhizobacteria: lessons from the past and objectives for the future. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 4, p. 665-676, 28 nov. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-019-01779-w>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- AFZAL, M.; YOUSAF, S.; REICHENAUER, T.G.; SESSITSCH, A. The Inoculation Method Affects Colonization and Performance of Bacterial Inoculant Strains in the Phytoremediation of Soil Contaminated with Diesel Oil. **International Journal of Phytoremediation**, v. 14, n. 1, p. 35-47, jan. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2011.552928>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Pesticides as Antagonists of Rhizobia and the Legume-*Rhizobium* Symbiosis: a paradigmatic and mechanistic outlook. **Biochemistry & Molecular Biology**, v. 1, n. 4, p. 63, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.12966/bmb.12.02.2013>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- AL-AWADHI, H.; DASHTI, N.; KHANAFER, M.; AL-MAILEM, D.; ALI, N.; RADWAN, S. Bias problems in culture-independent analysis of environmental bacterial communities: a representative study on hydrocarbonoclastic bacteria. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 1 ago. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-2-369>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- ALARCÓN, M.V.; SALGUERO, J.; LLORET, P. G. Auxin Modulated Initiation of Lateral Roots Is Linked to Pericycle Cell Length in Maize. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-10, 24 jan. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.00011>. Acesso em: 15 mar. 2022.
- AMELUNG, W.; BOSSIO, D.; VRIES, W. de; KÖGEL-KNABNER, I.; LEHMANN, J.; AMUNDSON, R.; BOL, R.; COLLINS, C.; LAL, R.; LEIFELD, J. Towards a global-scale soil climate mitigation strategy. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-10, 27 out. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18887-7>.
- ARORA, N.K.; TEWARI, S.; SINGH, R. Multifaceted Plant-Associated Microbes and Their Mechanisms Diminish the Concept of Direct and Indirect PGPRs. **Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances**, p. 411-449, 2013. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4\\_16](http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-1287-4_16).
- AYRAPETYAN, M.; WILLIAMS, T.C.; OLIVER, J.D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 7-13, jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.004>.
- AZEVEDO, A. M. **Multivariate Analysis**: Pacote Para Analise Multivariada no software R. [S. l.: s. n.]

AZEVEDO, A. M. **Tratamentos.ad**: pacote para análise de experimentos com testemunhas adicionais. [S. l.: s. n.]

BACKER, R.; ROKEM, J. S.; ILANGUMARAN, G.; LAMONT, J.; PRASLICKOVA, D.; RICCI, E.; SUBRAMANIAN, S.; SMITH, D.L. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1-17, 23 out. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>.

BAIS, H.P.; WEIR, T.L.; PERRY, L.G.; GILROY, S.; VIVANCO, J.M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, v. 57, n. 1, p. 233-266, 1 jun. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, n. 4, p. 37-40, 1987.

BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M.A. B.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, n. 1-3, p. 35-46, fev. 1986. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/bf02277385>.

BALSANELLI, E.; SERRATO, R.V.; BAURA, V.A. de; SASSAKI, G.; YATES, M. G.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. de; MONTEIRO, R.A. *Herbaspirillum seropedicae* rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. *Environmental Microbiology*, p. 2233-2244, abr. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02187.x>.

BALSANELLI, E.; TADRA-SFEIR, M.Z; FAORO, H.; PANKIEVICZ, V. C.; BAURA, V.A. de; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M de; DIXON, R.; MONTEIRO, R. Molecular adaptations of *Herbaspirillum seropedicae* during colonization of the maize rhizosphere. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 8, p. 2343-2356, 11 jun. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12887>.

BALSANELLI, E.; TULESKI, T.R.; BAURA, V.A. de; YATES, M.G.; CHUBATSU, L.S.; PEDROSA, F. de O.; SOUZA, E.M. de; MONTEIRO, R.A. Maize Root Lectins Mediate the Interaction with *Herbaspirillum seropedicae* via N-Acetyl Glucosamine Residues of Lipopolysaccharides. **PLOS One**, v. 8, n. 10, p. 1-9, 9 out. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0077001>.

BARBOSA, J.Z.; HUNGRIA, M.; SENA, J.V. da S.; POGGERE, G.; REIS, A.R. dos; CORRÊA, R.S. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. In Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 163, p. 103913, jul. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103913>.

BARBOSA, J.Z.; ROBERTO, L. de A.; HUNGRIA, M.; CORRÊA, R.S.; MAGRI, E.; CORREIA, T.D. Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, v. 170, p. 104276, fev. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104276>.

- BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 3, p. 246-256, 1 jul. 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s003740050549>.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L.E. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. **Advances in Agronomy**, p. 77-136, 2010. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2113\(10\)08002-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2113(10)08002-8).
- BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 36, n. 9, p. 591-608, 1 set. 1990. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1139/m90-105>.
- BASHAN, Yoav; DE-BASHAN, Luz E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, Juan-Pablo. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1-2, p. 1-33, 19 nov. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-013-1956-x>.
- BECKER, M.; PATZ, S.; BECKER, Y.; BERGER, B.; DRUNGOWSKI, M.; BUNK, B.; OVERMANN, J.; SPRÖER, C.; REETZ, J.; TCHAKOUNTE, G.V. T. Comparative Genomics Reveal a Flagellar System, a Type VI Secretion System and Plant Growth-Promoting Gene Clusters Unique to the Endophytic Bacterium *Kosakonia radicincitans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1-22, 30 ago. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2018.01997>.
- BEIJERINCK, M W. Uber ein *spirillum* welches frei en Stick-stoffbinden kann? **Zentralbl Bakteriol**, v. 2, p. 353-359, 1925.
- BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R.A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, n. 2, p. 215-229, jan. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsec.2004.08.006>.
- BERG, G.; RAAIJMAKERS, J.M. Saving seed microbiomes. **The ISME Journal**, v. 12, n. 5, p. 1167-1170, 15 jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41396-017-0028-2>.
- BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 68, n. 1, p. 1-13, abr. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>.
- BERNAL, P.; LLAMAS, M.A.; FILLOUX, A. Type VI secretion systems in plant-associated bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 1-15, 10 nov. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13956>.
- BINGLE, L.E.; BAILEY, C.M.; PALLAN, M.J. Type VI secretion: a beginner's guide. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 3-8, fev. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2008.01.006>.
- BLAGODATSKAYA, E.; KUZYAKOV, Y. Active microorganisms in soil: critical review of estimation criteria and approaches. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 67, p. 192-211, dez. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.08.024>.

BODOR, A.; BOUNEDJOUM, N.; VINCZE, G.E.; KIS, Á.E.; LACZI, K.; BENDE, G.; SZILÁGYI, Á.; KOVÁCS, T.; PEREI, K.; RÁKHELY, G. Challenges of unculturable bacteria: environmental perspectives. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 19, n. 1, p. 1-22, 1 fev. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-020-09522-4>.

BÖHM, M.; HUREK, T.; REINHOLD-HUREK, B. Twitching Motility Is Essential for Endophytic Rice Colonization by the N<sub>2</sub>-Fixing Endophyte *Azoarcus* sp. Strain BH72. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 5, p. 526-533, maio 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-20-5-0526>.

BORCHARDT, M.A.; BOEHM, A.B.; SALIT, M.; SPENCER, S.K.; WIGGINTON, K.R.; NOBLE, R.T. The Environmental Microbiology Minimum Information (EMMI) Guidelines: qPCR and dPCR quality and reporting for environmental microbiology. **Environmental Science & Technology**, v. 55, n. 15, p. 10210-10223, jul. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.1c01767>.

BOWLES, T.M.; ATALLAH, S.S.; CAMPBELL, E.E.; GAUDIN, A.C.M.; WIEDER, W.R.; GRANDY, A.S. Addressing agricultural nitrogen losses in a changing climate. **Nature Sustainability**, v. 1, n. 8, p. 399-408, ago. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41893-018-0106-0>.

BRADER, G.; COMPANT, S.; VESCIO, K.; MITTER, B.; TROGNITZ, F.; MA, L.J.; SESSITSCH, A. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 1, p. 61-83, 4 ago. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035641>.

BRIMECOMBE, M. J.; DE LEIJ, F. A. A. M.; LYNCH, J. M. Rhizodeposition and Microbial Populations. In: PINTON, R.; VARANINI, Z.; NNANNIPIERI, P. (Orgs.). **The rhizosphere**. 2. ed. Nova York: CRC Press-Taylor & Francis Group, 2007. v. 1p. 73-111. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

BRU, D.; MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L. Quantification of the Detrimental Effect of a Single Primer-Template Mismatch by Real-Time PCR Using the 16S rRNA Gene as an Example. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1660-1663, mar. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02403-07>.

BULEGON, L.G.; GUIMARÃES, V.F.; BATTISTUS, A.G.; INAGAKI, A.M.; COSTA, N.V. da. Mitigation of drought stress effects on soybean gas exchanges induced by *Azospirillum brasilense* and plant regulators. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, p. 1-9, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/1983-40632019v49s2807>.

BULGARELLI, D.; ROTT, M.; SCHLAEPPI, K.; VAN THEMAAT, E.V.L.; AHMADINEJAD, N.; ASSENZA, F.; RAUF, P.; HUETTEL, B.; REINHARDT, R.; SCHMELZER, E. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 91-95, ago. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11336>.

