Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Modulação da comunidade bacteriana associada ao milho (*Zea mays* L.) através da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas

Rafael Martins Aniceto

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2016

Rafael Martins Aniceto
Bacharel em Biotecnologia

Modulação da comunidade bacteriana associada ao milho (*Zea mays* L.) através da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas

Orientador:
Profa. Dra. **MARIA CAROLINA QUECINE**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Genética e Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Aniceto, Rafael Martins

Modulação da comunidade bacteriana associada ao milho (*Zea mays* L.) através da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas / Rafael Martins Aniceto. - - Piracicaba, 2016.

62 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. *Azospirillum* 2. *Bacillus* 3. *Burkholderia* 4. *Ion Torrent* 5. Promoção de crescimento 6. qPCR I. Título

Aos meus queridos pais, José Luiz e Aparecida de Fátima, grandes responsáveis pela minha formação, que sempre me acompanham, acreditam e incentivam em minhas escolhas

Dedico

Aos meus queridos irmãos, Fabrício e Ferrucio, e aos meus amigos-irmãos, João Henrique e Rômulo, pelo apoio e companheirismo nos melhores e piores momentos

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos grandes homens e mulheres que pavimentaram o caminho científico que hoje percorremos.

Aos meus pais, José Luiz e Aparecida de Fátima, pelo exemplo de vida e de caráter.

Aos meus irmãos, Fabrício e Ferrucio, e aos meus amigos-irmãos, João Henrique e Rômulo, pela alegria nos dias bons e pelo companheirismo nos ruins.

À minha querida orientadora Profª Maria Carolina Quecine Verdi por ter estendido a mão e me ajudado no pior momento desta jornada, pelo incentivo e confiança desde o início. Agradeço imensamente.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo" pelo auxílio na execução dos experimentos, pelas conversas científicas durante o café, e, acima de tudo, pela amizade e companheirismo.

Ao prof. Roberto Fritsche-Neto e seus orientados, ao prof. José Baldin Pinheiro, e aos funcionários da área experimental do departamento, pela disponibilização de estruturas e auxílio no planejamento e execução dos experimentos.

À ESALQ e aos docentes e funcionários do Departamento de Genética, pela estrutura e contribuição nesta etapa de minha formação.

Ao Dr. Rodrigo Taketani, a toda equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente e ao Msc. Pedro Avelino de Andrade pelo auxílio com o sequenciamento e análise de dados.

À minha família, Anicetos e Martins, pela união e por me ensinarem o sentimento de pertencer a um local, apesar da distância e dos longos intervalos de ausência.

À República Zona Rural – Araras/SP, e a todos os que pertencem a essa família, (ex)moradores e agregados, por terem me permitido ser parte dela.

Aos amigos da V Turma de Biotecnologia, em especial ao Reinaldo e à Daniele, pela amizade e pelas conversas filosóficas que duravam o dia todo.

Ao CNPq e CAPES pela apoio financeiro, indispensável para a minha manutenção durante esta etapa.

E a todos que de maneira direta ou indireta tenham contribuído durante esta minha jornada.

"Ando devagar, porque já tive pressa
E levo esse sorriso, porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco sei,
Ou nada sei

Penso que cumprir a vida seja simplesmente,
Compreender a marcha, e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro levando a boiada
Eu vou tocando os dias, pela longa estrada, eu vou
Estrada eu sou

Todo mundo ama um dia, todo mundo chora
Um dia a gente chega e no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz,
E ser feliz

Conhecer as manhas e as manhãs
O sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir"

Almir Sater e Renato Teixeira

SUMÁRIO

RESUMO 8
ABSTRACT 9
LISTA DE FIGURAS 10
LISTA DE TABELAS 12
1. INTRODUÇÃO 13
2. REFERENCIAL TEÓRICO 15
2.1. Importância da cultura do milho 15
2.2. O uso de fertilizantes químicos e seu impacto ambiental 16
2.3. Microbioma de plantas 19
2.4. Estudo da estrutura da comunidade bacteriana 19
2.5. Bactérias promotoras de crescimento em plantas 20
2.5.1. BPCP como biofertilizantes 20
2.5.2. BPCP como fitoestimulantes 22
2.5.3. BPCP como biocontrole 23
2.6. Gênero *Burkholderia* 24
2.7 Gênero *Bacillus* 24
2.8. Gênero *Azospirillum* 25
3. MATERIAL E MÉTODOS 27
3.1. Material biológico e condições de cultivo 27
3.2. Ensaio de antibiose 27
3.3. Bacterização das sementes 28
3.4. Delineamento experimental 28
3.5. Avaliação da promoção de crescimento 29
3.6. Estudo da microbiota associada ao milho 29
3.6.1. Extração de DNA 29
3.6.2. Quantificação do gene 16S rRNA de bactérias 29
3.6.3. Identificação da comunidade microbiana através do sequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA 30
3.6.4. Análise dos dados de sequenciamento 31
4. RESULTADOS 33
4.1. Teste de antibiose 33
4.2. Análise da promoção de crescimento 33
4.3. Efeito da inoculação na comunidade bacteriana associada ao milho 35
4.4. Análise taxonômica dos grupos de bactéria 36
4.4.1. Comparação entre os diferentes tecidos vegetais 36
4.4.2. Impacto da inoculação de BPCP na estrutura da comunidade microbiana associada à raiz 38
4.4.3. Impacto da inoculação de BPCP na estrutura da comunidade microbiana associada à folha 40
5. DISCUSSÃO 43
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 49

REFERÊNCIAS 51

RESUMO

Modulação da comunidade bacteriana associada ao milho (*Zea mays* L.) através da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas

O uso de fertilizantes minerais é de grande importância para que a cultura atinja o seu potencial produtivo e torne a atividade de produção viável economicamente, no entanto o uso excessivo é danoso ao meio ambiente, trazendo riscos à saúde humana e à biodiversidade local. A utilização de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) tem se mostrado uma alternativa promissora e sustentável, visando melhorar a produtividade e reduzir o uso de fertilizantes. Essas bactérias colonizam a rizosfera e tecidos internos da planta e são capazes de estimular o desenvolvimento e sanidade de sua hospedeira através de mecanismos como disponibilização de nutrientes, produção de fitohormônios e controle de patógenos. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da inoculação de três linhagens de BPCP em milho e o impacto causado na comunidade bacteriana associada à cultura. As linhagens utilizadas foram *Burkholderia ambifaria* RZ2MS16, *Bacillus* sp. RZ2MS9, ambas isoladas da rizosfera de guaranazeiro, e *Azospirillum brasilense* Ab-v5, um inoculante comercial. Primeiramente, foi realizado um ensaio de antibiose entre RZ2MS9 e Ab-v5, constatando não haver inibição. Após, um experimento de promoção de crescimento em condições de campo, foi realizado, com plantas de milho inoculadas com: *(i)* RZ2MS16; *(ii)* RZ2MS16 e Ab-v5; *(iii)* Ab-v5; *(iv)* RZ2MS9; *(v)* RZ2MS9 e Ab-v5; e *(vi)* tratamento controle. As sementes foram inoculadas e, 60 dias após o plantio, a altura da planta, altura até a inserção da espiga e o diâmetro do colmo foram medidos. A inoculação com Ab-v5 e a coinoculação de RZ2MS9 com Ab-v5 promoveram o incremento de 3% em altura da planta, além disso, esse consórcio promoveu incremento de 9% no diâmetro do colmo, todos comparados ao tratamento controle. Usando o DNA total da folha e raíz do milho, o fragmento 16S rRNA bacteriano foi sequenciado, através da plataforma Ion Torrent, para avaliar o efeito da inoculação na comunidade bacteriana associada à ambos os tecidos. A inoculação foi capaz de modular a comunidade bacteriana associada à folha, com a análise de coordenadas principais (PCoA) explicando 39,51% da variação. Não foi observada modulação na comunidade bacteriana associada à raiz. Foi observada diferença na estrutura da comunidade bacteriana quando ambos os nichos foram comparados, independente de inoculação, com a PCoA explicando 80,97% dessa variação. Assim observa-se que estudos dessa natureza são de grande importância para o melhor entendimento da interação entre as BPCP e a comunidade bacteirana associada à planta hospedeira, e dos mecanismos que levam ao desenvolvimento da cultura.

Palavras-chave: *Azospirillum; Bacillus; Burkholderia; Ion Torrent;* Promoção de crescimento; qPCR

ABSTRACT

Maize (*Zea mays* L.) associated bacterial community modulation through the inoculation of plant growth promoting bacteria

The use of mineral fertilizers is of great importance to the crop reaches its potential yield and become the production activity economically feasible, however, its excessive use is harmful to the environment, and brings risk to human health and local biodiversity. The use of plant growth-promoting bacteria (PGPB) has been shown as a promising and sustainable alternative, aiming to improve productivity and reduce fertilizer use. These bacteria colonize the rhizosphere and plant internal tissues and are able to stimulate their host development and health through mechanisms such as nutrient availability, phytohormone production and pathogen control. This study aimed to evaluate the inoculation effect of three PGPB strains in maize and the impact on associated bacterial community. The strains inoculated were *Burkholderia ambifaria* RZ2MS16, *Bacillus* sp. RZ2MS9, both isolated from guarana rhizosphere, and *Azospirillum brasilense* Ab-v5, a commercial inoculant. First, an anthibiosis assay was conducted between RZ2MS9 and Ab-v5 strains, showing no inhibition. Then, a growth-promotion assay was performed under field conditions, with maize plants inoculated with: *(i)* RZ2MS16; *(ii)* RZ2MS16 and Ab-v5; *(iii)* Ab-v5; *(iv)* RZ2MS9; *(v)* RZ2MS9 and Ab-v5; and *(vi)* control. The seeds were inoculated and, 60 days after sowing, the plant height, height to the cob insertion and stem diameter were measured. The inoculation with Ab-v5 and the co-inoculation with RZ2MS9 plus Ab-v5 increased the plant height in 3%, furthermore, the co-inoculation increased stem diameter in 9%, all compared to control. Using total DNA of maize's leaf and root, bacterial 16S rRNA fragment was sequenced by Ion Torrent platform, to evaluate the effect of inoculation in associated bacterial community of both tissues. The inoculation was able to modulate the leaf bacterial community, with principal coordinates analysis (PCoA) explaining 39.51% of variation. It was not found modulation on root's bacterial community. Difference in the bacterial community structure was observed when both niches were compared, regardless inoculation, with PCoA explaining 80.97% of this variation. Therefore, it is noted that studies of this nature are of great importance for a better understanding of the interaction between PGPB and bacterial community associated to the host plant and mechanisms leading to crop development.

Keywords: *Azospirillum; Bacillus; Burkholderia; Ion Torrent;* Plant growth-promotion; qPCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição das parcelas no campo experimento de plantas de milho inoculadas com as seguintes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. Cada parcela consistiu de 20 plantas, com espaço de 80 cm entre as parcelas dentro de cada bloco. Entre os blocos houve um espaçamento de um metro. 28

Figura 2. Gel de PCR utilizando os primers 799F e 1492R. 1- marcador molecular Ladder 1 Kb (0,2 $\mu g.\mu L^{-1}$) (FERMENTAS); de 2 a 7 – DNA extraído de folha dos tratamentos *i*, *ii*, *iii*, *iv*, *v* e *vi*, respectivamente; de 8 a 13 - DNA extraído de raiz dos tratamentos *i*, *ii*, *iii*, *iv*, *v* e *vi*, respectivamente; 14 – DNA de *E. coli*; 15 – amostra em branco. A seta indica a banda correspondente ao fragmento do 16S rRNA bacteriano, de aproximadamente 735 pb, que foi excisada para uso em sequenciamento. 31

Figura 3. Teste de antibiose entre as linhagens RZ2MS9 e Ab-v5. Em (A) a linhagem RZ2MS9 inoculada sobre o meio contendo Ab-v5 em suspensão, onde foi possível observar o crescimento de ambas, portanto não havendo inibição. Os controles negativos são mostrados em: (B) RZ2MS9 aplicada em meio sem bactéria e (C) meio com Ab-v5 em suspensão. 33

Figura 4. Efeito da inoculação bacteriana na promoção de crescimento de milho. As bactérias inoculadas foram: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. Os caracteres avaliados foram altura da planta (A), altura até a inserção da espiga (B), e diâmetro do colmo (C). Os valores indicam a média de cinco parcelas, e a barra o erro padrão entre elas. Médias com letras diferentes diferem segundo o teste de Duncan ($p<0,05$). 34

Figura 5. Densidade da comunidade bacteriana associada à folha e à raiz de plantas de milho inoculadas com diferentes linhagens de bactérias promotoras de crescimento: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. Os valores indicam a média, em Log_{10}, de cinco repetições biológicas e duas repetições técnicas, e as barras indicam o erro padrão entre as repetições. Médias com letras diferentes diferem segundo o teste de Tukey ($p<0,05$). 35

Figura 6. Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfil de UTOs para os dois nichos analisados: folha e raiz, gerada pelo *software* QIIME. Observa-se variação da distribuição das UTOs, com os eixos (coordenadas principais) explicando 80,97%. A análise de PERMANOVA foi significativa, com $p = 0,001$. 37

Figura 7. Perfil de abundância relativa de classes bacterianas em tecidos de folha e raiz de milho. O gráfico foi construído no *software* Microsoft Excel® a partir da abundância de cada classe, obtida através do *software* QIIME a partir de dados de UTO normalizados. Classes com abundância menor que 0,15%, considerando os dois nichos, foram agrupadas. 38

Figura 8. Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfil de UTOs na raiz, mediante a inoculação de diferentes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. A PCoA foi gerada pelo *software* QIIME. Não foi observada variação significativa da distribuição das UTOs, com análise de PERMANOVA de $p = 0,545$. 39