BUSCHART, A.; SACHS, S.; CHEN, X.; HERGLOTZ, J.; KRAUSE, A.; REINHOLD-HUREK, B. Flagella Mediate Endophytic Competence Rather Than Act as MAMPS in Rice-

*Azoarcus* sp. Strain BH72 Interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 2, p. 191-199, 2012.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G. L. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 1 abr. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

CABALLERO-MELLADO, J.; LÓPEZ-REYES, L.; BUSTILLOS-CRISTALES, R. Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, n. 2, p. 283-288, set. 1999. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb08689.x>.

CACHO, D.S.; SÁNCHEZ, D.S.Z.; XIQUI-VÁZQUEZ, M.L.; GÓNGORA, V.I.V.; RAMÍREZ-MATA, A.; BACA, B.E. CdgC, a Cyclic-di-GMP Diguanylate Cyclase of *Azospirillum baldaniorum* Is Involved in Internalization to Wheat Roots. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 1-16, 20 out. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2021.748393>.

CAIRES, E.F.; BINI, A.R.; BARÃO, L.F.C.; HALISKI, A.; DUART, V.M.; RICARDO, K. da S. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization for no-till cereal production. **Agronomy Journal**, v. 113, n. 1, p. 560-576, 11 dez. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/agj2.20488>.

CANELLAS, L.P.; SILVA, S.F. da; OLK, D.C.; OLIVARES, F.L. Foliar application of plant growth-promoting bacteria and humic acid increase maize yields. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 13, n. 1, p. 131-138, 2015.

CANFORA, L.; LOPAPA, G.; ANTISARI, L.V.; BAZAN, G.; DAZZI, C.; BENEDETTI, A. Spatial microbial community structure and biodiversity analysis in “extreme” hypersaline soils of a semiarid Mediterranean area. **Applied Soil Ecology**, v. 93, p. 120-129, set. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.04.014>.

CANGELOSI, G.A.; MESCHKE, J.S. Dead or Alive: molecular assessment of microbial viability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 19, p. 5884-5891, out. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01763-14>.

CARDOZO, P.; PALMA, A. di; MARTIN, S.CERLIANI, C.; ESPOSITO, G.; REINOSO, H.; TRAVAGLIA, C. Improvement of Maize Yield by Foliar Application of *Azospirillum brasilense* Az39. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 41, n. 3, p. 1032-1040, 7 abr. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-021-10356-9>.

CASSÁN, F.; CONIGLIO, A.; LÓPEZ, G.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; CARLAN, C.L.N. de; DONADIO, F.; TORRES, D.; ROSAS, S.; PEDROSA, F.O. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 4, p. 461-479, maio 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>.

CASSÁN, F.; DIAZ-ZORITA, M. *Azospirillum* sp. in current agriculture: from the laboratory to the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 103, p. 117-130, dez. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.020>.

CASSMAN, K.G.; GRASSINI, P. A global perspective on sustainable intensification research. **Nature Sustainability**, v. 3, n. 4, p. 262-268, abr. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41893-020-0507-8>.

CHEN, Y.; WANG, D.; GE, X.; ZHAO, B.; WANG, X.; WANG, B. Comparative proteomics of leaves found at different stem positions of maize seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 198, p. 116-128, jul. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.03.022>.

CHENG, G.; KARUNAKARAN, R.; EAST, A.K.; MUNOZ-AZCARATE, O.; POOLE, P.S. Glutathione affects the transport activity of *Rhizobium leguminosarum* 3841 and is essential for efficient nodulation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 8, p. 1-7, 23 fev. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnx045>.

COMPANT, S.; CLÉMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, maio 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>.

COMPANT, S.; KAPLAN, H.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; BARKA, E.A.; CLÉMENT, C. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 1, p. 84-93, jan. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00410.x>.

COMPANT, S.; REITER, B.; SESSITSCH, A.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E.A. Endophytic Colonization of *Vitis vinifera* L. by Plant Growth-Promoting Bacterium *Burkholderia* sp. Strain PsJN. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 4, p. 1685-1693, abr. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.4.1685-1693.2005>.

CONAB. **Safra Brasileira de Grãos**. 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 11 jun. 2022.

CONANT, R.T.; BERDANIER, A.B.; GRACE, P.R. Patterns and trends in nitrogen use and nitrogen recovery efficiency in world agriculture. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 27, n. 2, p. 558-566, jun. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/gbc.20053>.

CONIGLIO, A.; MORA, V.; PUENTE, M.; CASSÁN, F. *Azospirillum* as Biofertilizer for Sustainable Agriculture: *Azospirillum brasilense* Az39 as a model of PGPR and field traceability. **Sustainability in Plant and Crop Protection**, p. 45-70, 2019. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-17597-9\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-17597-9_4).

CONIJN, J.G.; BINDRABAN, P.S.; SCHRÖDER, J.J.; JONGSCHAAP, R.E.E. Can our global food system meet food demand within planetary boundaries? **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 251, p. 244-256, jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2017.06.001>.

CORTÉS-PATIÑO, S.; VARGAS, C.; ÁLVAREZ-FLÓREZ, F.; BONILLA, R.; ESTRADA-BONILLA, G. Potential of *Herbaspirillum* and *Azospirillum* Consortium to Promote Growth of Perennial Ryegrass under Water Deficit. **Microorganisms**, v. 9, n. 1, p. 91, 1 jan. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9010091>.

COUILLEROT, O.; BOUFFAUD, M.; BAUDOIN, E.; MULLER, D.; CABALLERO-MELLADO, J.; MOËNNE-LOCCOZ, Y. Development of a real-time PCR method to

quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298-2305, dez. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.09.003>.

CUNHA, E.T. da; PEDROLO, A.M.; PALUDO, F.; SCARIOT, M.C.; ARISI, A.C.M. *Azospirillum brasilense* viable cells enumeration using propidium monoazide-quantitative PCR. **Archives of Microbiology**, v. 202, n. 7, p. 1653-1662, 9 abr. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-020-01877-0>.

D'HAENE, B.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 262-270, abr. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.12.007>.

DAVIS, C. Enumeration of probiotic strains: review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 9-17, ago. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.04.012>.

DAVIS, J.J.; WATTAM, A.R.; AZIZ, R.K.; BRETTIN, T.; BUTLER, R.; BUTLER, R.M.; CHLENSKI, P.; CONRAD, N.; DICKERMAN, A.; DIETRICH, E.M. The PATRIC Bioinformatics Resource Center: expanding data and analysis capabilities. **Nucleic Acids Research**, p. 606-612, 31 out. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkz943>.

DÍAZ-ZORITA, M.; CANIGIA, M.V.F.; BRAVO, O.Á.; BERGER, A.; SATORRE, E.H. Field Evaluation of Extensive Crops Inoculated with *Azospirillum* sp. In: CASSÁN, F.D.; OKON, Y.; CREUS, C.M. **Handbook for Azospirillum**: technical issues and protocols. Cham: Springer International, 2015. p. 435-445.

DILKES, N.B.; JONES, D.L.; FARRAR, J. Temporal Dynamics of Carbon Partitioning and Rhizodeposition in Wheat. **Plant Physiology**, v. 134, n. 2, p. 706-715, 1 fev. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.032045>.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621-631, ago. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro954>.

DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621-631, ago. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro954>.

ELBELTAGY, A.; NISHIOKA, K.; SATO, T.; SUZUKI, H.; YE, B.; HAMADA, T.; ISAWA, T.; MITSUI, H.; MINAMISAWA, K. Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 5285-5293, nov. 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.67.11.5285-5293.2001>.

ESITKEN, A.; PIRLAK, L.; TURAN, M.; SAHIN, F. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. **Scientia Horticulturae**, v. 110, n. 4, p. 324-327, nov. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2006.07.023>.

ESTENDORFER, J.; STEMPFHUBER, B.; HAURY, P.; VESTERGAARD, G.; RILLIG, M.C.; JOSHI, J.; SCHRÖDER, P.; SCHLOTTER, M. The Influence of Land Use Intensity on

- the Plant-Associated Microbiome of *Dactylis glomerata* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 1-10, 21 jun. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2017.00930>.
- EZRATY, B.; GENNARIS, A.; BARRAS, F.; COLLET, J. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 7, p. 385-396, 19 abr. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.26>.
- FAGERIA, N.K.; STONE, L. F. Physical, Chemical, and Biological Changes in the Rhizosphere and Nutrient Availability. **Journal of Plant Nutrition**, v. 29, n. 7, p. 1327-1356, ago. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01904160600767682>.
- FAHAD, S.; HUSSAIN, S.; BANO, A.; SAUD, S.; HASSAN, S.; SHAN, D.; KHAN, F.A.; KHAN, F.; CHEN, Y.; WU, C. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 7, p. 4907-4921, 6 nov. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3754-2>.
- FALLAH, N.; YANG, Z.; TAYYAB, M.; ZHANG, C.; ABUBAKAR, A.Y.; LIN, Z.; PANG, Z.; ALLISON, A.; ZHANG, H. Depth-dependent influence of biochar application on the abundance and community structure of diazotrophic under sugarcane growth. **PLOS One**, v. 16, n. 7, p. 1-19, 19 jul. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0253970>.
- FAO. **FAOSTAT**. 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI>. Acesso em: 11 jun. 2022.
- FELTRAN-BARBIERI, R.; FÉRES, J.G. Degraded pastures in Brazil: improving livestock production and forest restoration. **Royal Society Open Science**, v. 8, n. 7, p. 201854, jul. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1098/rsos.201854>.
- FERNÁNDEZ-LLAMOSAS, H.; DÍAZ, E.; CARMONA, M. Motility, Adhesion and c-di-GMP Influence the Endophytic Colonization of Rice by *Azoarcus* sp. **CIB. Microorganisms**, v. 9, n. 3, p. 554, 8 mar. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms9030554>.
- FERREIRA, D.A.; SILVA, T.F.da; PYLRO, V.S.; SALLES, J. F.; ANDREOTE, F. D.; DINI-ANDREOTE, F. Soil Microbial Diversity Affects the Plant-Root Colonization by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. **Microbial Ecology**, v. 82, n. 1, p. 100-103, 21 mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-020-01502-z>.
- FERREIRA, E.B.; CAVALCANTI, P.P.; NOGUEIRA, D.A. ExpDes: an R package for anova and experimental designs. **Applied Mathematics**, v. 5, n. 19, p. 2952-2958, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4236/am.2014.519280>.
- FERREIRA, N.S.; SANT'ANNA, F.H.; REIS, V.M.; AMBROSINI, A.; VOLPIANO, C.G.; ROTHBALLER, M.; SCHWAB, S.; BAURA, V.A.; BALSANELLI, E.; PEDROSA, F.O. Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 12, p. 6203-6212, 1 dez. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>.