Figura 9. Perfil da abundância relativa de classes bacterianas associadas à raiz, mediante a inoculação de diferentes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. O gráfico foi construído no *software* Microsoft Excel® a partir da abundância de cada classe, obtida através do *software* QIIME a partir de dados de UTO normalizados. Classes com abundância menor que 0,25%, considerando todos os tratamentos, foram agrupadas. 39

Figura 10 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfil de UTOs na folha, mediante a inoculação de diferentes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. A PCoA foi gerada pelo *software* QIIME. Observa-se variação da distribuição das UTOs, com os eixos (coordenadas principais) explicando 39,51%. A análise de PERMANOVA foi significativa, com $p = 0,025$. 40

Figura 11. Perfil da abundância relativa de classes bacterianas associadas à folha, mediante a inoculação de diferentes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. O gráfico foi construído no *software* Microsoft Excel® a partir da abundância de cada classe, obtida através do *software* QIIME a partir de dados de UTO normalizados. Classes com abundância menor que 0,20%, considerando todos os tratamentos, foram agrupadas. 41

Figura 12. Perfil da abundância relativa de famílias bacterianas associadas à folha, mediante a inoculação de diferentes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. O gráfico foi construído no *software* Microsoft Excel® a partir da abundância de cada classe, obtida através do *software* QIIME a partir de dados de UTO normalizados. Famílias com abundância menor que 0,15%, considerando todos os tratamentos, foram agrupadas. 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Temperatura média, umidade relativa média e índice de precipitação no município de Piracicaba entre os dias 09 de dezembro de 2015 e 3 de fevereiro de 2016 (ESALQ, 2016).....29

Tabela 2. Densidade da comunidade microbiana, obtida através de qPCR, estimativa de riqueza de UTO e índice de diversidade, obtidos através da análise de sequências, considerando raiz e folha de milho, independente de inoculação. Médias com letras diferentes diferem segundo o teste de Tukey ($p<0,05$). 35

Tabela 3. Estimativa de riqueza de UTO e índice de diversidade de amostras de folha e raiz de plantas de milho inoculadas com as linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5. Estes índices foram calculados a partir da análise de sequências geradas pela plataforma *Ion Torrent* no *software* QIIME. 36

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é o terceiro cereal em importância no mundo e seu uso está relacionado à alimentação humana de maneira direta, através do consumo do grão *in natura* ou industrialmente processado, e indireta, por ser um dos principais ingredientes utilizados em rações para animais, além de ser usado em processos industriais (INDIA, 2010; PAES, 2006). A cultura é amplamente produzida no mundo (LEFF; RAMANKUTTY; FOLEY, 2004), e os maiores produtores são os Estados Unidos, a China e o Brasil (FAOSTAT, 2016). No Brasil o milho é produzido principalmente na região Centro-Sul, sendo Mato Grosso, Paraná e Mato Grosso do Sul os principais estados produtores (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016).

Durante o último século o mundo tem passado por uma situação de aumento na produção e produtividade das culturas de modo a atender a uma população em constante crescimento (ABRAMOVAY, 2010). O aumento na produção ocorreu através de melhorias na tecnologia de produção, melhoramento genético das culturas e, principalmente, devido à adoção e uso de fertilizantes nitrogenados (SCHNABLE, 2015; SMIL, 2001). A partir do ano de 1950 o processo de produção industrial de amônia de Haber-Bosch se difundiu, sendo rapidamente adotado ao redor do mundo (SMIL, 2001).

Esse ganho em produção não ocorre, porém, sem prejuízo ao meio ambiente. O uso desenfreado e em excesso de fertilizantes é responsável pela contaminação de águas subterrâneas, aumento do efeito estufa e da poluição e eutrofização e acidificação do solo e de sistemas costais, causando danos à saúde humana e perda da biodiversidade do ambiente (ERISMAN et al., 2008; GOOLSBY et al., 2001; KAMPA; CASTANAS, 2008; SELMAN, M.; SUGG, Z.; GREENHALGH, S.; DIAZ, 2008). Outro problema é a natureza finita dos fertilizantes minerais, principalmente o fósforo, o que pode vir a causar problemas socioeconômicos futuros devido a sua escassez (OBERSTEINER et al., 2013). Neste cenário, se faz necessária a busca por fontes alternativas e sustentáveis ao uso de fertilizantes químicos.

Os microrganismos, em especial as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), surgem como uma alternativa viável e com potencial para a melhora do sistema de plantio tradicional (KLOEPPER; SCHROTH, 1981). Essas bactérias possuem a capacidade de estimular o crescimento das plantas hospedeiras por meio de diversos mecanismos como a disponibilização de nutrientes minerais, principalmente através da fixação biológica de nitrogênio (FBN) e da solubilização de fosfato, e a produção de fitohormônios (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011). Além disso, algumas espécies possuem a capacidade de biocontrole de fitopatógenos de maneira direta, através da produção de compostos antimicrobianos, ou indireta, através do estímulo da resistência sistêmica da planta (BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012; COMPANT et al., 2005). Dentre os gêneros com atividade de promoção de crescimento de plantas podem ser citados *Azospirillum*, *Burkholderia* e *Bacillus*.

O gênero *Azospirillum* comporta bactérias Gram-negativas, diazotróficas, de vida livre, e capazes de produzir fitohormônios, em especial ácido indol-3-acético (MEHNAZ, 2015). Esse gênero é frequentemente associado a gramíneas e sua capacidade em promover o crescimento dessas é bem relatada, sendo utilizada inclusive na composição de inoculantes comerciais (HUNGRIA et al., 2010). O gênero *Burkholderia* comporta bactérias Gram-negativas, que apresentam grande versatilidade de habitat e nutricional (COENYE; VANDAMME, 2003). Essas bactérias apresentam a capacidade de FBN e produção de fitohormônios (ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; ONOFRE-LEMUS et al., 2009), e estão presentes na rizosfera de variadas culturas (LI et al., 2014; SHAKYA et al., 2013; SUN et al., 2008; UROZ et al., 2010). O

gênero *Bacillus* comporta bactérias Gram-positivas, com ampla distribuição na natureza (GARDENER, 2004). As bactérias deste gênero são capazes de promover o crescimento de plantas além da capacidade de atuar no biocontrole de patógenos (BAIS; FALL; VIVANCO, 2004; ORTÍZ-CASTRO; VALENCIA-CANTERO; LÓPEZ-BUCIO, 2008). A capacidade de *Bacillus* em formar esporos o torna ideal para a formulação de inoculantes comerciais, dado que essa característica aumenta a viabilidade do produto (EMMERT; HANDELSMAN, 1999).

Quando inseridas, as BPCP provocam a alteração do ambiente através da produção de metabólitos e capacidade de alterar o padrão de exsudação das plantas hospedeiras, o que pode favorecer o crescimento de determinados grupos de microrganismos, enquanto que prejudica outros, assim causando alterações na estrutura da comunidade microbiana associada às plantas, também chamado de microbioma (CASTRO-SOWINSKI et al., 2007). Classifica-se por microbioma o conjunto de microrganismos que colonizam os tecidos da planta e a área do solo sob influência de sua raiz, que podem atingir densidade superior às células da própria planta (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). A planta e seu microbioma possuem uma relação de associação, com a primeira fornecendo fotossíntatos que são fontes de energia para o segundo, enquanto que este fornece compostos responsáveis pelo desenvolvimento e saúda daquela (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013).

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a inoculação das BPCP *Burkholderia ambifaria* linhagem RZ2MS16, *Bacillus* sp. linhagem RZ2MS9 e *Azospirillum brasilense* linhagem Ab-v5, bem como a coinoculação de RZ2MS16 com AB-v5, e RZ2MS9 com Ab-v5, é capaz de promover o crescimento de plantas de milho em condições de campo. Também foi avaliado se a inoculação dessas bactérias é capaz de modular a estrutura da comunidade microbiana associada à folha e à raiz da planta de milho, visando aumentar o entendimento sobre como é dada a relação entre as BPCP inoculadas e a microbiota associada à planta hospedeira.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Importância da cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta pertencente à família das gramíneas (*Poaceae*). Devido a sua ampla distribuição geográfica e utilização, é considerado o terceiro cereal mais importante do mundo. A cultura apresenta cultivo anual e ciclo de vida curto, com alta produção e facilidade de processamento dos grãos (INDIA, 2010). O seu uso varia conforme os diferentes países. Nos países desenvolvidos da América do Norte e Europa a maior parte da produção é destinada à alimentação animal (GARCIA et al., 2006; INDIA, 2010). Também é utilizado na produção de biocombustíveis e como matéria prima de produtos industriais, como na produção de amido e óleo (PAES, 2006).

Nos países subdesenvolvidos da América Latina e África Subsaariana a principal utilização do milho é na alimentação humana, sendo considerado um alimento base da dieta (INDIA, 2010; PAES, 2006). O milho é considerado um alimento energético, devido à sua composição predominante de carboidratos (amido) e lipídeos (óleo), e o seu consumo pode ocorrer de maneira direta, através do grão, ou indireta, através de alimentos processados pela indústria (PAES, 2006).

O centro de origem do milho foi definido como a região Mesoamericana, que hoje compreende o México e a América Central, tendo sido domesticado cerca de 9000 anos atrás a partir da gramínea selvagem teossinto (*Zea mays* ssp. *parviglumis*), endêmica da região de planície do sudoeste mexicano, e sujeito ao cultivo desde então (SCHNABLE, 2015; VAN HEERWAARDEN et al., 2011). Foi o primeiro cereal cultivado no continente e, a partir do século XVI, foi introduzido na Europa e na Ásia através das expedições navais europeias (INDIA, 2010).

O milho é a cultura geograficamente mais ubíqua no mundo, crescendo em uma vasta variedade de zonas climáticas, sendo cultivada em aproximadamente 13% das áreas de agricultura do mundo, com a maior extensão de 50º N à 45º S (LEFF; RAMANKUTTY; FOLEY, 2004). O continente americano é o principal produtor do grão, sendo responsável por 51,5% da produção mundial, seguido pela Ásia, com 29,8% de participação, e pela Europa com 11%. Em nível de países, os maiores produtores são os Estados Unidos, com 361,09 milhões de toneladas produzidas, China, com 215,64 milhões, e Brasil com 79,87 milhões. Juntos, os três representam 65% da produção mundial do grão, medida em 1.021,61 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2016).

No Brasil, o milho representa a terceira maior cultura em volume de produção, atrás apenas da cana-de-açúcar e da soja. A produção ocorre ao longo de todo o país, tanto em pequenas propriedades, geralmente para subsistência, quanto em grandes, para atender ao mercado interno e externo (PAVÃO; FERREIRA FILHO, 2011). Os maiores estados produtores de milho são o Mato Grosso, Paraná e Mato Grosso do Sul, com 20,76, 15,86 e 9,28 milhões de toneladas, respectivamente, na safra 2014/15. O estado de São Paulo é o sétimo maior produtor, com 4,16 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016). A produtividade média no Brasil é de 5.396 Kg/ha, ocorrendo uma disparidade entre a produtividade média observada na região Norte-Nordeste (2.634 Kg/ha) e na Centro-Sul (6.143 Kg/ha), esta última mais tecnificada e responsável por 89,6% da produção nacional (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2016). Visto que os Estados Unidos apresentam produtividade média de 10.732 Kg/ha (FAOSTAT, 2016), a produção nacional apresenta potencial de crescimento.

2.2. O uso de fertilizantes químicos e seu impacto ambiental

Os nutrientes minerais contidos no solo são essenciais para o crescimento normal e desenvolvimento das plantas. Eles constituem muitos componentes do metabolismo vegetal, como proteínas, ácidos nucléicos, clorofila e enzimas e são necessários aos processos vitais da planta (IFA, 2000). Quando a planta cresce em condições onde não há limitação dos recursos minerais, o seu desenvolvimento ocorre em taxas ótimas permitindo atingir o seu potencial produtivo. Se os nutrientes forem um fator limitante, o crescimento da planta é reduzido e essa deve manejar a aquisição e uso dos nutrientes de forma a completar o seu ciclo de vida (GRIME, 1977).

Dentre os nutrientes, há os que são necessários em maiores quantidades, denominados de macronutrientes, nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), e aqueles necessários em menores, os micronutrientes, boro (B), cloro (Cl), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni) e zinco (Zn). Visando maximizar o desempenho produtivo das culturas, a agricultura moderna utiliza da aplicação de fertilizantes, naturais ou manufaturados, contendo basicamente os macronutrientes NPK, para suplementar a disponibilidade natural de nutrientes do solo, satisfazendo a demanda de culturas que apresentam alto potencial de produtividade, alcançando assim produções economicamente viáveis (IFA, 2000).

O nitrogênio (N) é um macronutriente de enorme importância no desenvolvimento e funcionamento das plantas por ser componente de proteínas e ácidos nucléicos. Ocorre de forma abundante na atmosfera em forma molecular (N_2), não assimilável pelas plantas. Nos ambientes terrestre e marinho, através da fixação biológica, o N_2 é reduzido para nitrogênio reativo (N_R) que é assimilado e transformado em uma variedade de aminoácidos e outros compostos. Ao final do processo o nitrogênio retorna à atmosfera em sua forma N_2, através da ação da denitrificação microbiana (FOWLER et al., 2013; GALLOWAY et al., 2003).

O nitrogênio é essencial para o aumento da produção de alimentos, e o solo não o contém em quantidade que atenda a demanda das culturas para a produção em larga escala, configurando assim um fator limitante (ERISMAN et al., 2008, 2013). O processo industrial de produção de amônia de Haber-Bosch, que combina N_2, captado diretamente da atmosfera, com hidrogênio (H_2), em alta temperatura e pressão e na presença de um catalizador, sintetizando NH_3, foi o responsável por impulsionar o aumento na produtividade, e consequentemente, na produção de alimentos (ERISMAN et al., 2008; SMIL, 2001). Esse processo foi criado em 1909 e rapidamente difundido após 1950, ocasionando, desde então, crescente aumento na produção de alimentos e na utilização de fertilizantes na agricultura (SMIL, 2001). A rápida adoção do uso de fertilizantes nitrogenados reflete-se no aumento de 11,8 milhões de toneladas de N utilizado em 1961 para 110,2 milhões em 2013 (IFADATA, 2016).

O fósforo (P) é outro nutriente essencial para o metabolismo das plantas por ser componente estrutural de ácidos nucléicos, coenzimas e fosfoproteínas e pelo seu papel no processo de transporte de energia celular, respiração e fotossíntese. O fornecimento adequado de P é necessário durante todos os estágios de crescimento da planta, sendo um nutriente limitante ao desenvolvimento destas (CLEVELAND et al., 2013; REIJNDERS, 2014).

O P ocorre naturalmente em solos, na forma mineral ou orgânica, estando altamente fixado e, assim, insolúvel para as plantas. Fatores abióticos, como o intemperismo, e bióticos, como a exsudação radicular e atividade microbiana, agem sobre o P tornando-o solúvel (GLASS, 1989; HU et al., 2013; JIANBO et al., 2011). A solubilização ocorre de maneira lenta, podendo não suprir a demanda de culturas altamente produtivas, então, para garantir que a cultura atinja alta produtividade, a agricultura faz uso da aplicação de fertilizantes fosfatados no solo. O fertilizante fosfatado é um minério extraído de depósitos sedimentares de fosforita, finitos e esgotáveis, que se

acumularam, há milhões de anos atrás, como resultado de processos geológicos (CORDELL; WHITE, 2011; OBERSTEINER et al., 2013; REIJNDERS, 2014).

O potássio (K) é um fertilizante mineral extraído de rochas como os feldspatos potássicos e as micas (VAN RAY; VAN DIEST, 1979). O K é essencial às plantas atuando em processos de ativação enzimática, fotossíntese, síntese de proteínas, mediando a osmorregulação durante a expansão celular, movimentos estomatais e tropismo, além de ser necessário para o transporte de solutos pelo floema e para o equilíbrio de cargas no interior de células vegetais (MÄSER; GIERTH; SCHROEDER, 2002).

No ano de 2013 foram consumidos cerca de 181,6 milhões de toneladas de fertilizantes, no mundo, sendo aproximadamente 110,2 Mt de N, 41,1 Mt de P e 30,4 Mt de K. O maior consumidor mundial de fertilizantes é a China, com consumo de 52,2 Mt em 2013, seguido por Índia, com 24,5 Mt, Estados Unidos, com 21,3 Mt, e Brasil, com consumo de 13,4 Mt (IFADATA, 2016). No Brasil, em 2010, foram aplicados em média 160 kg de fertilizantes por hectare, porém ocorre desigualdade na distribuição desta aplicação entre as regiões do país. As regiões Sudeste, Centro-Oeste e Sul apresentaram, em 2010, média de aplicação de aproximadamente 210, 170 e 150 $kg.ha^{-1}$, respectivamente, enquanto que as regiões Nordeste e Norte registraram média de 90 e 70 $kg.ha^{-1}$, respectivamente (IBGE, 2012).

Apesar da importância dos fertilizantes para assegurar a produção de alimentos para a crescente população global, o uso desenfreado e em excesso leva a graves consequências para o meio ambiente e a saúde humana. O P é altamente fixável no solo, e quando aplicado em forma de fertilizante, grande parte se precipita em complexos insolúveis para as plantas (GOLDSTEIN, 1986). Para superar esta adversidade, os agricultores tendem a aplicar o fertilizante em abundância, elevando o custo e podendo causar danos ao solo e águas (JIANBO et al., 2011), estima-se que cerca de 80% do P aplicado no solo é perdido, devido à erosão (CORDELL; WHITE, 2011).

As culturas são capazes de assimilar 50% ou menos do N que é aplicado na forma de fertilizantes, devido à natureza móvel do N_R, temporização do fornecimento do nutriente e a demanda da cultura (PEOPLES; HERRIDGE; LADHA, 1995). Assim parte deste nitrogênio aplicado é perdida através da lixiviação do nitrato ou da emissão de gases à atmosfera.

O acúmulo de N_R na atmosfera e na superfície terrestre causa danos à saúde humana, ao ecossistema e à biodiversidade. Quando acumulado na atmosfera, em formas voláteis como amônia (NH_3), óxidos de nitrogênio (NO_X) e óxido nitroso (N_2O), o N_R contribui na formação da poluição, materiais particulados e aerossóis, que podem causar danos severos à saúde de pessoas expostas (KAMPA; CASTANAS, 2008). O NO_X atmosférico também contribui no aumento da formação de ozônio (O_3) troposférico, que causa danos à saúde humana e é apontado, pela OMS, como responsável por um amento nas taxas de mortalidade e insuficiência respiratória nos últimos anos (KAMPA; CASTANAS, 2008). O O_3 também é absorvido pelas plantas, através dos estômatos, causando morte celular e redução nas taxas fotossintéticas, levando a perdas na produtividade de plantas cultiváveis e florestais, e redução nos níveis de assimilação do CO_2 (PLEIJEL et al., 2007).

O N_R pode se acumular no solo na forma de íon nitrato (NO_3^-), que quando em situação de fornecimento excessivo de água, tanto por precipitação quanto por irrigação, se combina com cátions base lixiviando através do perfil do solo (CREWS; PEOPLES, 2004; ERISMAN et al., 2013). Em regiões com aquíferos subterrâneos, a lixiviação do nitrato abaixo da zona das raízes pode resultar na contaminação destas águas, representando um risco à saúde humana se destinada ao consumo. A OMS define um padrão máximo de 50 mg de NO_3^- por litro de água em casos de exposição em curto prazo, e de 3 mg de NO_3^- por litro para exposição crônica (WHO, 2011).

Modesto et al. (2010) monitorando 61 poços de abastecimento público que captam águas do Aquífero Bauru, constataram que 16,4% apresentavam valores de NO_3^- acima de 10 $mg.L^{-1}$, e 46% acima de 5 $mg.L^{-1}$, em pelo menos uma amostra no período de 2007 a 2009. Dorigon et al. (2008) observaram teores médios de nitrato da ordem de 4,3 $mg.L^{-1}$, nitrogênio amoniacal da ordem de 6,6 $mg.L^{-1}$, na água do rio Ditinho em Xanxerê/SC, estando associado ao manejo inadequado de dejetos animais e à intensa ocupação e uso do solo para a agricultura na microbacia estudada. Araújo et al. (2011) evidenciou processo de nitrificação em 60% dos poços rasos analisados na região do médio rio Guamá, no estado do Pará, sendo que em 30% dos poços os teores de nitrato são superiores a 2 $mg.L^{-1}$, apontando a atividade agrícola intensiva como a principal responsável por este processo.

O acúmulo de N_R e P pode causar acidificação e eutrofização dos ambientes, favorecendo espécies nitrofílicas ou ácido resistentes em detrimento àquelas mais sensíveis e ocasionando perda da biodiversidade. No solo, ocorre redução de fungos de vida livre, micorrizas e bactérias fixadores de nitrogênio, causando impactos em processos como mineralização da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (CREWS; PEOPLES, 2004; ERISMAN et al., 2013). Em ambientes aquáticos ocorre o crescimento de espécies que eficientemente assimilam estes nutrientes, como algumas algas e cianobactérias, levando a depleção dos níveis de oxigênio e redução da entrada de luz nas águas superficiais, prejudicando espécies sensíveis á falta de O_2 e luz, causando a redução e até perda da biodiversidade (RABALAIS, 2002).

Selman et al. (2008) identificaram 415 sistemas costais eutróficos e hipóxicos ao redor do mundo, com 169 áreas documentadas hipóxicas, 233 áreas em situação alarmante e apenas 13 sistemas em recuperação. Um exemplo é o desenvolvimento periódico de uma grande área hipóxia próxima ao delta do Rio Mississippi no Golfo do México, devido ao aumento da lixiviação de N de terras agrícolas nas bacias do rio Mississippi e Atchafalya (GOOLSBY et al., 2001; RABALAIS; TURNER; SCAVIA, 2002).

Segundo Rockström et al. (2009) há um limite natural para a fixação antropogênica de N_2 atmosférico, que ao ser ultrapassado prejudicaria a eficiência do ecossistema em reverter o N_R a N_2, gerando assim acúmulo tanto na atmosfera quanto na superfície do planeta. Esses autores concluíram que o limite seguro de fixação antropogênica é de 35 milhões de toneladas de N por ano, sendo que atualmente a quantidade fixada é de aproximadamente 121 milhões de toneladas, valor maior do que a metade do N fixado por todos os processos naturais em conjunto, estipulado em 203 milhões de toneladas (FOWLER et al., 2013). Rockström et al. (2009) também propõem o limite de 11 milhões de toneladas de P liberado nos oceanos por ano, sendo que a quantidade observada atualmente está entre 8,5 e 9,5 Mt. A crescente demanda por fertilizantes fosfatados também leva ao esgotamento de suas reservas minerais, que são finitas, fazendo com que se eleve o custo de importação. Isto, futuramente, pode prejudicar os países sub-desenvolvidos, dependentes da importação de fertilizantes, a garantir sua segurança alimentar (OBERSTEINER et al., 2013).

Neste cenário é necessária a busca por novos métodos para a melhoria da nutrição das plantas, que tornem a agricultura mais sustentável enquanto atenda as demandas humanas. Um dos meios com grande potencial é o uso de inoculantes formulados com microrganismos promotores de crescimento, capazes de aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas.

Em 2011 o governo brasileiro lançou o Plano ABC (Plano Setorial de Mitigação e de Adaptação às Mudanças Climáticas para a Consolidação de uma Economia de Baixa Emissão de Carbono na Agricultura), como parte do compromisso de reduzir entre 36,1% e 38,9% das emissões de gases de efeito estufa projetadas para 2020, assumido na 15ª Conferência das Partes (COP-15). Um dos objetivos do plano é implementar e intensificar projetos

de pesquisa, desenvolvimento e inovação em FBN, visando o desenvolvimento de novos inoculantes, e a divulgação e distribuição destes bioinoculantes para agricultores (BRASIL, 2012).

2.3. Microbioma de plantas

Os microrganismos são capazes de colonizar todos os tecidos vegetais, e podem atingir densidade de células maior do que as células da própria planta, sendo denominado como o microbioma da planta (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Dentre os microrganismos em associação com as plantas há os que afetam o desenvolvimento de seus hospedeiros de maneira positiva, sendo classificados como benéficos, ou negativa, os deletérios ou patogênicos. Há ainda aqueles que não interferem ou neutros (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003). Em associação mutualista, a planta fornece fotossíntatos que são assimilados pelos microrganismos servindo como fonte de energia, e os microrganismos, por sua vez, contribuem com a produção de compostos que auxiliam a planta em seu desenvolvimento e na manutenção de sua sanidade (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013).

O solo é um dos ecossistemas microbianos mais ricos do planeta, e sua diversidade microbiana é determinada por variáveis edáficas como o pH, umidade, conteúdo de carbono orgânico e relação C:N (FIERER; JACKSON, 2006). São encontradas entre 10^6-10^9 UFC de bactérias por grama de solo (WHITMAN; COLEMAN; WIEBE, 1998), e sua microbiota é geralmente rica em espécies de crescimento lento com tamanho populacional mais estável, como os filos *Acidobacteria*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, e *Planctomycetes* (PEIFFER et al., 2013).

Na rizosfera, região do solo sob influência dos compostos orgânicos exsudatos pelas raízes das plantas, se observa o enriquecimento de bactérias organotróficas. Os filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteriodete*, por assimilar componentes orgânicos de maneira eficiente e apresentar crescimento acelerado, são favorecidos nesta região (LI et al., 2014; PEIFFER et al., 2013; SHAKYA et al., 2013; UROZ et al., 2010). Características inerentes da planta como espécie, genótipo e estágio de crescimento também interferem na composição da comunidade rizosférica (BULGARELLI et al., 2013). Bactérias copiotróficas ou r-estrategistas são mais abundantes nos estágios iniciais de sucessão microbiana, enquanto que nos estágios tardios ocorre o predomínio de espécies oligotróficas ou k-estrategistas (PHILIPPOT et al., 2013). São encontradas entre 10^6-10^9 UFC de bactérias cultiváveis por grama de solo rizosférico (BENIZRI; BAUDOIN; GUCKERT, 2001).

A partir da colonização da rizosfera várias bactérias, chamadas endofíticas, possuem a capacidade de entrar e colonizar os tecidos internos da planta. A penetração no tecido vegetal pode ocorrer tanto de maneira passiva, através de aberturas que ocorrem nas regiões de emergência das raízes ou criadas por outros microrganismos, quanto de forma ativa, envolvendo a produção de enzimas que degradam a parede celular. Ao colonizar os tecidos interno da raiz, os microrganismos podem atingir os vasos condutores e colonizar também a parte aérea das plantas, ou filosfera (COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010). Estima-se que a população endofítica varia entre 10^6-10^7 UFC por centímetro quadrado de área foliar (LINDOW; BRANDL, 2003). A filosfera é exposta a grandes variações de temperatura, umidade e irradiação de luz UV, sendo um ambiente diferente da rizosfera, onde se observa maior estabilidade (BULGARELLI et al., 2013).

2.4. Estudo da estrutura da comunidade bacteriana

Tradicionalmente o estudo da diversidade microbiana de amostras ambientais era feito através de técnicas de cultivo e isolamento de colônias. Esta técnica se limita aos microrganismos aptos a cultivo em laboratório, o que

gera dados subestimados da diversidade total da amostra (HILL et al., 2000). Estima-se que técnicas de cultivo permitem recuperar apenas entre 1 e 10% da diversidade bacteriana existente em um ambiente (AMANN; LUDWIG; SCHLEIFER, 1995).