FIERER, N.; JACKSON, R.B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 626-631, jan. 2006.

FILIPINI, L.D.; PILATTI, F.K. MEYER, E.; VENTURA, B.S.; LOURENZI, C.R.; LOVATO, P.E. Application of *Azospirillum* on seeds and leaves, associated with *Rhizobium* inoculation, increases growth and yield of common bean. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 3, p. 1033-1038, 2 nov. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-020-02092-7>.

FOLEY, J.A.; RAMANKUTTY, N.; BRAUMAN, K.A.; CASSIDY, E.S.; GERBER, J.S.; JOHNSTON, M.; MUELLER, N.D.; O'CONNELL, C.; RAY, D.K.; WEST, P.C. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, v. 478, n. 7369, p. 337-342, out. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10452>.

FOUCHER, A.; EVRARD, O.; FICETOLA, G.F.; GIELLY, L.; POULAIN, J.; GIGUET-COVEX, C.; LACEBY, J.P.; SALVADOR-BLANES, S.; CERDAN, O.; POULENARD, J. Persistence of environmental DNA in cultivated soils: implication of this memory effect for reconstructing the dynamics of land use and cover changes. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 29 jun. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-67452-1>.

FRANK, A. C. The Genomes of Endophytic Bacteria. In: PIRTTILÄ, A. M.; FRANK, A. C. **Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 107-136.

FRENCH, E.; KAPLAN, I.; IYER-PASCUZZI, A.; NAKATSU, C.H.; ENDERS, L. Emerging strategies for precision microbiome management in diverse agroecosystems. **Nature Plants**, v. 7, n. 3, p. 256-267, mar. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41477-020-00830-9>.

FUKAMI, J.; ABRANTES, J.L.F.; CERRO, P.; NOGUEIRA, M.A.; OLLERO, F.J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Revealing strategies of quorum sensing in *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6. **Archives of Microbiology**, v. 200, n. 1, p. 47-56, 5 ago. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-017-1422-x>.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1-13, 13 jan. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-015-0171-y>.

FUKAMI, J.; OLLERO, F.J.; MEGÍAS, M.; HUNGRIA, M. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 17 jul. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-017-0453-7>.

GALAMBOS, N.; COMPANT, S.; WÄCKERS, F.; SESSITSCH, A.; ANFORA, G.; MAZZONI, V.; PERTOT, I.; PERAZZOLLI, M. Beneficial Insects Deliver Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes between Tomato Plants. **Microorganisms**, v. 9, n. 1294, p. 1-14, 2021.

GALINDO, F.S.; TEIXEIRA FILHO, M.C.M.; BUZETTI, S.; RODRIGUES, W.L.; SANTINI, J.M.K.; ALVES, C.J. Nitrogen fertilisation efficiency and wheat grain yield affected by nitrogen doses and sources associated with *Azospirillum brasilense*. **Acta**

**Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science**, v. 69, n. 7, p. 606-617, 12 jun. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/09064710.2019.1628293>.

GAMALERO, E.; LINGUA, G.; BERTA, G.; LEMANCEAU, P. Methods for studying root colonization by introduced beneficial bacteria. **Agronomie**, v. 23, n. 5-6, p. 407-418, jul. 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/agro:2003014>.

GARCÍA, J.E.; LABARTHE, M.M.; PAGNUSSAT, L.A.; AMENTA, M.; CREUS, C.M.; MARONICHE, G.A. Signs of a phyllospheric lifestyle in the genome of the stress-tolerant strain *Azospirillum brasilense* Az19. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 126130, nov. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126130>.

GARRIDO-JURADO, I.; RESQUÍN-ROMERO, G.; AMARILLA, S. P.; RÍOS-MORENO, A.; CARRASCO, L.; QUESADA-MORAGA, E. Transient endophytic colonization of melon plants by entomopathogenic fungi after foliar application for the control of *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: aleyrodidae). **Journal of Pest Science**, v. 90, n. 1, p. 319-330, 29 abr. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10340-016-0767-2>.

GARRIDO-OTER, R.; NAKANO, R.T.; DOMBROWSKI, N.; MA, K.; MCHARDY, A.C.; SCHULZE-LEFERT, P. Modular Traits of the Rhizobiales Root Microbiota and Their Evolutionary Relationship with Symbiotic Rhizobia. **Cell Host & Microbe**, v. 24, n. 1, p. 155-167, jul. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2018.06.006>.

GHENOV, F.; GERHARDT, E.C.M.; HUERGO, L.F.; PEDROSA, F.O.; WASSEM, R.; SOUZA, E.M. Characterization of glutamine synthetase from the ammonium-excreting strain HM053 of *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, p. 1-8, 2022. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1519-6984.235927>.

GLASS, A.D.M. Nitrogen Use Efficiency of Crop Plants: physiological constraints upon nitrogen absorption. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 5, p. 453-470, set. 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/07352680390243512>.

GOULDING, K.; JARVIS, S.; WHITMORE, A. Optimizing nutrient management for farm systems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 363, n. 1491, p. 667-680, 25 jul. 2007. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2007.2177>.

GREGORY, P. J. Roots and the Biological Environment. In: GREGORY, P. J. **Plant Roots: growth, activity and interaction with soils**. Oxford: Black-Wil Publishing, 2007. Cap. 6. p. 174-215.

GROVER, M.; BODHANKAR, S.; SHARMA, A.; SHARMA, P.; SINGH, J.; NAIN, L. PGPR Mediated Alterations in Root Traits: way toward sustainable crop production. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 4, p. 1-28, 8 jan. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2020.618230>.

GUERRERO-MOLINA, M.F.; WINIK, B.C.; PEDRAZA, R.O. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 205-212, out. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.011>.

HA, J-H.; HAN, S-H.; LEE, H-J.; PARK, C-M. Environmental Adaptation of the Heterotrophic-to-Autotrophic Transition: the developmental plasticity of seedling

establishment. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 36, n. 2, p. 128-137, 4 mar. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/07352689.2017.1355661>.

HALLMANN, J. Plant Interactions with Endophytic Bacteria. *In*: JEGER, M. J.; SPENCE, N. J. **Biotic Interactions in Plant-Pathogen Associations**. Nova Iorque: Cabi Publishing, 2006. p. 87-121.

HAN, H.S.; LEE, K.D. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. **Plant, Soil and Environment**, v. 52, n. 3, p. 130-136, 2006.

HAN, I.; LEE, T.K.; HAN, J.; VAN DOAN, T.; KIM, S.B.; PARK, J. Improved detection of microbial risk of releasing genetically modified bacteria in soil by using massive sequencing and antibiotic resistance selection. **Journal of Hazardous Materials**, v. 227-228, p. 172-178, ago. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.031>.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; BERG, G.; PIRTILÄ, A.M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The Hidden World within Plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293-320, set. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/membr.00050-14>.

HARRISON, P.W.; LOWER, R.P.J.; KIM, N.K.D.; YOUNG, J.P.W. Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 141-148, abr. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.010>.

HEIJDEN, M.G.A.D.; HARTMANN, M. Networking in the Plant Microbiome. **PLOS Biology**, v. 14, n. 2, p. 1-9, 12 fev. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.1002378>.

HEO, A.Y.; KOO, Y.M.; CHOI, H.W. Biological Control Activity of Plant Growth Promoting Rhizobacteria *Burkholderia contaminans* AY001 against Tomato Fusarium Wilt and Bacterial Speck Diseases. **Biology**, v. 11, n. 4, p. 619, 18 abr. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/biology11040619>.

HERNÁNDEZ, I.; SANT, C.; MARTÍNEZ, R.; FERNÁNDEZ, C. Design of bacterial Strain-Specific qPCR Assay Using NGS Data and Publicly Available Resources and Its Application to Track Biocontrol Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, n. 208, p. 1-11, 10 mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00208>.

HERNÁNDEZ-MONTIEL, L. G.; CHIQUITO-CONTRERAS, C. J.; MURILLO-AMADOR, B.; VIDAL-HERNÁNDEZ, L.; QUIÑONES-AGUILAR, E. E.; CHIQUITO-CONTRERAS, R. G. Efficiency of two inoculation methods of *Pseudomonas putida* on growth and yield of tomato plants. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 1003-1012, 2017.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR Analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 9, p. 1026-1030, set. 1993. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0993-1026>.