Avanços na área da biologia molecular tornaram possível o uso de técnicas que independem de cultivo para o estudo da comunidade microbiana, gerando assim uma estimativa com maior fidelidade da comunidade amostrada. Técnicas moleculares envolvem a lise das células bacterianas diretamente coletadas, a extração de seus ácidos nucléicos e análise de sequências alvo ou de toda a informação genética (RANJARD; POLY; NAZARET, 2000).

No estudo da diversidade bacteriana em uma amostra o mais comum é a análise do gene ribossomal 16S rRNA. Este gene apresenta mais que 10% de suas bases conservadas, entre diferentes genomas bacterianos, não adjacentes entre si e que formam regiões conservadas não contíguas, onde são desenhados *primers* universais (WATANABE; KODAMA; HARAYAMA, 2001). Entre estas regiões conservadas são encontradas nove regiões hipervariáveis que se mostram como marcadores filogenéticos valiosos, sendo o alvo em estudos moleculares de diversidade (BAKER; SMITH; COWAN, 2003). Um problema relacionado a amostras de tecidos vegetais está na proximidade entre o 16S cloroplastidial e o 16S bacteriano, devido à descendência evolutiva do cloroplasto, o que acaba gerando problemas com contaminação de sequências (CHELIUS; TRIPLETT, 2001). Uma das únicas regiões que contém *mismatch* entre estas sequências está entre as posições 783 e 799 do 16S de *E. coli*, onde foram desenhados *primers* que evitam a amplificação do gene cloroplastidial, enquanto amplificam o bacteriano, como o 799F (CHELIUS; TRIPLETT, 2001) e o 783R (RASTOGI et al., 2010). Estes *primers* são complementares a aproximadamente 64% das sequências de 16S rRNA contidas no *Ribosomal Database Project* II (RDP) com os filos *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* e *Cloacimonetes* os menos amostrados, com 8%, 18%, 0,3% e 5% de similaridade (COLE et al., 2005).

2.5. Bactérias promotoras de crescimento em plantas

Dentro do grupo dos microrganismos associados às plantas existem espécies com capacidade de promoção do crescimento e sanidade de seus hospedeiros, que são denominadas Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (KLOEPPER; SCHROTH, 1981). Gray e Smith (2005) sugerem a classificação das BPCP's com base no compartimento da planta que ocupam, podendo ser intracelulares (iBPCP) ou extracelulares (eBPCP). As iBPCP colonizam o interior das células vegetais, geralmente estabelecendo relação de simbiose em estruturas de nódulos. As eBPCP são bactérias de vida livre que colonizam a rizosfera, superfície radicular ou espaços intercelulares no córtex da raiz.

A promoção do crescimento da planta por essas bactérias ocorre através de mecanismos diretos, como a solubilização de nutrientes minerais, fixação de nitrogênio, produção de fitohormônios, indução de resistência sistêmica, ou de maneira indireta, através do controle de organismos patogênicos (ORTÍZ-CASTRO et al., 2009). As funções de promoção de crescimento exercidas pelas BPCP podem ser classificadas em três categorias: *(i)* biofertilizante, *(ii)* fitoestimulante, e *(iii)* biocontrole (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

2.5.1. BPCP como biofertilizantes

Algumas bactérias possuem mecanismos capazes de aumentar a disponibilidade de fósforo e nitrogênio no solo. Os solos geralmente são ricos em quantidade de fósforo, mas estes estão fixados na forma de fosfatos

inorgânicos e orgânicos, e assim são insolúveis para as plantas. Para ser absorvido deve estar em forma iônica (P_i, HPO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$) ou P orgânico de baixo peso molecular (GLASS, 1989). Alguns microrganismos residentes na rizosfera, em especial bactérias, possuem a habilidade de solubilizar o fosfato, inorgânico ou orgânico, tornando o P disponível (GLICK, 1995).

A solubilização do fosfato inorgânico ocorre através da liberação, pelas bactérias, de ácidos de baixo peso molecular que promovem a acidificação do meio e a substituição dos cátions ligados ao P, principalmente cálcio, ferro e alumínio, por H^+. O ácido mais frequente é o glucónico, embora outros ácidos também atuem na solubilização. A solubilização de fosfato orgânico, também chamada de mineralização, ocorre através da hidrólise enzimática dos substratos e consequente liberação de P_i. Essa hidrólise ocorre através da ação de enzimas fitases, que degradam fitatos, e fosfatases, que atuam sobre os ésteres fosfóricos (RODRÍGUEZ; FRAGA, 1999; SHARMA et al., 2013).

Estima-se que cerca de 40% das bactérias de solo possuem a capacidade de solubilizar fosfato (REIS; DOS SANTOS TEIXEIRA; PEDRAZA, 2011), e que até 50% do total de fósforo disponível pra as plantas provém de bactérias solubilizadoras (VAZQUEZ et al., 2000). Já foram identificadas bactérias solubilizadoras de fosfato *in vitro*, como espécies pertencentes aos gêneros *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella, Burkholderia, Bacillus, Pseudomonas, Pantoea* e *Anthrobacter* (BATISTA, 2013; CHEN et al., 2006; GUPTA et al., 2012; SINGH et al., 2014; THALLER et al., 1995). Além disso, estudos mostraram que a inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato pertencentes aos gêneros *Serratia* e *Pseudomonas* promoveram o crescimento de milho (HAMEEDA et al., 2008; VYAS; GULATI, 2009).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo metabólico realizado exclusivamente por alguns grupos de bactérias e *Archaea*, chamados diazotróficos. Esse processo, exercido pelo complexo enzimático nitrogenase, possui a capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico tornando-o acessível para outros eucariotos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). A nitrogenase é uma metaloenzima responsável pela catálise da reação de redução de N_2 a amônia. A forma padrão da nitrogenase, contendo molibdênio, é composta por dois componentes: uma Fe-proteína e uma Mo-Fe-proteína (IGARASHI; SEEFELDT, 2003). Existem outros sistemas alternativos, onde o molibdênio é substituído por vanádio ou ferro (EADY, 1996).

A Fe-proteína, também chamada de dinitrogenase redutase, contém um sítio ao qual se ligam duas moléculas MgATP, engatilhando a hidrólise deste MgATP a MgADP e a transferência de elétron para a Mo-Fe-proteína. A Mo-Fe-proteína, ou dinitrogenase, é heterotetrâmera, contendo duas cópias de dois tipos diferentes de domínios metálicos: *(i)* o P-*cluster*, presumido como o receptor inicial do elétron transferido, e *(ii)* o co-fator Fe-Mo, sítio ativo onde ocorre a ligação e redução do N_2 (IGARASHI; SEEFELDT, 2003; REES; HOWARD, 2000).

A redução do N_2 através da nitrogenase é uma reação energeticamente cara, sendo consumidos 16 ATPs e oito elétrons por cada molécula reduzida (REES; HOWARD, 2000), seguindo a equação:

$$N_2 + 8\ e^- + 16\ ATP + 8\ H^+ \rightarrow 2\ NH_3 + 16\ ADP + 16\ P_i + H_2$$

A nitrogenase é sensível ao O_2, e ao entrarem em contato ocorre inibição da atividade enzimática e FBN, assim as bactérias possuem estratégias para evitar esse contato (REED; TOWNSEND; CLEVELAND, 2011).

As bactérias diazotróficas simbióticas, em maior parte representada pela interação entre bactérias do gênero *Rhizobium* e plantas leguminosas, são reconhecidas pela formação da estrutura de nódulos nas raízes, onde a bactéria é enclausurada em compartimentos de membrana dentro de células especiais (GEURTS; XIAO;

REINHOLD-HUREK, 2016). Dentro do nódulo é formado um ambiente anaeróbico onde ocorre a máxima eficiência de funcionamento do complexo enzimático da nitrogenase, e a relação de simbiose é dada através do fornecimento de compostos orgânicos das plantas para as bactérias, que retribuem fornecendo N_R (FRANSSEN et al., 1995).

Dentre as diazotróficas de vida-livre existem espécies anaeróbicas, anaeróbicas facultativas ou aeróbicas e assim habitam variados ambientes com diferentes graus de O_2 disponível. Para evitar o efeito negativo do O_2, estas bactérias utilizam mecanismos como o isolamento da nitrogenase em componentes celulares onde a concentração de O_2 é mantida baixa, por exemplo, os heterocistos, a separação temporal do processo de FBN e aqueles a base de O_2, como a fotossíntese, ou ainda aumentando a respiração para reduzir os níveis de O_2 (REES; HOWARD, 2000; ROBSON; POSTGATE, 1980).

Além do O_2, a alta disponibilidade de N_R também reduz a atividade da nitrogenase, já que as diazotróficas podem optar por assimilar o N_R já disponível ao invés de fixar N_2 atmosférico. A taxa de atividade da nitrogenase aumenta conforme aumenta a disponibilidade de carbono, P e micronutrientes no solo (REES; HOWARD, 2000).

No Brasil a inoculação de soja com *Rhizobium* consegue suprir a demanda em N desta cultura, gerando economia de aproximadamente três bilhões de dólares anuais (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007). Embora não sejam capazes de suprir toda a necessidade de N de suas hospedeiras, dentre as bactérias diazotróficas que se relacionam com gramíneas podem ser citadas: *Azospirillum* sp. em milho (DE SALAMONE et al., 1996), arroz (MALIK et al., 1997) e trigo (BODDEY et al., 1986); *Burkholderia* spp. e *Herbaspirillum seropedicae* em arroz (BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 2000); *Gluconacetobacter diazotrophicus* em cana-de-açúcar (SEVILLA et al., 2001); *Azotobacter* sp. em milho (PANDEY; SHARMA; PALNI, 1998), entre outras.

2.5.2. BPCP como fitoestimulantes

Uma das características de promoção do crescimento de plantas por rizobacterias é a capacidade de produzir fitohormônios, como auxina, ácido giberélico e citocinina. Esses hormônios atuam na planta promovendo o crescimento celular e aumento da área radicular, permitindo assim maior volume de exploração de solo e, consequentemente, aumentando a absorção de água e nutrientes e promovendo o crescimento da parte aérea (BHATTACHARYYA; JHA, 2012).

Auxina é uma classe de fitohormônios responsável pela divisão, extensão e diferenciação das células e tecidos vegetais. Esses compostos estimulam a formação de xilema e da raiz, controlam o crescimento vegetativo, tropismo e a florescência, e afetam a fotossíntese, formação de pigmentos, biossíntese de vários metabólitos e resistência a estresses (GRAY; SMITH, 2005). Entre as auxinas, o ácido índol-3-acético (AIA) é comumente sintetizado pelas bactérias, principalmente a partir do triptofano como precursor, e pode ser assimilado pela planta hospedeira (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011). As plantas liberam grande quantidade de triptofano em seus exsudatos radiculares (WALKER et al., 2003) e é reportado que cerca de 80% dos microrganismos isolados de rizosfera possuem a capacidade de sintetizar e liberar AIA no meio (PATTEN; GLICK, 1996).

As principais vias de biossíntese bacteriana de AIA são a via indol-3-acetamida (IAM) e a via indol-3-piruvato (IPA). Na primeira, o triptofano é convertido em IAM e então hidrolisado em AIA e amônia, essa via já foi observada em espécies do gênero *Pseudomonas* (DIMKPA et al., 2012), *Erwinia* (MANULIS et al., 1998), *Streptomyces* (MANULIS et al., 1994), *Bradyrhizobium* (SEKINE et al., 1988) e *Azospirillum* (BAR; OKON, 1993; PRINSEN et al., 1993). Na segunda o triptofano é transaminado para IPA, descarboxilado a indol-3-acetaldeído (IAAld), e oxidado a IAA, essa via está presente em muitas bactérias benéficas como *Azospirillum* (COSTACURTA; KEIJERS;

VANDERLEYDEN, 1994; PRINSEN et al., 1993), *Enterobacter* (RYU; PATTEN, 2008), *Erwinia* (BRANDI; CLARK; LINDOW, 1996; MANULIS et al., 1998), *Paenibacillus* (PHI et al., 2008) e *Pantoea* (SERGEEVA; HIRKALA; NELSON, 2007). São conhecidas ainda a via triptamina, onde o triptofano é descarboxilado para triptamina e então convertida a IAAld, a via indol-3-acetonitrila e a via de oxidase da cadeia lateral do triptofano, além de vias que independem do triptofano como precursor (SPAEPEN; VANDERLEYDEN, 2011).

O etileno é um fitohormônio gasoso essencial para o desenvolvimento e crescimento normal da planta. Em condições de estresse, como salinidade, seca, alagamento, e patógenos, ocorre a produção acelerada e consequente aumento do nível endógeno deste hormônio na planta, induzindo a desfoliação, inibição do crescimento e morte celular, reduzindo a performance das culturas. Sua produção ocorre a partir da oxidação do 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) (JOHN, 1997). Algumas bactérias produzem a enzima ACC deaminase, capaz de clivar o ACC formando alfa-cetobutirato e amônia, reduzindo o nível deste hormônio em sua planta hospedeira.

A ACC deaminase se localiza dentro do citoplasma do microrganismo produtor, não sendo secretada. A planta, por sua vez, exsuda o ACC tornando-o disponível para ser absorvido e hidrolisado pelas bactérias, permitindo assim a redução de seu nível no interior da planta, reduzindo a biossíntese de etileno. Algumas bactérias endofíticas são capazes de assimilar o ACC que se encontra dentro dos tecidos vegetais, causando a redução do nível local de etileno (GLICK, 2005). Dentre os gêneros descritos como produtores de ACC deaminase pode-se citar *Bacillus* (BAL et al., 2013; XU et al., 2014), *Pseudomonas* (HONTZEAS et al., 2005; SHAHZAD et al., 2013), *Enterobacter*, *Rhizobium* (HONTZEAS et al., 2005) e *Burkholderia* (ONOFRE-LEMUS et al., 2009; SESSITSCH et al., 2005).

Ocorrem também bactérias com habilidade de produzir giberilina, fitohormônio associado à divisão e alongamento celular, como espécies do gênero *Bacillus* (GUTIERREZ-MANERO et al., 2001), *Acetobacter*, *Herbaspirillum* (BASTIÁN et al., 1998), *Burkholderia* (JOO et al., 2009) e *Sphingomonas* (KHAN et al., 2014), e produtoras de citocinina, que regula a divisão e crescimento celular, como algumas espécies de *Pseudomonas* (GARCÍA DE SALAMONE; HYNES; NELSON, 2001), *Bacillus* (ARKHIPOVA et al., 2005) e *Paenibacillus* (TIMMUSK et al., 1999).

2.5.3. BPCP como biocontrole

A rizosfera é habitada por diversos microrganismos que competem por espaço e metabólitos. Para se estabelecer, e eficientemente colonizar esse nicho, a bactéria inoculada deve superar esta competição, e, para isso, algumas são capazes de produzir compostos deletérios a outros organismos. Com a produção desses compostos, as BPCPs podem promover o controle de patógenos, beneficiando assim a planta hospedeira (BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010).

Em ambiente onde o ferro é limitante, as bactérias são capazes de secretar moléculas quelantes de ferro, chamados sideróforos, que sequestram esse elemento tornando-o indisponível para outros organismos. Essa estratégia pode servir para o biocontrole, dado que fungos patogênicos produzem sideróforos de menor afinidade (BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012; COMPANT et al., 2005). A absorção do complexo Fe-sideróforo ocorre através de receptores de membrana específicos, porém algumas linhagens de bactérias conseguem absorver sideróforos heterólogos secretados por outros microrganismos (RAAIJMAKERS et al., 1995). Também respondendo a estímulos ambientais, as bactérias são capazes de produzir antibióticos, moléculas orgânicas capazes de matar ou reduzir o crescimento microbiano, e enzimas hidrolíticas como quitinases, glucanases, proteases e lipases (BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012; COMPANT et al., 2005).

Além destes mecanismos diretos de controle de patógenos, o contato com as BPCP pode engatilhar mecanismos de defesa da planta hospedeira, causando alteração em sua síntese de metabólitos e estrutura da parede celular. Componentes estruturais ou moléculas sintetizadas pela bactéria, como flagelos, proteínas, lipossacarídeos e voláteis, podem ser responsáveis por este mecanismo, chamado de Indução de Resistencia Sistemica (ISR), que melhora o aparato de defesa da planta contra uma posterior infecção por organismo patogênico (COMPANT et al., 2005; RAMAMOORTHY, 2001).

2.6. Gênero *Burkholderia*

O gênero *Burkholderia* comporta bactérias Gram-negativas, em forma de bastonetes, podendo ou não apresentar flagelos, e pertencentes à subdivisão beta do filo das *Proteobacterias* (HOLMES; GOVAN; GOLDSTEIN, 1998). Este gênero foi criado em 1992, acomodando sete membros de *Pseudomonas*, sendo *B. cepacia* a espécie tipo (YABUUCHI et al., 1992). Atualmente o gênero compreende 101 espécies conhecidas (LPSN, 2016). As espécies deste gênero apresentam grande versatilidade de habitat, sendo encontradas, em sua maioria, em amostras de solo urbano e na rizosfera de plantas, onde podem ter o comportamento benéfico ou deletério, além de uma minoria de espécies descritas como patógenos de humanos e animais (COENYE; VANDAMME, 2003). Estudos sobre a estrutura da comunidade microbiana apontam que o gênero é um dos mais abundantes na endosfera da raiz de arroz (SUN et al., 2008), rizosfera de *Populus deltoides* (SHAKYA et al., 2013), carvalho (UROZ et al., 2010), e milho (LI et al., 2014; PEIFFER et al., 2013).

Algumas espécies de *Burkholderia* são descritas como patogênicas oportunistas em humanos, com capacidade de infectar os pulmões de pacientes com alguma doença incapacitante, como fibrose cística ou imunodepressão. *B. ambifaria* representa uma minoria destes casos, sugerindo um papel menor como patógeno oportunista em relação aos outros membros (COENYE et al., 2001; DALMASTRI et al., 2003).

Atualmente o gênero tem atraído interesse biotecnológico devido à capacidade de promoção de crescimento de culturas, e colonizar a rizosfera e a endosfera, aumentando assim a disponibilidade de nutrientes, e controlando patógenos. Na biorremediação, as mesmas tem a capacidade em metabolizar compostos recalcitrantes. A fixação de N_2 é conhecida no gênero (BONTEMPS et al., 2010; ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001), bem como a produção de ACC deaminase (ONOFRE-LEMUS et al., 2009). A inoculação com *Burkholderia* também causa o aumento no nível endógeno de giberilina, AIA e citocinina nas plantas hospedeiras (KANG et al., 2010; KUREPIN et al., 2015).

2.7 Gênero *Bacillus*

O gênero *Bacillus* compreende bactérias Gram-positivas, aeróbicas, móveis, em forma de bastonetes, com a capacidade de formar esporos, e produtoras de catalase. Foi descrito primeiramente por Cohn em 1872 (CLAUS; FRITZE, 1989), e compreende atualmente 318 espécies conhecidas (LPSN, 2016). Possui ampla distribuição na natureza, sendo encontrado em amostras de solo, água, plantas e animais, e nas mais diversas condições de temperatura, salinidade e acidez (GARDENER, 2004).

Atualmente o gênero tem despertado interesse devido ao potencial na formulação de inoculantes, dada a capacidade em promover o crescimento de plantas como o feijoeiro (ORTÍZ-CASTRO; VALENCIA-CANTERO; LÓPEZ-BUCIO, 2008), canola (GHOSH et al., 2003; SHENG, 2005), algodão (SHENG, 2005) e milho (BATISTA, 2013; EGAMBERDIYEVA, 2007), e, principalmente, a capacidade em sintetizar compostos antimicrobianos,

podendo atuar como agente de controle de organismos fitopatogênicos como *P. syringae* (BAIS; FALL; VIVANCO, 2004), *Fusarium* spp. (CAVAGLIERI et al., 2005), *Botrytis eliptica* (HUANG et al., 2005) e *Ralstonia solanaceaum* (CHEN et al., 2013). O biocontrole está relacionado à produção de quitinase (HUANG et al., 2005) e lipopeptídeos (BAIS; FALL; VIVANCO, 2004; ONGENA; JACQUES, 2008). O fato de formar esporos também o torna ideal para a formulação, pois assim garante maior viabilidade do produto (EMMERT; HANDELSMAN, 1999).

2.8. Gênero *Azospirillum*

Azospirillum é um gênero de bactérias Gram-negativas, em forma de bastão, de vida livre, possuem flagelos, são tipicamente aeróbicas e não fermentativas, e pertencem à classe alfa das *Proteobacterias* (MEHNAZ, 2015; REIS; DOS SANTOS TEIXEIRA; PEDRAZA, 2011). Em 1978 foram descritas as primeiras espécies deste gênero: *A. brasilense* e *A. lipoferum* (TARRAND; KRIEG; DÖBEREINER, 1978). Atualmente são conhecidas dezessete espécies (LPSN, 2016). São encontradas em solos de clima tropical e subtropical, principalmente na rizosfera e raízes de gramíneas, e são conhecidas por sua habilidade em promover o crescimento de sua planta hospedeira, através de FBN e produção de hormônios, principalmente auxina (MEHNAZ, 2015).

A FBN é uma característica do gênero, tendo sido reportado sua produção *in vitro* e a presença de genes fixadores em diversas espécies, como *A. brasilense* (BROEK et al., 1992; FANI et al., 1989; KANEKO et al., 2010; LIANG et al., 1992; MACHADO et al., 1995; MILCAMPS et al., 1996), *A. irakense* (KHAMMAS et al., 1989), *A. canadense* (MEHNAZ; WESELOWSKI; LAZAROVITS, 2007), e *A. oryzae* (XIE; YOKOTA, 2005). Ainda é inconclusiva a capacidade da planta hospedeira em assimilar o N_R fixado pelo *Azospirillum*, com autores indicando que a promoção de crescimento ocorra, principalmente, devido à produção de fitohormônios (DE SALAMONE et al., 1996; DOBBELAERE et al., 2002). Okon, Heytler e Hardy (1983) identificaram atividade de redução de acetileno na rizosfera de *Setaria italica* inoculada com *A. brasilense*, porém apenas 5% do NR fixado foi incorporado pela planta, tendo sido, provavelmente, devido à morte e mineralização das células bacterianas. Por outro lado também há estudos mostrando que a inoculação com *Azospirillum* spp. promove o crescimento com aumento da concentração de N nos tecidos (RODRIGUES et al., 2008; SAUBIDET; FATTA; BARNEIX, 2002).

Membros do gênero *Azospirillum* também são capazes de produzir fitohormônios, podendo essa característica ter maior contribuição na promoção do crescimento de plantas do que a própria FBN (MEHNAZ, 2015). *A. brasilense* é capaz de produzir auxina, giberilina, citocinina, ácido abscisico, etileno e reguladores de crescimento de plantas *in vitro* (COHEN; BOTTINI; PICCOLI, 2008; PERRIG et al., 2007; TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979) e aumento no nível endógeno de AIA e etileno em plantas inoculadas (RIBAUDO et al., 2006; SPAEPEN et al., 2014).

A solubilização de fosfato não é comum em *Azospirillum*, embora exista relato de solubilização de fosfato inorgânico *in vitro* por *A. halopraeferens* (SESHADRI et al., 2000) e produção de ácido glucónico por algumas linhagens de *A. brasilense* e *A. lipoferum* (RODRIGUEZ et al., 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico e condições de cultivo

Para o desenvolvimento deste projeto foi utilizado o híbrido de milho DKB 390 (Monsanto), tipo duro, que apresenta o grão na coloração amarelo-alaranjado, possui ciclo precoce, alta produtividade e estabilidade (DEKALB, 2016). As sementes foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Roberto Fritsche-Neto, docente do Departamento de Genética da ESALQ/USP.

Como inoculantes foram utilizadas as seguintes linhagens bacterianas:

(i) Burkholderia ambifaria, linhagem RZ2MS16: isolada da rizosfera de guaranazeiro (*Paullinia cupuna* [(Mart.) Ducke]) e pertencente à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo", esta bactéria apresenta produção de AIA, FBN e sideróforos *in vitro*, e resultados positivos de promoção de crescimento de milho (BATISTA, 2013). Possui a capacidade de colonizar endofiticamente a raiz e a folha de milho e soja (TSCHOEKE, 2016).

(ii) Bacillus sp., linhagem RZ2MS9: também isolada da rizosfera de guaranazeiro e pertencente à coleção do Laboratório de Genética de Microrganismos "Prof. João Lúcio de Azevedo", esta bactéria apresenta produção de AIA, FBN, solubilização de fosfato e produção de sideróforos *in vitro*, e resultados positivos na promoção de crescimento de milho (BATISTA, 2013). Foi demonstrada sua capacidade de colonizar endofiticamente a raiz e a folha de milho (dado não publicado).

(iii) Azospirillum brasilense, linhagem Ab-v5: inoculante comercial pertencente à "Coleção de culturas de microrganismos multifuncionais da Embrapa Soja: bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas" da Embrapa Soja, Londrina, Paraná, gentilmente cedida pela pesquisadora Mariângela Hungria. Apresenta FBN *in vitro* e é descrita como promotora de crescimento de milho (HUNGRIA et al., 2010). Essa bactéria também possui a capacidade de colonizar endofiticamente a raiz e folha de milho (TSCHOEKE, 2016)

Rotineiramente, as linhagens cresceram a 28 °C em meio de cultura apropriado: Luria-Bertani (LB) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) para RZ2MS9 e RZ2MS16, e meio DYGS (RODRIGUES NETO; MALAVOLTA JR; VICTOR, 1986) para Ab-v5.

3.2. Ensaio de antibiose

Inicialmente, foi realizado o ensaio de antibiose entre as linhagens RZ2MS9 e Ab-v5 para testar se ocorre inibição do crescimento de alguma das linhagens quando coinoculadas. As linhagens foram cultivadas separadamente, em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio DYGS, incubadas por 8 horas à 28ºC e agitação de 180 rpm. Após o crescimento, mediu-se a densidade óptica (DO_{600nm}) dos inóculos por meio de espectofotômetro. Meio de cultura DYGS + ágar (12 $g.L^{-1}$) contendo supensão bacteriana de uma das linhagens (DO_{600nm} = 0,1, aproximadamente 10^8 $UFC.mL^{-1}$) foi vertido em placas de Petri. Após solidificação, foram aplicados 10 µL da suspensão bacteriana da outra linhagem (DO_{600nm} = 0,1, aproximadamente 10^8 $UFC.mL^{-1}$) em quatro pontos sobre o meio. As placas foram incubadas em BOD (28ºC por 24 horas) e então foi observada a presença ou ausência de halo de inibição.

A falta de antibiose entre as linhagens RZ2MS16 e Ab-v5 foi verificada previamente por Tschoeke (2016).

3.3. Bacterização das sementes

Para a bacterização das sementes, cada linhagem foi multiplicada individualmente em tubos de ensaio contendo 5 mL do meio de cultura apropriado, em agitação constante de 180 rpm a 28°C por 24 horas. Em seguida, foi medida a DO_{600nm} deste pré-inóculo e transferida quantidade suficiente para frascos tipo *erlenmeyers* contendo 50 mL de meio de cultura líquido, de modo que a DO_{600nm} inicial de todos os todos os inóculos fosse de 0,1, e novamente levado para agitação de 180 rpm a 28 °C por 8 horas. Ao término do crescimento foi medida a DO_{600nm} da suspensão bacteriana, e então diluída com água destilada autoclavada para atingir DO_{600nm} = 0,6, correspondente a aproximadamente 10^9 células.