HOLLAND, P.M.; ABRAMSON, R.D.; WATSON, R.; GELFAND, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of

*Thermus aquaticus* DNA polymerase. **PNAS**, v. 88; n. 16; p. 7276-7280, 15 ago. 1991. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.16.7276>.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 13 jan. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; CRISPINO, C.C.; MORAES, J.Z.; SIBALDELLI, R.N.R.; MENDES, I.C.; ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 86, n. 4, p. 927-939, 10 out. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4141/p05-098>.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. **Biology and Fertility of Soils**, v. 49, n. 7, p. 791-801, 12 jan. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-012-0771-5>.

HUNGRIA, M.; RIBEIRO, R.A.; NOGUEIRA, M.A. Draft Genome Sequences of *Azospirillum brasilense* Strains Ab-V5 and Ab-V6, Commercially Used in Inoculants for Grasses and Legumes in Brazil. **Genome Announcements**, v. 6, n. 20, p. 1-2, 17 maio 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.00393-18>.

HUNGRIA, M.; RONDINA, A.B.L.; NUNES, A.L.P.; ARAUJO, R.S.; NOGUEIRA, M.A. Seed and leaf-spray inoculation of PGPR in brachiarias (*Urochloa* spp.) as an economic and environmental opportunity to improve plant growth, forage yield and nutrient status. **Plant and Soil**, v. 463, n. 1-2, p. 171-186, 11 mar. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-021-04908-x>.

JAMES, E.K.; GYANESHWAR, P.; MATHAN, N.; BARRAQUIO, W.L.; REDDY, P.M.; IANNETTA, P.P.M.; OLIVARES, F.L.; LADHA, J.K. Infection and Colonization of Rice Seedlings by the Plant Growth-Promoting Bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 15, n. 9, p. 894-906, set. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.9.894>.

JENAL, U.; REINDERS, A.; LORI, C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 271-284, 6 fev. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>.

JENSEN, J.B.; AMPOMAH, O.Y.; DARRAH, R.; PETERS, N.K.; BHUVANESWARI, T.V. Role of Trehalose Transport and Utilization in *Sinorhizobium meliloti*-Alfalfa Interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 18, n. 7, p. 694-702, jul. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-18-0694>.

JIANG, X.; BEUST, A.; SAPPA, P.K.; VÖLKER, U.; DINSE, T.; HERGLOTZ, J.; REINHOLD-HUREK, B. Two Functionally Deviating Type 6 Secretion Systems Occur in the Nitrogen-Fixing Endophyte *Azoarcus olearius* BH72. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1-13, 12 mar. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2019.00459>.

JOHNSTON-MONJE, D.; LUNDBERG, D.S.; LAZAROVITS, G.; REIS, V.M.; RAIZADA, M.N. Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and

soil. **Plant and Soil**, v. 405, n. 1-2, p. 337-355, 31 mar. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-016-2826-0>.

JURÉNAS, D.; JOURNET, L. Activity, delivery, and diversity of Type VI secretion effectors. **Molecular Microbiology**, v. 115, n. 3, p. 383-394, 7 dez. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.14648>.

KADMIRI, I.M.; MERNISSI, N.E.; AZAROUAL, S.E.; MEKHZOUM, M.E.M.; QAISS, A.E.K.; BOUHFID, R. Bioformulation of Microbial Fertilizer Based on Clay and Alginate Encapsulation. **Current Microbiology**, v. 78, n. 1, p. 86-94, 26 out. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-020-02262-2>.

KANDEL, S.; JOUBERT, P.; DOTY, S. Bacterial Endophyte Colonization and Distribution within Plants. **Microorganisms**, v. 5, n. 4, p. 77, 25 nov. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms5040077>.

KANEKO, T.; MINAMISAWA, K.; ISAWA, T.; NAKATSUKASA, H.; MITSUI, H.; KAWAHARADA, Y.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, A.; KAWASHIMA, K.; ONO, A. Complete Genomic Structure of the Cultivated Rice Endophyte *Azospirillum* sp. B510. **DNA Research**, v. 17, n. 1, p. 37-50, 4 jan. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dsp026>.

KHAN, N.; BANO, A.; ALI, S.; BABAR, M.A. Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. **Plant Growth Regulation**, v. 90, n. 2, p. 189-203, 16 jan. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10725-020-00571-x>.

KISTLER, L.; MAEZUMI, S.Y.; SOUZA, J.G. de; PRZELOMSKA, N.A.S.; COSTA, F.M.; SMITH, O.; LOISELLE, H.; RAMOS-MADRIGAL, J.; WALES, N.; RIBEIRO, E.R. Multiproxy evidence highlights a complex evolutionary legacy of maize in South America. **Science**, v. 362, n. 6420, p. 1309-1313, 14 dez. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aav0207>.

KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Growth Under Gnotobiotic Conditions. **Phytopathology**, v. 71, p. 642-644, 1981.

KOLB, W.; MARTIN, P. Response of Plant Roots to Inoculation with *Azospirillum brasilense* and to Application of Indole Acetic Acid. In: **Azospirillum III**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1985. p. 215-221. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-70791-9\\_20](https://doi.org/10.1007/978-3-642-70791-9_20)

KRALIK, P.; RICCHI, M. A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: definitions, parameters and everything. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 108, p. 1-9, 2 fev. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>.

KWAK, Y.; SHIN, J-H. First *Azospirillum* genome from aquatic environments: whole-genome sequence of *Azospirillum thiophilum* bv-s t , a novel diazotroph harboring a capacity of sulfur-chemolithotrophy from a sulfide spring. **Marine Genomics**, v. 25, p. 21-24, fev. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.margen.2015.11.001>.

LI, Z.; WANG, X-H.; SAURAV, P.S.; LI, C-X.; ZHAO, M.; XIN, S-R.; PARAJULEE, M.N.; CHEN, F-J. Impacts of Bt maize inoculated with rhizobacteria on development and food

utilization of *Mythimna separata*. **Journal of Applied Entomology**, v. 143, n. 10, p. 1105-1114, 26 ago. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/jen.12687>.

LIANG, J.; YU, K.; WANG, Y.; HUANG, X.; HUANG, W.; QIN, Z.; WANG, G.; SU, H.; CHEN, B.; WU, Z. Diazotroph Diversity Associated with Scleractinian Corals and its Relationships with Environmental Variables in the South China Sea. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 1-15, 17 jun. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2020.00615>.

LIBÓRIO, P.H.S.; BÁRBARO-TORNELI, I.M.; NOGUEIRA, M.A.; UNÊDA-TREVISOLI, S.H. Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and *Azospirillum brasilense* on the physiological quality of soybean seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 62, p. 2937-2950, 6 nov. 2020. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n6supl2p2937>.

LIU, L.; ZHANG, X.; XU, W.; LIU, X.; LI, Y.; WEI, J.; WANG, Z.; LU, X. Ammonia volatilization as the major nitrogen loss pathway in dryland agro-ecosystems. **Environmental Pollution**, v. 265, p. 114862, out. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114862>.

LIU, X.; ROUX, X.L.; SALLES, J.F. The legacy of microbial inoculants in agroecosystems and potential for tackling climate change challenges. **iScience**, v. 25, n. 3, p. 103821, mar. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2022.103821>.

LOPES, M.J.S.; DIAS-FILHO, M.B.; GURGEL, E.S.C. Successful Plant Growth-Promoting Microbes: inoculation methods and abiotic factors. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 1-13, 25 fev. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2021.606454>.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, Sebastián; MAZZONI, Valerio; PEDRAZZOLI, Federico; PERTOT, Ilaria; CAMPISANO, Andrea. A Phloem-Feeding Insect Transfers Bacterial Endophytic Communities between Grapevine Plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-17, 15 maio 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.00834>.

LU, X.; WANG, J.; WANG, Y.; WEN, W.; ZHANG, Y.; DU, J.; ZHAO, Y.; GUO, X. Genome-Wide Association Study of Maize Aboveground Dry Matter Accumulation at Seedling Stage. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 1-13, 13 jan. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2020.571236>.

LUO, S.; YIN, J.; PENG, Y.; XIE, J.; WU, H.; HE, D.; LI, X.; CHENG, G. Glutathione is Involved in Detoxification of Peroxide and Root Nodule Symbiosis of *Mesorhizobium huakuii*. **Current Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 1-10, 17 out. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-019-01784-8>.

MA, J.F. Plant Root Responses to Three Abundant Soil Minerals: silicon, aluminum and iron. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 4, p. 267-281, jul. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/07352680500196017>.

MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. Excretion of ammonium by *Azospirillum brasilense* mutants resistant to ethylenediamine. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 549-553, 1 jul. 1991. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m91-092>.

MAGALHÃES, C.; DURÃES, M. Fisiologia da Produção de Milho. Sete Lagoas: Embrapa, 2006. 10 p. (Circular Técnica 76). Disponível em: [https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/19620/1/Circ\\_76.pdf](https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPMS/19620/1/Circ_76.pdf). Acesso em: 11 jun. 2022.

MALINICH, E.A.; BAUER, C.E. The plant growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* is vertically transmitted in *Phaseolus vulgaris* (common bean). **Symbiosis**, v. 76, n. 2, p. 97-108, 13 fev. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13199-018-0539-2>.

MALLON, C.A.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Microbial Invasions: the process, patterns, and mechanisms. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 11, p. 719-729, nov. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.013>.

MANFREDINI, A.; MALUSÀ, E.; COSTA, C.; PALLOTTINO, F.; MOCALI, S.; PINZARI, F.; CANFORA, L. Current Methods, Common Practices, and Perspectives in Tracking and Monitoring Bioinoculants in Soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-22, 31 ago. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.698491>.

MARIANGELA, H.; MARCO, A.N.; RICARDO, S.A. Alternative methods of soybean inoculation to overcome adverse conditions at sowing. **African Journal of Agricultural Research**, v. 10, n. 23, p. 2329-2338, 4 jun. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5897/ajar2014.8687>.

MARTIN-DIDONET, C.C.G.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; KLEINA, M.; REGO, F.G.M.; RIGO, L.U.; YATES, M.G.; PEDROSA, F.O. Genome Structure of the Genus *Azospirillum*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 14, p. 4113-4116, 15 jul. 2000. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.182.14.4113-4116.2000>.

MARTINS, S.J.; MEDEIROS, F.H.V.; LAKSHMANAN, V.; BAIS, H.P. Impact of Seed Exudates on Growth and Biofilm Formation of *Bacillus amyloliquefaciens* ALB629 in Common Bean. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-9, 9 jan. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.02631>.

MASCIARELLI, O.; URBANI, L.; REINOSO, H.; LUNA, V. Alternative mechanism for the evaluation of indole-3-acetic acid (IAA) production by *Azospirillum brasilense* strains and its effects on the germination and growth of maize seedlings. **Journal of Microbiology**, v. 51, n. 5, p. 590-597, 14 set. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-013-3136-3>.

MATSUOKA, Y.; VIGOUROUX, Y.; GOODMAN, M.M.; G., J.S.; BUCKLER, E.; DOEBLEY, J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 9, p. 6080-6084, 30 abr. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.052125199>.

MAUCLINE, T.H.; KERRY, B.R.; HIRSCH, P.R. Quantification in Soil and the Rhizosphere of the Nematophagous Fungus *Verticillium chlamydosporium* by Competitive PCR and Comparison with Selective Plating. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1846-1853, abr. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.68.4.1846-1853.2002>.

MAWARDA, P.C.; ROUX, X.L.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. Deliberate introduction of invisible invaders: a critical appraisal of the impact of microbial inoculants on soil

microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 148, p. 107874, set. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107874>.

MCCRADY, M.H. The Numerical Interpretation of Fermentation-Tube Results. **Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 183-212, 1 jul. 1915. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/17.1.183>.

MEENA, R.S.; MEENA, V.S.; MEENA, S.K.; VERMA, J.P. The needs of healthy soils for a healthy world. **Journal of Cleaner Production**, v. 102, p. 560-561, set. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.04.045>.

MENDES, R.; KRUIJT, M.; BRUIJN, I.; DEKKERS, E.; VOORT, M.; SCHNEIDER, J.H.M.; PICENO, Y.M.; DESANTIS, T.Z.; ANDERSEN, G.L.; BAKKER, P.A.H.M. Deciphering the Rhizosphere Microbiome for Disease-Suppressive Bacteria. **Science**, v. 332, n. 6033, p. 1097-1100, 27 maio 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1203980>.

MINCHEV, Z.; KOSTENKO, O.; SOLER, R.; POZO, M.J. Microbial Consortia for Effective Biocontrol of Root and Foliar Diseases in Tomato. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 1-12, 5 nov. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2021.756368>.

MITTER, B.; PETRIC, A.; SHIN, M.W.; CHAIN, P.S.G.; HAUBERG-LOTTE, L.; REINHOLD-HUREK, B.; NOWAK, J.; SESSITSCH, A. Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-15, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2013.00120>.

MORAIS, T.P. de; BRITO, C.H. de; BRANDÃO, A.M.; REZENDE, W.S. Inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* in the seed furrow. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 2, p. 290-298, 2016. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/1806-6690.20160034>.

MOSQUITO, S.; BERTANI, I.; LICASTRO, D.; COMPANT, S.; MYERS, M.P.; HINAREJOS, E.; LEVY, A.; VENTURI, V. In Planta Colonization and Role of T6SS in Two Rice *Kosakonia* Endophytes. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 33, n. 2, p. 349-363, fev. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-09-19-0256-r>.

MOSTAJERAN, A.; AMOOAGHAIE, R.; EMTIAZI, G. The participation of the cell wall hydrolytic enzymes in the initial colonization of *Azospirillum brasilense* on wheat roots. **Plant and Soil**, v. 291, n. 1-2, p. 239-248, 20 jan. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-006-9189-x>.

MÜLLER, D.B.; VOGEL, C.; BAI, Y.; VORHOLT, J.A. The Plant Microbiota: systems-level insights and perspectives. **Annual Review of Genetics**, v. 50, n. 1, p. 211-234, 23 nov. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-034952>.

NAGHILI, H.; TAJIK, H.; MARDANI, K.; RAZAVI ROUHANI, S.M.; EHSANI, A.; ZARE, P. Validation of drop plate technique for bacterial enumeration by parametric and nonparametric tests. **Veterinary Research Forum : An International Quarterly Journal**, v. 4, n. 3, p. 179-83, 2013

NAHER, K.; MIWA, H.; OKAZAKI, S.; YASUDA, M. Effects of Different Sources of Nitrogen on Endophytic Colonization of Rice Plants by *Azospirillum* sp. B510. **Microbes and Environments**, v. 33, n. 3, p. 301-308, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1264/jsme2.me17186>.

NAOE, A.M.L.; PELUZIO, J.M.; CAMPOS, L.J. M.; NAOE, L.K.; SILVA, R.A. Co-inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean cultivars subjected to water déficit. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 24, n. 2, p. 89-94, fev. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v24n2p89-94>.

NGOM, B.; LIU, X. Techniques for Tracking Microbial Community Structure and Function in Natural Environment and Engineered Systems. **International Journal of Science and Research**, , v. 3, n. 4, p. 800-807, abr. 2014.

NIELSEN, K.M.; JOHNSEN, P.J.; BENSASSON, D.; DAFFONCHIO, D. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. **Environmental Biosafety Research**, v. 6, n. 1-2, p. 37-53, jan. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/ebr:2007031>.

NIELSEN, T.H.; NYBROE, O.; KOCH, B.; HANSEN, M.; SØRENSEN, J. Genes Involved in Cyclic Lipopeptide Production are Important for Seed and Straw Colonization by *Pseudomonas* sp. Strain DSS73. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4112-4116, jul. 2005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.71.7.4112-4116.2005>.

NUSS, E.T.; TANUMIHARDJO, S.A. Maize: a paramount staple crop in the context of global nutrition. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 417-436, 17 ago. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00117.x>.

NYSTRÖM, T. Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 17-23, 25 mar. 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03385.x>.

NYSTRÖM, T. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. **Archives Of Microbiology**, v. 176, n. 3, p. 159-164, 1 set. 2001. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s002030100314>.

O'NEAL, L.; VO, L.; ALEXANDRE, G. Specific Root Exudate Compounds Sensed by Dedicated Chemoreceptors Shape *Azospirillum brasilense* Chemotaxis in the Rhizosphere. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 86, n. 15, p. 1-19, 20 jul. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01026-20>.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 26, n. 12, p. 1591-1601, dez. 1994. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)90311-5](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(94)90311-5).

OLIVEIRA, A.L.M.; SANTOS, O.J.A.P.; MARCELINO, P.R.F.; MILANI, K.M.L.; ZULUAGA, M.Y.A.; ZUCARELI, C.; GONÇALVES, L.S.A. Maize Inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 Cells Enriched with Exopolysaccharides and Polyhydroxybutyrate Results in High Productivity under Low N Fertilizer Input. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-18, 26 set. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2017.01873>.

ONU. World population prospects 2019. Nova York: ONU, 2019. *E-book*. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12283219>

OREN, A.; GARRITY, G.M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 10, p. 1-7, 20 out. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.005056>.

OROZCO-MOSQUEDA, M.C.; ROCHA-GRANADOS, M.C.; GLICK, B.R.; SANTOYO, G. Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological Research*, v. 208, p. 25-31, mar. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.005>.

PANKIEVICZ, V.C.S.; AMARAL, F.P.; SANTOS, K.F.D.N.; AGTUCA, B.; XU, Y.; SCHUELLER, M.J.; ARISI, A.C.M.; STEFFENS, M.B.R.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Robust biological nitrogen fixation in a model grass–bacterial association. **The Plant Journal**, v. 81, n. 6, p. 907-919, mar. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/tpj.12777>.

PARDO-DÍAZ, S.; ROMERO-PERDOMO, F.; MENDOZA-LABRADOR, J.; DELGADILLO-DURAN, D.; CASTRO-RINCON, E.; SILVA, A.M.M.; ROJAS-TAPIAS, D.F.; CARDOSO, E.J.B.N.; ESTRADA-BONILLA, G.A. Endophytic PGPB Improves Plant Growth and Quality, and Modulates the Bacterial Community of an Intercropping System. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 5, p. 1-10, 1 out. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fsufs.2021.715270>.

PARRY, M.A. J.; HAWKESFORD, M.J. Food security: increasing yield and improving resource use efficiency. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, n. 4, p. 592-600, 22 set. 2010. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0029665110003836>.