As sementes foram lavadas em água destilada, imersas em solução de sacarose 10% por 10 minutos, escorridas e secas à temperatura ambiente. Após secas, foram imersas nas suspensões bacterianas, individuais ou em consórcio, durante 30 minutos, e então semeadas. Como tratamento controle foi utilizado meio de cultura esterilizado para inoculação das sementes.

3.4. Delineamento experimental

Para avaliar a capacidade das linhagens bacterianas em promover o crescimento de plantas de milho, quando inoculadas de forma individual ou em consórcio, foi realizado um experimento em condições de campo na área experimental do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba, São Paulo, no período de 09 de dezembro de 2015 à 03 de fevereiro de 2016. O experimento seguiu o delineamento em blocos casualizados, composto por cinco blocos e seis tratamentos de inoculação: *(i)* RZ2MS16, *(ii)* coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5, *(iii)* Ab-v5, *(iv)* RZ2MS9, *(v)* coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5, e *(vi)* controle (Figura 1).

	Bloco 1	(1 m)	Bloco 2	(1 m)	Bloco 3	(1 m)	Bloco 4	(1 m)	Bloco 5	
Bord.	Bordadura		Bordadura		Bordadura		Bordadura		Bordadura	Bord.
Bord.	RZ2MS16		Ab-v5		RZ2MS9 + Ab-v5		RZ2MS16		RZ2MS16 + Ab-v5	Bord.
Bord.	Controle		Controle		Controle		Controle		Controle	Bord.
Bord.	RZ2MS16 + Ab-v5		RZ2MS16 + Ab-v5		RZ2MS9		RZ2MS9		RZ2MS9 + Ab-v5	Bord.
Bord.	Controle		Controle		Controle		Controle		Controle	Bord.
Bord.	Ab-v5		RZ2MS9		Ab-v5		Ab-v5		RZ2MS9	Bord.
Bord.	Controle		Controle		Controle		Controle		Controle	Bord.
Bord.	RZ2MS9		RZ2MS9 + Ab-v5		RZ2MS16		RZ2MS9 + Ab-v5		RZ2MS16	Bord.
Bord.	Controle		Controle		Controle		Controle		Controle	Bord.
Bord.	RZ2MS9 + Ab-v5		RZ2MS16		RZ2MS16 + Ab-v5		RZ2MS16 + Ab-v5		Ab-v5	Bord.
Bord.	Bordadura		Bordadura		Bordadura		Bordadura		Bordadura	Bord.

Figura 1. Distribuição das parcelas no campo experimento de plantas de milho inoculadas com as seguintes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. Cada parcela consistiu de 20 plantas, com espaço de 80 cm entre as parcelas dentro de cada bloco. Entre os blocos houve um espaçamento de um metro.

Cada parcela consistiu de uma linha de 5 metros, na qual foram semeadas 25 sementes, e, após sete dias, feito o desbaste, restando 20 plantas por linha. O espaçamento entre cada parcela foi de 80 centímetros e entre cada bloco foi de um metro. Foi feita adubação de base com aplicação de 290 $kg.ha^{-1}$ de NPK na formulação 8-28-16. Os dados de temperatura e índice pluviométrico durante o período foram coletados no *site* do Departamento de Engenharia de Biossistemas, ESALQ, USP, e estão dispostos na Tabela 1 (ESALQ, 2016).

Tabela 1. Temperatura média, umidade relativa média e índice de precipitação no município de Piracicaba entre os dias 09 de dezembro de 2015 e 3 de fevereiro de 2016 (ESALQ, 2016).

Período	Temperatura média (°C)	Úmidade relativa média (%)	Precipitação (mm)
9 dez - 15 dez	27,2	96,7	7,1
16 dez - 22 dez	27,0	91,2	0,6
23 dez - 29 dez	26,2	97,9	16,1
30 dez - 5 jan	27,0	97,0	6,8
6 jan - 12 jan	26,3	93,4	18,1
13 jan - 19 jan	26,4	93,0	10,2
20 jan - 26 jan	25,3	87,2	0,1
27 jan - 3 fev	28,3	89,8	3,0
Média do período	26,8	93,2	7,7

3.5. Avaliação da promoção de crescimento

A avaliação foi realizada oito semanas após o plantio, com a planta no estágio de pendoamento, e consistiu na medida das seguintes variáveis: *(i)* altura da planta, *(ii)* altura até a inserção da espiga, e *(iii)* diâmetro do colmo, medido no nó abaixo da espiga. Foram avaliadas as plantas no interior da linha, sendo descartadas as das extremidades. Para o tratamento controle, foi sorteada uma das linhas em cada bloco. A análise de variância foi realizada utilizando o software SAS, versão 9.2 (SAS INSTITUTE, 1999), e a comparação das médias utilizando o teste de Duncan ($p<0,05$).

3.6. Estudo da microbiota associada ao milho

Para a análise do efeito na comunidade microbiana mediante o uso de inoculantes foram coletadas amostras de folha e raiz, ambas aos 60 DAP. A coleta da folha consistiu de 5 cm² do terço médio da segunda folha abaixo da espiga, de três plantas por linha, que foram homogeneizadas para formar a amostra de cada parcela. A coleta das amostras de raiz consistiu da porção superior da raiz de três plantas por linha. As raízes foram lavadas em água corrente para remover a terra aderida, e homogeneizadas formando a amostra de cada parcela. Após a coleta as amostras foram identificadas e mantidas em ultrafreezer a -80ºC.

3.6.1. Extração de DNA

A extração de DNA das folhas e raízes foi realizada utilizando o *DNeasy ® Plant Mini Kit* (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante. A análise da integridade do DNA extraído foi feita através de eletroforese em gel de agarose 1%, com SYBR ® Safe (LIFE TECHNOLOGIES) 0,5 x, observado sob luz UV. A quantificação foi feita utilizando o espectofotômetro NanoDrop™ (NANODROP TECHNOLOGIES).

3.6.2. Quantificação do gene 16S rRNA de bactérias

As análises de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram realizadas para quantificar o gene 16S rRNA bacteriano nas amostras de raiz e folha, dos diferentes tratamentos. As reações foram realizadas no termociclador IQ5 (BIORAD), utilizando o sistema SYBR Green, em volume de 25 uL contendo 5 ng de DNA

total, 12.5 µL do *kit Platinum* ® *Quantitative PCR SuperMix-UDG* (INVITROGEN), e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo. Os *primers* utilizados foram o 534F (5' - CCA GCA GCC GCG GTA AT - 3') e o 783R (ACC MGG GTA TCT AAT CCK G) (RASTOGI et al., 2010). A reação consistiu de desnaturação inicial de 95ºC por 3 min, e 40 ciclos de 95ºC por 30 seg, 53ºC por 30 seg e 72ºC por 30 seg, com captação de fluorescência. Ao final foi feita uma curva de desnaturação, de 37 ciclos de 30 seg, com temperatura iniciando em 72ºC e aumentando 0,5ºC a cada ciclo e com captação de fluorescência ao final. As reações ocorreram com duplicata técnica para cada uma das repetições biológicas.

O número de cópias do gene nas amostras foi estimado utilizando curvas padrão geradas por diluições de um produto de PCR com os *primers* POF27F (5' – GAG AGT TTG ATC CTG GCT GAC – 3') e 1378R (5' – CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG – 3') (HEUER et al., 1997) utilizando DNA *de E. coli* como molde. O produto foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop, e então feito o cálculo do número de cópias do gene por µL do produto (STAROSCIK, 2004). A partir da estimativa do número de cópias, foram feita diluições seriadas do produto com 10^2 a 10^6 cópias, utilizadas na reação de qPCR em triplicata técnica. Com os dados do *log* do número de cópias de cada diluição da curva padrão e do respectivo C_T foi feito o cálculo da equação da reta, que serviu como base para o cálculo da quantidade de gene nas amostras. Os valores de C_T obtidos para cada amostra foram utilizados para determinar a quantidade absoluta da cópia gênica em cada amostra.

A comparação das médias dos dados gerados foi feita através do teste de Tukey ($p<0,05$), utilizando o *software* SAS, versão 9.2 (SAS INSTITUTE, 1999).

3.6.3. Identificação da comunidade microbiana através do sequenciamento do gene ribossomal 16S rRNA

A análise da estrutura da comunidade microbiana foi realizada acessando a região hipervariável V6 do gene codificador para o RNA funcional da subunidade 16S do ribossomo. Primeiramente as amostras de DNA extraído de folhas e raízes foram amplificadas com os *primers* 799F (5' – AAC MGG ATT AGA TAC CCK G – 3') e 1492R (5' – TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT – 3') (CHELIUS; TRIPLETT, 2001), que amplificam o DNA bacteriano evitando o DNA cloroplastidial. A reação, em volume de 50 µL, consistiu de 50 ng de DNA, 1 x de tampão, 2,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 µM de cada *primer*, 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 x de BSA, 2 U de *Platinum* ® *Taq DNA Polymerase* (INVITROGEN), e água ultrapura para completar o volume. Como controle positivo foi utilizado DNA de *E. coli*. Os produtos da reação foram aplicados em gel de agarose 1%, e submetidos à eletroforese de 4 V/cm por 90 minutos. Foram geradas duas bandas, uma maior correspondente ao 18S mitocondrial das plantas, e uma menor correspondente ao 16S bacteriano (Figura 2). A banda menor foi excisada do gel e purificada utilizando o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE HEALTHCARE). Após a purificação, este amplicon foi utilizado como *template* em uma nova reação, utilizando os *primers* 967F (5' – CGC CAA GAA GAA TAC CCT C – 3') e 1046R (5' – CGA CAG CCA TGC ANC ACC T – 3') (SOGIN et al., 2006) adicionados de adaptadores para sequenciamento pela plataforma *IonTorrent*. Além disso, o *primer* 967F recebeu marcações distintas de identificação compostas de cinco nucleotídeos para cada uma das amostras analisadas, chamadas *barcodes*. A reação de amplificação com estes *primers* ocorreu de maneira idêntica à realizada anteriormente.

Após a amplificação, as amostras foram purificadas com o kit *ChargeSwitch* ® *PCR Clean-UP Kit* (INVITROGEN), quantificadas utilizando o aparelho *Qubit* ® 2.0 *Fluorometer* (LIFE TECHNOLOGIES) e posteriormente enviadas para sequenciamento no *IonTorrent™ Personal Genome Machine* (LIFE TECHNOLOGIES),

realizado pela equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo.

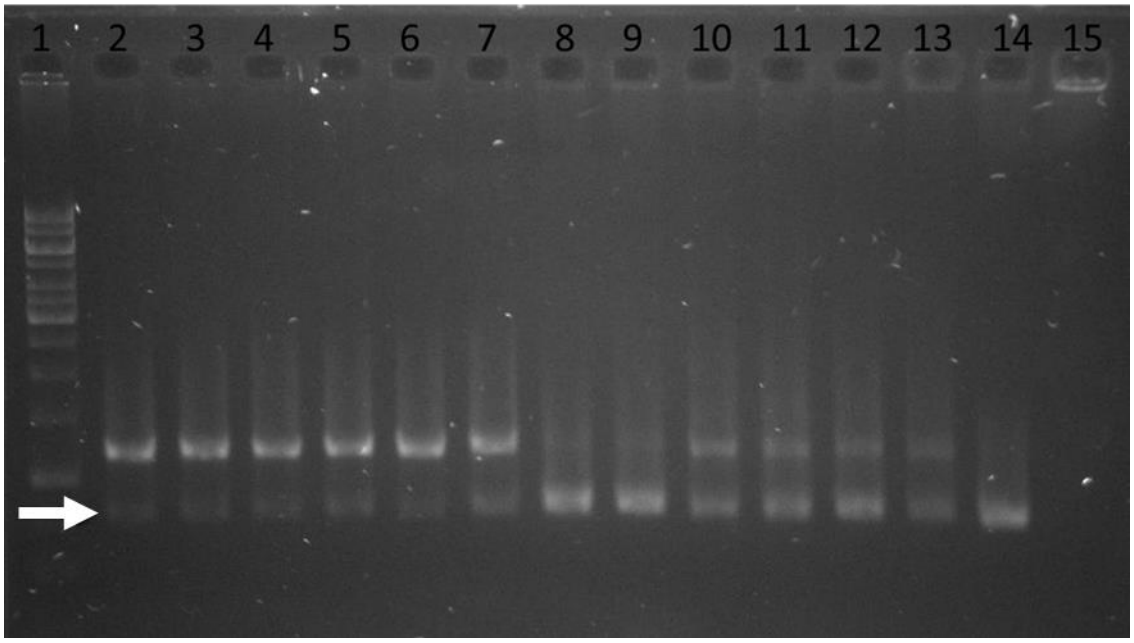

Figura 2. Gel de PCR utilizando os primers 799F e 1492R. 1- marcador molecular Ladder 1 Kb (0,2 μg.μL^{-1}) (FERMENTAS); de 2 a 7 – DNA extraído de folha dos tratamentos *i*, *ii*, *iii*, *iv*, *v* e *vi*, respectivamente; de 8 a 13 - DNA extraído de raiz dos tratamentos *i*, *ii*, *iii*, *iv*, *v* e *vi*, respectivamente; 14 – DNA de *E. coli*; 15 – amostra em branco. A seta indica a banda correspondente ao fragmento do 16S rRNA bacteriano, de aproximadamente 735 pb, que foi excisada para uso em sequenciamento.