PASCALE, A.; PROIETTI, S.; PANTELIDES, I.S.; STRINGLIS, I.A. Modulation of the Root Microbiome by Plant Molecules: the basis for targeted disease suppression and plant growth promotion. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1-23, 24 jan. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2019.01741>.

PEDRAZA, R.O.; MOTOK, J.; TORTORA, M.L.; SALAZAR, S.M.; DÍAZ-RICCI, J.C. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. **Plant and Soil**, v. 295, n. 1-2, p. 169-178, 10 maio 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-007-9273-x>.

PEDROSA, F.O.; OLIVEIRA, A.L.M.; GUIMARÃES, V.F.; ETTO, R.M.; SOUZA, E.M.; FURMAM, F.G.; GONÇALVES, D.R.P.; SANTOS, O.J.A.P.; GONÇALVES, L.S.A.; BATTISTUS, A.G. The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. **Plant and Soil**, v. 451, n. 1-2, p. 45-56, 18 jun. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>.

PELLEGRINO, E.; TURRINI, A.; GAMPER, H.A.; CAFÀ, G.; BONARI, E.; YOUNG, J. Peter W.; GIOVANNETTI, M. Establishment, persistence and effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungal inoculants in the field revealed using molecular genetic tracing and measurement of yield components. **New Phytologist**, v. 194, n. 3, p. 810-822, mar. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04090.x>.

PEREIRA, L.C.; PEREIRA, C.B.; CORREIA, L.V.; MATERA, T.C.; SANTOS, R.F.; CARVALHO, C.; OSIPI, E.A.F.; BRACCINI, A.L. Corn Responsiveness to *Azospirillum*:

accessing the effect of root exudates on the bacterial growth and its ability to fix nitrogen. **Plants**, v. 9, n. 7, p. 923, 21 jul. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/plants9070923>.

PEREZ, J.J.; FRANCOIS, N.J.; MARONICHE, G.A.; BORRAJO, M.P.; PEREYRA, M.A.; CREUS, C.M. A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria. **Carbohydrate Polymers**, v. 202, p. 409-417, dez. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.07.084>.

PINHEIRO, R.de O.; BODDEY, L.H.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; BODDEY, R.M. Adsorption and anchoring of *Azospirillum* strains to roots of wheat seedlings. **Plant and Soil**, v. 246, n. 2, p. 151-166, 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1023/a:1020645203084>.

PINSKI, A.; BETEKHTIN, A.; HUPERT-KOCUREK, K.; MUR, L.A.J.; HASTEROK, R. Defining the Genetic Basis of Plant–Endophytic Bacteria Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p. 1947, 20 abr. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20081947>.

PUENTE, M.L.; GUALPA, J.L.; LOPEZ, G.A.; MOLINA, R.M.; CARLETTI, S.M.; CASSÁN, F.D. The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. **Symbiosis**, v. 76, n. 1, p. 41-49, 12 dez. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13199-017-0536-x>.

PUENTE, M.L.; MARONICHE, G.A.; PANEPUCCI, M.; GARCÍA, J.; GARCÍA, J.; CRIADO, M.V.; MOLINA, R.; CASSÁN, F.D. Localization and survival of *Azospirillum brasilense* Az39 in soybean leaves. **Letters In Applied Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 626-633, 19 fev. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/lam.13444>.

PUENTE, M.L.; ZAWOZNIK, M.; SABANDO, M.L.; PEREZ, G.; GUALPA, J.L.; CARLETTI, S.M.; CASSÁN, F.D. Improvement of soybean grain nutritional quality under foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Az39. **Symbiosis**, v. 77, n. 1, p. 41-47, 4 jul. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13199-018-0568-x>.

QIAO, J.; YU, X.; LIANG, X.; LIU, Y.; BORRIS, R.; LIU, Y. Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1-12, 5 jun. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12866-017-1039-x>.

QU, Q.; ZHANG, Z.; PEIJNENBURG, W.J.G.M.; LIU, W.; LU, T.; HU, B.; CHEN, J.; CHEN, J.; LIN, Z.; QIAN, H. Rhizosphere Microbiome Assembly and Its Impact on Plant Growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 18, p. 5024-5038, 7 abr. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.0c00073>.

R CORE TEAM. R: The R Project for Statistical Computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2017.

RAMÍREZ-ORDORICA, A.; VALENCIA-CANTERO, E.; FLORES-CORTEZ, I.; CARRILLO-RAYAS, M.T.; ELIZARRARAZ-ANAYA, M.I.C.; MONTERO-VARGAS, J.; WINKLER, R.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. Metabolomic effects of the colonization of *Medicago truncatula* by the facultative endophyte *Arthrobacter agilis* UMCV2 in a foliar inoculation system. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 21 maio 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-65314-4>.

- RAMOS, H.J.O; RONCATO-MACCARI, L.D.B; SOUZA, E.M; SOARES-RAMOS, J.R.L; HUNGRIA, M.; PEDROSA, F.O. Monitoring *Azospirillum*-wheat interactions using the gfp and gusA genes constitutively expressed from a new broad-host range vector. **Journal of Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 243-252, ago. 2002. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(02\)00108-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(02)00108-6).
- RANERE, A.J.; PIPERNO, D.R.; HOLST, I.; DICKAU, R.; IRIARTE, J. The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 13, p. 5014-5018, 31 mar. 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0812590106>.
- REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 435-443, ago. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.04.004>.
- REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Isolation, Identification and Biochemical Characterization of *Azospirillum* spp. and Other Nitrogen-Fixing Bacteria. In: CASSÁN, F.; OKON, Y.; CREUS, C. **Handbook for *Azospirillum***. Cham: Springer International, 2015. p. 3-26.
- RILLING, J.I.; ACUÑA, J.J.; NANNIPIERI, P.; CASSÁN, F.; MARUYAMA, F.; JORQUERA, M.A. Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 130, p. 205-219, mar. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.012>.
- RISEH, R.S.; EBRAHIMI-ZARANDI, M.; VAZVANI, M.G.; SKORIK, Y.A. Reducing Drought Stress in Plants by Encapsulating Plant Growth-Promoting Bacteria with Polysaccharides. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 23, p. 12979, 30 nov. 2021. DISPONÍVEL EM: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312979>.
- RIVERA, D.; REVALE, S.; MOLINA, R.; GUALPA, J.; PUENTE, M.; MARONICHE, G.; PARIS, G.; BAKER, D.; CLAVIJO, B.; MCLAY, K. Complete Genome Sequence of the Model Rhizosphere Strain *Azospirillum brasilense* Az39, Successfully Applied in Agriculture. **Genome Announcements**, v. 2, n. 4, p. 1-2, 28 ago. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/genomea.00683-14>.
- RODRÍGUEZ CÁCERES, E.A. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 990-991, out. 1982. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.44.4.990-991.1982>.
- RODRÍGUEZ CÁCERES, E.A.; ANTA, G.G.; LÓPEZ, J.R.; CIOCCO, C. A.; BASURCO, J.C.P.; PARADA, J.L. Response of field-grown wheat to inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bacillus polymyxa* in the semiarid region of Argentina. **Arid Soil Research and Rehabilitation**, v. 10, n. 1, p. 13-20, jan. 1996. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/15324989609381416>.
- RÖMLING, U.; GALPERIN, M.Y. Discovery of the Second Messenger Cyclic di-GMP. **Methods in Molecular Biology**, p. 1-8, 2017. Springer New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7240-1_1).

RÖMLING, U.; GALPERIN, M.Y.; GOMELSKY, M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 1, p. 1-52, mar. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/mmbr.00043-12>.

RONDINA, A.B.L.; SANZOVO, A.W.S.; GUIMARÃES, G.S.; WENDLING, J.R.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* or treated with *A. brasilense* exudates. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 4, p. 537-549, 26 mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-020-01453-0>.

ROSSI, F.A.; MEDEOT, D.B.; LIAUDAT, J.P.; PISTORIO, M.; JOFRÉ, E. In *Azospirillum brasilense*, mutations in flmA or flmB genes affect polar flagellum assembly, surface polysaccharides, and attachment to maize roots. **Microbiological Research**, v. 190, p. 55-62, set. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2016.05.006>.

SALINERO-LANZAROTE, A.; PACHECO-MORENO, A.; DOMINGO-SERRANO, L.; DURÁN, D.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ALBAREDA, M.; PALACIOS, J.M.; REY, L. The Type VI secretion system of *Rhizobium etli* Mim1 has a positive effect in symbiosis. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 95, n. 5, p. 1-11, 12 abr. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/femsec/fiz054>.

SANT'ANNA, F.H.; ALMEIDA, L.G.; CECAGNO, R.; REOLON, L.; SIQUEIRA, F.M.; MACHADO, M.R.; VASCONCELOS, A.T.; SCHRANK, I.S. Genomic insights into the versatility of the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum amazonense*. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-14, 12 ago. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-409>.

SANTOS, A.R.S.; ETTO, R.M.; FURMAM, R.W.; FREITAS, D.L.; SANTOS, K.F.D.N.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; AYUB, R.A.; STEFFENS, M.A.R.; GALVÃO, C.W. Labeled *Azospirillum brasilense* wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 422-426, set. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.003>.

SANTOS, K.F.D.N.; MOURE, V.R.; HAUER, V.; SANTOS, A.R.S.; DONATTI, L.; GALVÃO, C.W.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M.; WASSEM, R.; STEFFENS, M.B.R. Wheat colonization by an *Azospirillum brasilense* ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, n. 1-2, p. 245-255, 28 dez. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-016-3140-6>.

SANTOS, M.S.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 45, p. 1-31, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.36783/18069657rbcs20200128>.

SANTOS, M.S.; RONDINA, A.B.L.; NOGUEIRA, M.A.; HUNGRIA, M. Compatibility of *Azospirillum brasilense* with Pesticides Used for Treatment of Maize Seeds. **International Journal of Microbiology**, v. 2020, p. 1-8, 10 jul. 2020. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2020/8833879>.

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M.C.; GLICK, B.R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, fev. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>.

SAVARY, S.; FICKE, A.; AUBERTOT, J-N.; HOLLIER, C. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. **Food Security**, v. 4, n. 4, p. 519-537, 15 jul. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>.

SCHILTZ, S.; GAILLARD, I.; PAWLICKI-JULLIAN, N.; THIOMBIANO, B.; MESNARD, F.; GONTIER, E. A review: what is the spermosphere and how can it be studied? **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 6, p. 1467-1481, 2 out. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12946>.

SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different *Azospirillum brasilense* strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**, v. 25, n. 1-3, p. 159-179, 1998.

SCHOEBITZ, M.; LÓPEZ, M.D.; ROLDÁN, A. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil-plant fertilization: a review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 33, n. 4, p. 751-765, 27 mar. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13593-013-0142-0>.

SEEFELDT, L.C.; HOFFMAN, B.M.; PETERS, J.W.; RAUGEI, S.; BERATAN, D.N.; ANTONY, E.; DEAN, D.R. Energy Transduction in Nitrogenase. **Accounts of Chemical Research**, v. 51, n. 9, p. 2179-2186, 10 ago. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.accounts.8b00112>.

SESSITSCH, A.; HARDOIM, P.; DÖRING, J.; WEILHARTER, A.; KRAUSE, A.; WOYKE, T.; MITTER, B.; HAUBERG-LOTTE, L.; FRIEDRICH, F.; RAHALKAR, M. Functional Characteristics of an Endophyte Community Colonizing Rice Roots as Revealed by Metagenomic Analysis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 1, p. 28-36, jan. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-08-11-0204>.

SHALEV, O.; KARASOV, T.L.; LUNDBERG, D.S.; ASHKENAZY, H.; AYUTTHAYA, P.P.; WEIGEL, D. Commensal *Pseudomonas* strains facilitate protective response against pathogens in the host plant. **Nature Ecology & Evolution**, v. 6, n. 4, p. 383-396, 24 fev. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41559-022-01673-7>.

SHARMA, S.B.; SAYYED, R.Z.; TRIVEDI, M.H.; GOBI, T. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **Springerplus**, v. 2, n. 1, p. 1-14, 31 out. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>.

SHIFERAW, B.; PRASANNA, B.M.; HELLIN, J.; BÄNZIGER, M. Crops that feed the world 6. Past successes and future challenges to the role played by maize in global food security. **Food Security**, v. 3, n. 3, p. 307-327, 23 ago. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s12571-011-0140-5>.

SOARES, I.C.; PACHECO, R.S.; SILVA, C.G.N.; SANTOS, R.S.; BALDANI, J.I.; URQUIAGA, S.; VIDAL, M.S.; SIMOES-ARAUJO, J.L. Real-time PCR method to quantify Sp245 strain of *Azospirillum baldaniorum* on Brachiaria grasses under field conditions. **Plant and Soil**, v. 468, n. 1-2, p. 525-538, 6 set. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-021-05137-y>.

- SONG, C.; LIU, Z.; XIE, Q.; WANG, H.; HUANG, Y.; RUAN, Y.; CHEN, D. Characterization of a novel thermo-stable lipase from endophyte *Pseudomonas putida* in *Pistacia chinensis* Bunge. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 524-532, set. 2017. Pleiades Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1134/s0003683817050143>.
- SOUSA, S.M.; OLIVEIRA, C.A.; ANDRADE, D.L.; CARVALHO, C.G.; RIBEIRO, V.P.; PASTINA, M.M.; MARRIEL, I.E.; LANA, U.G.P.; GOMES, E.A. Tropical *Bacillus* Strains Inoculation Enhances Maize Root Surface Area, Dry Weight, Nutrient Uptake and Grain Yield. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 40, n. 2, p. 867-877, 29 maio 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-020-10146-9>.
- STETS, M.I. **Monitoramento de *Azospirillum brasilense* e estudo da diversidade bacteriana associada a raízes de trigo (*Triticum aestivum*)**. 2013. 107 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciências- Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- STETS, M.I.; ALQUERES, S.M.C.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; CRUZ, L.M. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700-6709, out. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01351-15>.
- STUBBENDIECK, R.M.; VARGAS-BAUTISTA, C.; STRAIGHT, P.D. Bacterial Communities: interactions to scale. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-19, 8 ago. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01234>.
- SUZUKI, S.; AONO, T.; LEE, K-B.; SUZUKI, T.; LIU, C-T.; MIWA, H.; WAKAO, S.; IKI, T.; OYAIZU, H. Rhizobial Factors Required for Stem Nodule Maturation and Maintenance in *Sesbania rostrata*-*Azorhizobium caulinodans* ORS571 Symbiosis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6650-6659, 15 out. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01514-07>.
- SVEC, D.; TICHOPAD, A.; NOVOSADOVA, V.; PFAFFL, M.W.; KUBISTA, M. How good is a PCR efficiency estimate: recommendations for precise and robust qpcr efficiency assessments. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 3, p. 9-16, mar. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>.
- SZOPA, D.; MIELCZAREK, M.; SKRZYPCZAK, D.; IZYDORCZYK, G.; MIKULA, K.; CHOJNACKA, K.; WITEK-KROWIAK, A. Encapsulation efficiency and survival of plant growth-promoting microorganisms in an alginate-based matrix: a systematic review and protocol for a practical approach. **Industrial Crops and Products**, v. 181, p. 114846, jul. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.114846>.
- TADRA-SFEIR, M.Z.; FAORO, H.; CAMILIOS-NETO, D.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.; BALSANELLI, E.; WEISS, V.; BAURA, V.A.; WASSEM, R.; CRUZ, L.M.; PEDROSA, F.O. Genome wide transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 grown in the presence of naringenin. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-8, 21 maio 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00491>.
- TAKAHASHI, W.Y.; GALVÃO, C.W.; URREA-VALENCIA, S.; GONÇALVES, D.R.P.; HYEDA, D.; CAIRES, E.F.; ETTO, R.M. Impact of seed-applied fungicide and insecticide on

*Azospirillum brasilense* survival and wheat growth-promoting ability. **Letters in Applied Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 604-612, 17 jan. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/lam.13645>.

TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1 ago. 1978. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/m78-160>.

TARTANUS, M.; FURMANCZYK, E.M.; CANFORA, L.; PINZARI, F.; TKACZUK, C.; MAJCHROWSKA-SAFARYAN, A.; MALUSÁ, E. Biocontrol of *Melontha* spp. Grubs in Organic Strawberry Plantations by Entomopathogenic Fungi as Affected by Environmental and Metabolic Factors and the Interaction with Soil Microbial Biodiversity. **Insects**, v. 12, n.2, p. 127, 2 fev. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/insects12020127>.

TATÉ, R.; CERMOLA, M.; RICCIO, A.; DIEZ-ROUX, G.; PATRIARCA, E.J. Glutathione Is Required by *Rhizobium etli* for Glutamine Utilization and Symbiotic Effectiveness. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 25, n. 3, p. 331-340, mar. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/mpmi-06-11-0163>.

TEIXEIRA, E.I.; GEORGE, M.; HERREMAN, T.; BROWN, H.; FLETCHER, A.; CHAKWIZIRA, E.; RUITER, J.; MALEY, S.; NOBLE, A. The impact of water and nitrogen limitation on maize biomass and resource-use efficiencies for radiation, water and nitrogen. **Field Crops Research**, v. 168, p. 109-118, nov. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcr.2014.08.002>.

THIJS, S.; SILLEN, W.; RINEAU, F.; WEYENS, N.; VANGRONSVELD, J. Towards an Enhanced Understanding of Plant–Microbiome Interactions to Improve Phytoremediation: engineering the metaorganism. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-15, 16 mar. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00341>.

THOMPSON, L.R.; SANDERS, J.G.; MCDONALD, D.; AMIR, A.; LADAU, J.; LOCEY, K.J.; PRILL, R.J.; TRIPATHI, A.; GIBBONS, S.M.; ACKERMANN, G. A communal catalogue reveals Earth’s multiscale microbial diversity. **Nature**, v. 551, n. 7681, p. 457-463, 1 nov. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature24621>.

TILMAN, D.; BALZER, C.; HILL, J.; BEFORT, B.L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20260-20264, 21 nov. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1116437108>.

TILMAN, D.; CASSMAN, K.G.; MATSON, P.A.; NAYLOR, R.; POLASKY, S. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671-677, ago. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01014>.

TORRES, M.A.; JONES, J.D.G.; DANGL, J.L. Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 373-378, 1 jun. 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.079467>.

TRIVEDI, P.; LEACH, J.E.; TRINGE, S.G.; SA, T.; SINGH, B.K. Plant–microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature Reviews Microbiology**, v.

18, n. 11, p. 607-621, 12 ago. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>.

TUDI, M.; RUAN, H.D.; WANG, L.; LYU, J.; SADLER, R.; CONNELL, D.; CHU, C.; PHUNG, D. T. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 27 jan. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph18031112>.