3.6.4. Análise dos dados de sequenciamento

Inicialmente os *reads* obtidos foram analisados utilizando o *software CLC Genomics Workbench* (CLCBIO), onde as sequências de baixa qualidade foram deletadas. As sequências foram separadas por amostra, e então a remoção das sequências referentes aos adaptadores e *barcodes* foi realizada. Essas sequências foram utilizadas para a análise da estrutura da comunidade microbiana, utilizando o *software* QIIME – *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (CAPORASO et al., 2010). Primeiramente os *reads* foram agrupados em Unidades Taxonômicas Operacionais (UTO), considerando 97% de similaridade, então foi selecionada uma sequência representativa dentro de cada UTO, que foram alinhadas utilizando a ferramenta PyNAST, e feita a classificação taxonômica destas utilizando o método BLAST e o banco de dados *Greengenes* (DESANTIS et al., 2006). Através desta classificação foi possível obter os gráficos e tabelas de cada tratamento, e gerar o histograma que representa a distância entre as amostras. A quantidade de sequências foi normalizada de modo a equalizá-las entre as diferentes amostras. O número de UTO, e suas respectivas sequências, foram computados para o cálculo do índice de diversidade de Shannon e para a estimativa da riqueza de espécies através do índice de Chao1, e as médias comparadas através do teste de Tukey ($p<0,05$).

A ocorrência de variação na estrutura da comunidade bacteriana dos diferentes tratamento foi determinada através de análise de coordenadas principais (PCoA), medida através da distância relativa entre as amostras com base na heterogeneidade na estrutura destas. A significância da PCoA obtida foi calculada através da analise de variância permutacional multivariada (PERMANOVA) utilizando o índice de Bray-Curtis.

4. RESULTADOS

4.1. Teste de antibiose

Não foi observado efeito antagônico no crescimento das linhagens RZ2MS9 e Ab-v5 quando coinoculadas, mediante a ausência de halo de inibição (Figura 3A), indicando a possibilidade de uso dessas duas bactérias de forma conjunta em um inoculante. Como esperado no controle negativo todas as linhagens inoculadas e homogeneizadas no meio de cultura apresentaram crescimento (Figura 3B e C).

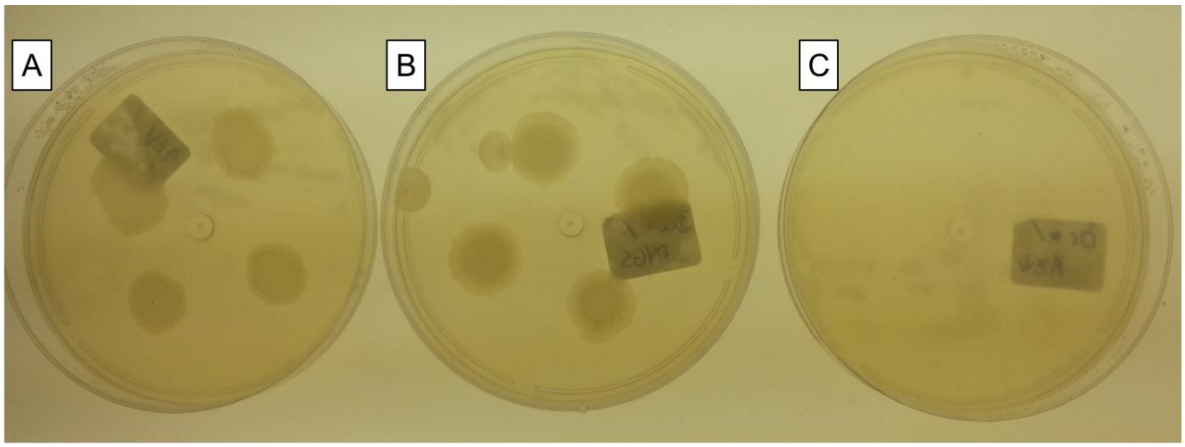

Figura 3. Teste de antibiose entre as linhagens RZ2MS9 e Ab-v5. Em (A) a linhagem RZ2MS9 inoculada sobre o meio contendo Ab-v5 em suspensão, onde foi possível observar o crescimento de ambas, portanto não havendo inibição. Os controles negativos são mostrados em: (B) RZ2MS9 aplicada em meio sem bactéria e (C) meio com Ab-v5 em suspensão.

4.2. Análise da promoção de crescimento

A altura da planta (AP), mediante inoculação com Ab-v5 e o consórcio entre RZ2MS9 e Ab-v5, apresentaram valores que foram significativamente superiores ao valor observado no tratamento controle, 1,53 m. Já as inoculações com RZ2MS16, com RZ2MS9 e a coinoculação de RZ2MS16 com Ab-v5 não apresentaram diferenças significativas comparadas ao controle (Figura 4A).

Quanto à altura até a inserção da espiga (AE), não houve diferença significativa quando os tratamentos foram defrontados com o controle, porém a AE das plantas inoculadas com o consórcio de RZ2MS9 e Ab-v5 foi significativamente superior aos tratamentos RZ2MS16, RZ2MS16 + Ab-v5, e Ab-v5 (Figura 4B).

Analisando o diâmetro do colmo (DC) o tratamento RZ2MS9 + Ab-v5 foi o único a diferir significativamente do controle. Os tratamentos RZ2MS16, Ab-v5 e RZ2MS9 apresentaram ligeiro aumento em relação ao controle, porém não estatisticamente significativo (Figura 4C).

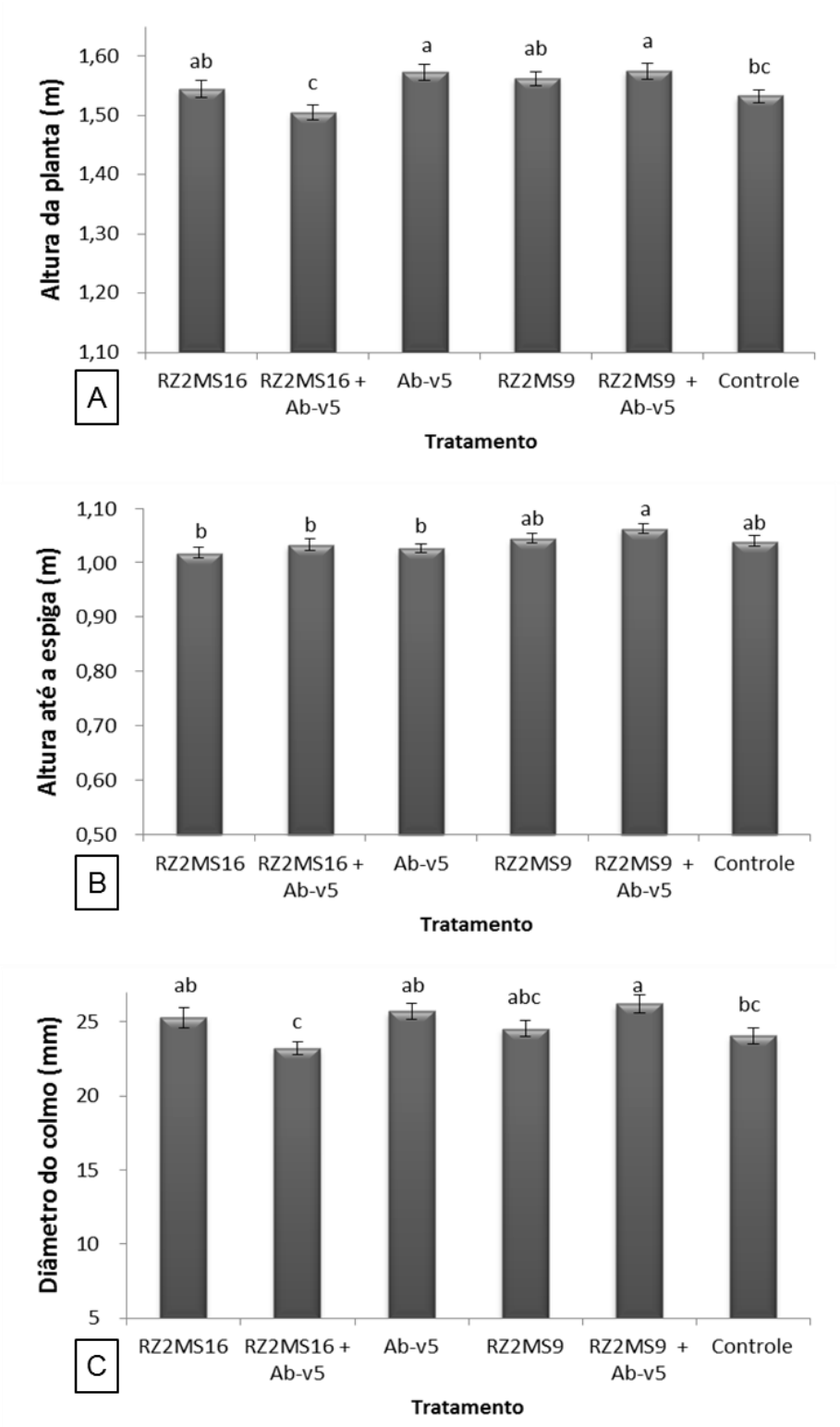

Figura 4. Efeito da inoculação bacteriana na promoção de crescimento de milho. As bactérias inoculadas foram: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. Os caracteres avaliados foram altura da planta (A), altura até a inserção da espiga (B), e diâmetro do colmo (C). Os valores indicam a média de cinco parcelas, e a barra o erro padrão entre elas. Médias com letras diferentes diferem segundo o teste de Duncan ($p<0,05$).

4.3. Efeito da inoculação na comunidade bacteriana associada ao milho

Através da qPCR foi realizada a quantificação da comunidade bacteriana associada à raiz e folha de milho mediante diferentes inoculantes. O valor médio de eficiência da amplificação (E) foi de 0,85 e a regressão logarítmica obtida na curva padrão foi sempre superior a 0,99.

A inoculação das BPCP não alterou a densidade microbiana em nenhum dos tecidos (Figura 5). Quando comparados os dois tecidos, independente da inoculação, observa-se diferença entre eles, observa-se que a raiz (0,82) possui maior quantidade de cópias gênicas bacterianas do que a folha (0,73), valor significativo considerando o teste de Tukey ao nível de 5% de significância (Tabela 2).

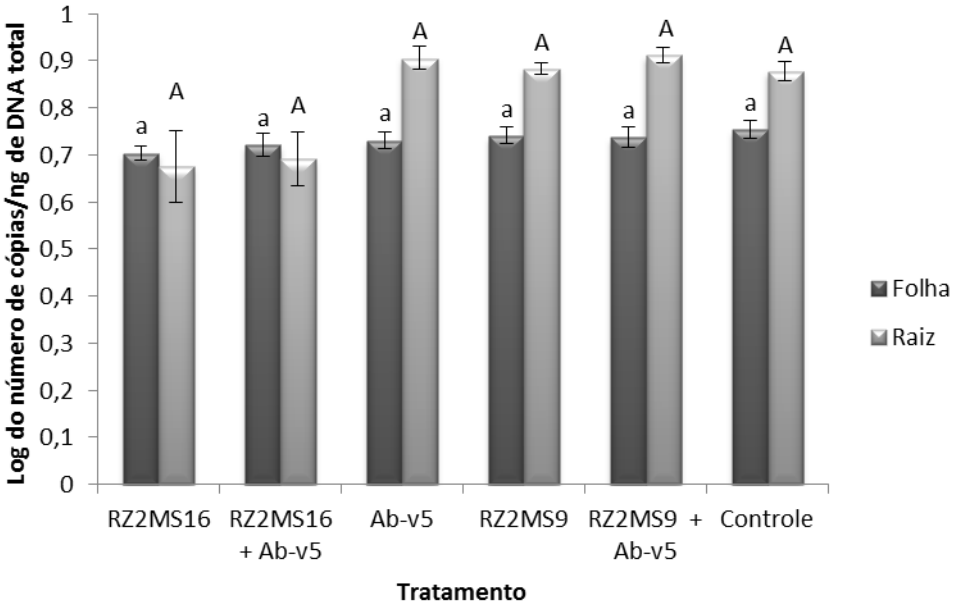

Figura 5. Densidade da comunidade bacteriana associada à folha e à raiz de plantas de milho inoculadas com diferentes linhagens de bactérias promotoras de crescimento: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. Os valores indicam a média, em Log_{10}, de cinco repetições biológicas e duas repetições técnicas, e as barras indicam o erro padrão entre as repetições. Médias com letras diferentes diferem segundo o teste de Tukey ($p<0,05$).

Tabela 2. Densidade da comunidade microbiana, obtida através de qPCR, estimativa de riqueza de UTO e índice de diversidade, obtidos através da análise de sequências, considerando raiz e folha de milho, independente de inoculação. Médias com letras diferentes diferem segundo o teste de Tukey ($p<0,05$).

Nicho	Log do nº de cópias/ng de DNA total	Estimativa de riqueza de UTO	Índice de Diversidade
		Chao1	Shannon (H')
Folha	0,73 (± 0,02) B	2121,90 (± 66,55) B	4,85 (± 0,12) B
Raiz	0,82 (± 0,04) A	4004,48 (± 154,59) A	6,64 (± 0,20) A

Além disso, a riqueza e a diversidade das comunidades microbianas de cada amostra foram calculadas a partir dos *reads* gerados pelo sequenciamento. A inoculação não produziu diferença significativa nestas duas variáveis, em nenhum dos tecidos (Tabela 3). Comparando a comunidade microbiana dos diferentes nichos, independente de

inoculação, percebe-se que a raiz possui maiores médias de riqueza (4004,5) e diversidade (6,64) que a folha (2121,9 e 4,85, respectivamente), considerando o teste de Tukey ($p<0,05$) (Tabela 2).