URREA-VALENCIA, S.; ETTO, R.M.; TAKAHASHI, W.Y.; CAIRES, E.F.; BINI, A.R.; AYUB, R.A.; STETS, M.I.; CRUZ, L.M.; GALVÃO, C.W. Detection of *Azospirillum brasilense* by qPCR throughout a maize field trial. **Applied Soil Ecology**, v. 160, p. 103849, abr. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103849>.

VAN DEYNZE, A.; ZAMORA, P.; DELAUX, P-M.; HEITMANN, C.; JAYARAMAN, D.; RAJASEKAR, S.; GRAHAM, D.; MAEDA, J.; GIBSON, D.; SCHWARTZ, K.D. Nitrogen fixation in a landrace of maize is supported by a mucilage-associated diazotrophic microbiota. **PLOS Biology**, v. 16, n. 8, p. 1-21, 7 ago. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.2006352>.

VAN ELSAS, J.D.; CHIURAZZI, M.; MALLON, C.A.; ELHOTTOVĀ, D.; KRIĽTŮFEK, V.; SALLES, J.F. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 4, p. 1159-1164, 9 jan. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1109326109>.

VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, v. 44, n. 5, p. 619-626, abr. 2008. Future Science Ltd. <http://10.2144/000112776>.

VAN HEERWAARDEN, J.; DOEBLEY, J.; BRIGGS, W.H.; GLAUBITZ, J.C.; GOODMAN, M.M.; GONZALEZ, J.J.S.; ROSS-IBARRA, J. Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 3, p. 1088-1092, 28 dez. 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1013011108>.

VAN KESSEL, M.A.H.J.; SPETH, D.R.; ALBERTSEN, M.; NIELSEN, P.H.; CAMP, H.J.M.O.D.; KARTAL, B.; JETTEN, M.S.M.; LÜCKER, S. Complete nitrification by a single microorganism. **Nature**, v. 528, n. 7583, p. 555-559, 26 nov. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature16459>.

VAUGHAN, M.M.; CHRISTENSEN, S.; SCHMELZ, E.A.; HUFFAKER, A.; MCAUSLANE, H.J.; ALBORN, H.T.; ROMERO, M.; ALLEN, L.H.; TEAL, P.E.A. Accumulation of terpenoid phytoalexins in maize roots is associated with drought tolerance. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 11, p. 2195-2207, 23 jan. 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/pce.12482>.

VEJAN, Pravin; KHADIRAN, Tumirah; ABDULLAH, Rosazlin; ISMAIL, Salmah; DADRASNIA, Arezoo. Encapsulation of plant growth promoting Rhizobacteria—prospects and potential in agricultural sector: a review. **Journal of Plant Nutrition**, v. 42, n. 19, p. 2600-2623, 30 ago. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/01904167.2019.1659330>.

VELMOUROUGANE, K.; PRASANNA, R.; SINGH, S.; CHAWLA, G.; KUMAR, A.; SAXENA, A.K. Modulating rhizosphere colonisation, plant growth, soil nutrient availability

and plant defense enzyme activity through *Trichoderma viride*-*Azotobacter chroococcum* biofilm inoculation in chickpea. **Plant and Soil**, v. 421, n. 1-2, p. 157-174, 9 out. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-017-3445-0>.

VIGOUROUX, Y.; GLAUBITZ, J.C.; MATSUOKA, Y.; GOODMAN, M.M.; GONZALES, J.S.; DOEBLEY, J. Population structure and genetic diversity of New World maize races assessed by DNA microsatellites. **American Journal of Botany**, v. 95, n. 10, p. 1240-1253, 25 set. 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3732/ajb.0800097>.

WALKER, T.S.; BAIS, H.P.; GROTEWOLD, E.; VIVANCO, J.M. Root Exudation and Rhizosphere Biology. **Plant Physiology**, v. 132, n. 1, p. 44-51, 1 maio 2003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.102.019661>.

WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. Bacterial Iron Sources: from siderophores to hemophores. **Annual Review of Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 611-647, 1 out. 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123811>.

WANG, N.; LI, H.; WANG, B.; DING, J.; LIU, Y.; WEI, Y.; LI, J.; DING, G-C. Taxonomic and Functional Diversity of Rhizosphere Microbiome Recruited From Compost Synergistically Determined by Plant Species and Compost. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 1-12, 13 jan. 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2021.798476>.

WANG, Y.; JANZ, B.; ENGEDAL, T.; NEERGAARD, A. Effect of irrigation regimes and nitrogen rates on water use efficiency and nitrogen uptake in maize. **Agricultural Water Management**, v. 179, p. 271-276, jan. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.agwat.2016.06.007>.

WATTAM, A.R. *et al.* (2018). Assembly, Annotation, and Comparative Genomics in PATRIC, the All Bacterial Bioinformatics Resource Center. In: SETUBAL, J., STOYE, J., STADLER, P. (eds) Comparative Genomics. **Methods in Molecular Biology**, v. 1704. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7463-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7463-4_4)

WATTAM, A.R.; ABRAHAM, D.; DALAY, O.; DISZ, T.L.; DRISCOLL, T.; GABBARD, J.L.; GILLESPIE, J.J.; GOUGH, R.; HIX, D.; KENYON, R. PATRIC, the bacterial bioinformatics database and analysis resource. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 581-591, 12 nov. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1099>.

WESTBY, C.A.; CUTSHALL, D.S.; VIGIL, G.V. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. **Journal of Bacteriology**, v. 156, n. 3, p. 1369-1372, dez. 1983. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/jb.156.3.1369-1372.1983>.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; BORZIAK, K.; KHALSA-MOYERS, G.; ALEXANDRE, G.; SUKHARNIKOV, L.O.; WUICHET, K.; HURST, G.B.; MCDONALD, W.H.; ROBERTSON, J.S.; BARBE, V. *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. **PLOS Genetics**, v. 7, n. 12, p. 1-13, 22 dez. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002430>.

WISNIEWSKI-DYÉ, F.; LOZANO, L.; ACOSTA-CRUZ, E.; BORLAND, S.; DROGUE, B.; PRIGENT-COMBARET, C.; ROUY, Z.; BARBE, V.; HERRERA, A.M.; GONZÁLEZ, V. Genome Sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and Comparative Analyses of *Azospirillum* Core and Accessory Genomes provide Insight into Niche Adaptation. **Genes**, v. 3, n. 4, p. 576-602, 28 set. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/genes3040576>.

WOJTASZEK, P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. **Biochemical Journal**, v. 322, n. 3, p. 681-692, 15 mar. 1997. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1042/bj3220681>.

XIONG, Chao; SINGH, Brajesh K.; HE, Ji-Zheng; HAN, Yan-Lai; LI, Pei-Pei; WAN, Li-Hua; MENG, Guo-Zhong; LIU, Si-Yi; WANG, Jun-Tao; WU, Chuan-Fa. Plant developmental stage drives the differentiation in ecological role of the maize microbiome. **Microbiome**, v. 9, n. 1, p. 1-15, 13 ago. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-021-01118-6>.

YANG, L; MSEHLI, S.E.; BENYAMINA, S.; LAMBERT, A.; HOPKINS, J.; CAZARETH, J.; PIERRE, O.; HÉROUART, D.; ACHI-SMITI, S.; BONCOMPAGNI, E. Glutathione Deficiency in *Sinorhizobium meliloti* Does Not Impair Bacteroid Differentiation But Induces Early Senescence in the Interaction With *Medicago truncatula*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1-11, 3 mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2020.00137>.

YE, J.; COULOURIS, G.; ZARETSKAYA, I.; CUTCUTACHE, I.; ROZEN, S.; MADDEN, T.L. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 1-11, 18 jun. 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

ZAHOOR, A.; OTTEN, A.; WENDISCH, V.F. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for glycolate production. **Journal of Biotechnology**, v. 192, p. 366-375, dez. 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.12.020>.

ZENTILIN, L.; GIACCA, M. Competitive PCR for precise nucleic acid quantification. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2092-2104, 23 ago. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.299>.

ZHALNINA, K.; LOUIE, K.B.; HAO, Z.; MANSOORI, N.; ROCHA, U.N.; SHI, S.; CHO, H.; KARAOZ, U.; LOQUÉ, D.; BOWEN, B.P. Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. **Nature Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 470-480, 19 mar. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-018-0129-3>.

ZHAO, Q.; SHEN, Q.; RAN, W.; XIAO, T.; XU, D.; XU, Y. Inoculation of soil by *Bacillus subtilis* Y-IVI improves plant growth and colonization of the rhizosphere and interior tissues of muskmelon (*Cucumis melo* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 47, n. 5, p. 507-514, 1 abr. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00374-011-0558-0>.

ZHAO, Z.; MING, H.; DING, C.; JI, W.; CHENG, L.; NIU, M.; ZHANG, Y.; ZHANG, L.; MENG, X.; NIE, G. *Azospirillum thermophilum* sp. nov., isolated from a hot spring. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 550-554, 1 jan. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003788>.

ZHU, H.Z.; ZHANG, Z.F.; ZHOU, N.; JIANG, C.Y.; WANG, B.J.; CAI, L.; WANG, H.M.; LIU, S.J. Bacteria and Metabolic Potential in Karst Caves Revealed by Intensive Bacterial Cultivation and Genome Assembly. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 6, p. 1-17, 26 fev. 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02440-20>.