Tabela 3. Estimativa de riqueza de UTO e índice de diversidade de amostras de folha e raiz de plantas de milho inoculadas com as linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5. Estes índices foram calculados a partir da análise de sequências geradas pela plataforma *Ion Torrent* no *software* QIIME.

Nicho	Tratamento	Estimativa de riqueza de UTO	Índice de Diversidade	ICE(%)[a]
		Chao1	Shannon (H')	
Folha	RZ2MS16	2024,45 (± 183,49)	4,49 (± 0,37)	91,00
	RZ2MS16 + Ab-v5	2252,23 (± 182,85)	5,13 (± 0,34)	90,22
	Ab-v5	1973,71 (± 214,90)	4,76 (± 0,27)	91,19
	RZ2MS9	2291,90 (± 278,81)	5,28 (± 0,21)	89,78
	RZ2MS9 + Ab-v5	2123,57 (± 131,91)	4,85 (± 0,37)	90,73
	Controle	2099,54 (± 141,64)	4,70 (± 0,33)	91,18
Raiz	RZ2MS16	3564,72 (± 758,51)	6,00 (± 1,06)	84,38
	RZ2MS16 + Ab-v5	3599,37 (± 398,47)	6,48 (± 0,44)	83,75
	Ab-v5	4150,22 (± 255,18)	7,31 (± 0,28)	81,05
	RZ2MS9	4551,35 (± 368,00)	6,81 (± 0,28)	81,25
	RZ2MS9 + Ab-v5	3920,52 (± 199,74)	6,74 (± 0,55)	82,91
	Controle	4240,70 (± 224,06)	6,52 (± 0,34)	82,54

[a]Índice de cobertura estimada

4.4. Análise taxonômica dos grupos de bactéria

A classificação taxonômica das sequências de 16S rRNA bacteriano foi realizada a partir do sequenciamento de larga escala utilizando a plataforma *Ion Torrent*. Foi gerado um total de 1.868.374 *reads*, dos quais 1.448.574 se mostraram com alta qualidade, após processo de limpeza. Após processo de rarificação, foram consideradas 5280 sequências por amostra, que foram distribuídas em uma média de 980 UTO por amostra (mínimo de 523 e máximo de 1632), hospedando sequências com similaridade mínima de 97%. Apesar de as amostras terem sido extraídas de tecidos vegetais, não houve contaminação por sequências cloroplastidiais.

4.4.1. Comparação entre os diferentes tecidos vegetais

Primeiramente foram comparadas as comunidades bacterianas associadas aos dois tecidos em estudo, independente do tratamento de inoculação. A PCoA construída com base na beta diversidade mostrou agrupamento das amostras associadas a cada nicho e separação entre elas, demonstrando que existe diferença nas estruturas das comunidades bacterianas associadas a cada um dos tecidos, indicado a distribuição dos perfis de acordo com o nicho analisado (Figura 6). A análise realizada explica 80,97% da variação entre os nichos, explicando 53,67, 23,21 e 4,09% nas PC1, PC2 e PC3, respectivamente. A análise de PERMANOVA mostra que a diferença observada é significativa a $p = 0,001$.

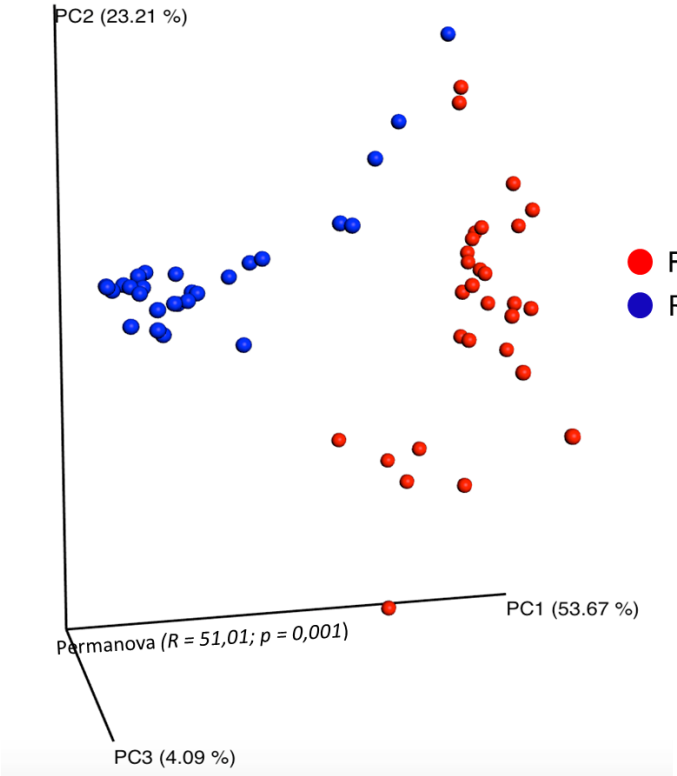

Figura 6. Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfil de UTOs para os dois nichos analisados: folha e raiz, gerada pelo *software* QIIME. Observa-se variação da distribuição das UTOs, com os eixos (coordenadas principais) explicando 80,97%. A análise de PERMANOVA foi significativa, com p = 0,001.

Ao nível de classes, observa-se nas raízes maior abundância de *Betaproteobacterias, Gammaproteobacteria, Actinobacteria* e *Alphaproteobacteria*, com participação de 54,01, 24,75, 4,24, e 3,41%, respectivamente. Já nas amostras de folhas, observa-se maior abundância das classes *Gammaproteobacteria, Actinobacteria, Cytophagia* e *Alphaproteobacteria,* com participação de 50,85, 18,96, 10,91 e 9,60%, respectivamente. Quando comparado os diferentes nichos nota-se que a folha apresentou redução na abundância de *Betaproteobactéria* (de 54,01% para 1,00%), *Deltaproteobacteria* (de 0,67% para 0,05%), *Sphingobacteria* (de 0,82% para 0,23%), *Thermoleophilia* (de 0,30% para 0,04%), e *Bacilli* (1,69% para 0,37%), enquanto que a abundância dos filos *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cytophagia* (de 1,69% para 10,91%) e *Alphaproteobacteria* foram enriquecidos (Figura 7).

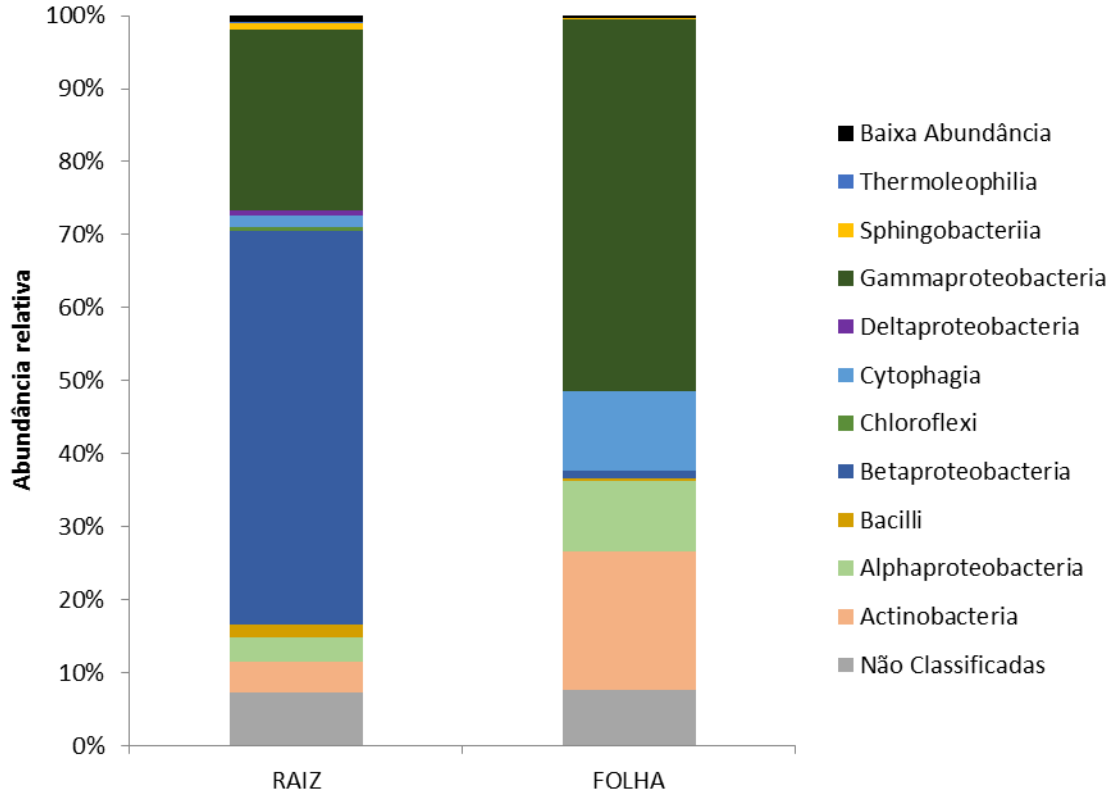

Figura 7. Perfil de abundância relativa de classes bacterianas em tecidos de folha e raiz de milho. O gráfico foi construído no *software* Microsoft Excel® a partir da abundância de cada classe, obtida através do *software* QIIME a partir de dados de UTO normalizados. Classes com abundância menor que 0,15%, considerando os dois nichos, foram agrupadas.

4.4.2. Impacto da inoculação de BPCP na estrutura da comunidade microbiana associada à raiz

Quando analisado o efeito da inoculação das BPCP na estrutura da comunidade microbiana associada à raiz das plantas de milho percebe-se que não houve diferenças significativas, já que não foi observada separação clara dos tratamentos no gráfico de PCoA (Figura 8), e devido ao alto valor de PERMANOVA ($p = 0,545$). A distribuição de classes bacterianas sugere que a inoculação de RZ2MS16 e a coinoculação de RZ2MS16 com Ab-v5 foram os tratamentos que mostraram maior diferença na estrutura da comunidade bacteriana associada à raiz quando comparados ao tratamento controle, enquanto que os outros tratamentos mostraram diferenças mais sutis (Figura 9). O tratamento controle apresentou as seguintes participações de cada um das classes na composição da comunidade bacteriana: *Betaproteobacteria* (68,70%), *Gammaproteobacteria* (13,04%), *Actinobacteria* (2,82%), *Alphaproteobacteria* (2,61%), *Cytophagia* (1,57%) e *Bacilli* (1,12%). Quando comparado ao controle, o tratamento RZ2MS16 mostrou maior abundância de *Gammaproteobacteria* (47,72%) e *Actinobacteria* (6,18%), enquanto que apresentou menor abundância da classe *Betaproteobacteria* (31,25%). A coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5 mostrou maior abundância de *Gammaproteobacteria* (40,90%) e *Actinobacteria* (5,62%), e menor abundância de *Betaproteobacteria* (37,81%). Os demais tratamentos mostraram leves diferenças em relação ao controle. A inoculação de Ab-v5 apresentou leve aumento na abundância de *Alphaproteobacteria* (4,38%) e *Actinobacteria* (3,70%), e leve redução de *Betaproteobacteria* (61,55%). A inoculação com RZ2MS9 apresentou aumento na abundância de *Alphaproteobacteria* (3,92%), *Actinobacteria* (3,63%), *Cytophagia* (2,38%) e *Bacilli* (2,31%), e uma leve redução de *Betaproteobacteria* (62,05%). A coinoculação de RZ2MS9 e

Ab-v5 causou um leve aumento na abundância de *Gammaproteobacteria* (16,77%), *Actinobacteria* (3,49%) e *Alphaproteobacteria* (3,08%), e redução de *Betaproteobacteria* (62,87%).

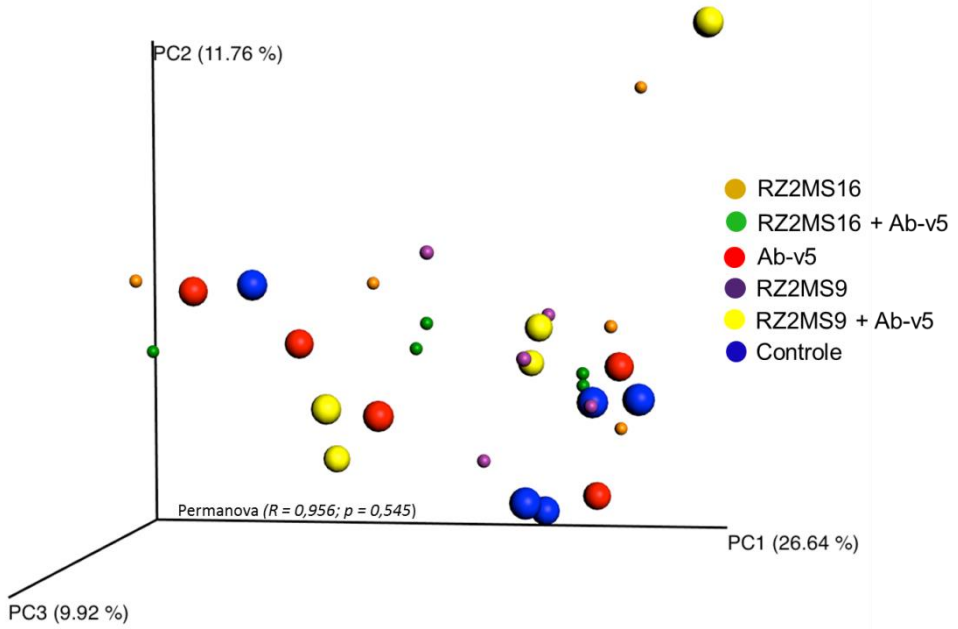

Figura 8. Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfil de UTOs na raiz, mediante a inoculação de diferentes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. A PCoA foi gerada pelo *software* QIIME. Não foi observada variação significativa da distribuição das UTOs, com análise de PERMANOVA de p = 0,545.

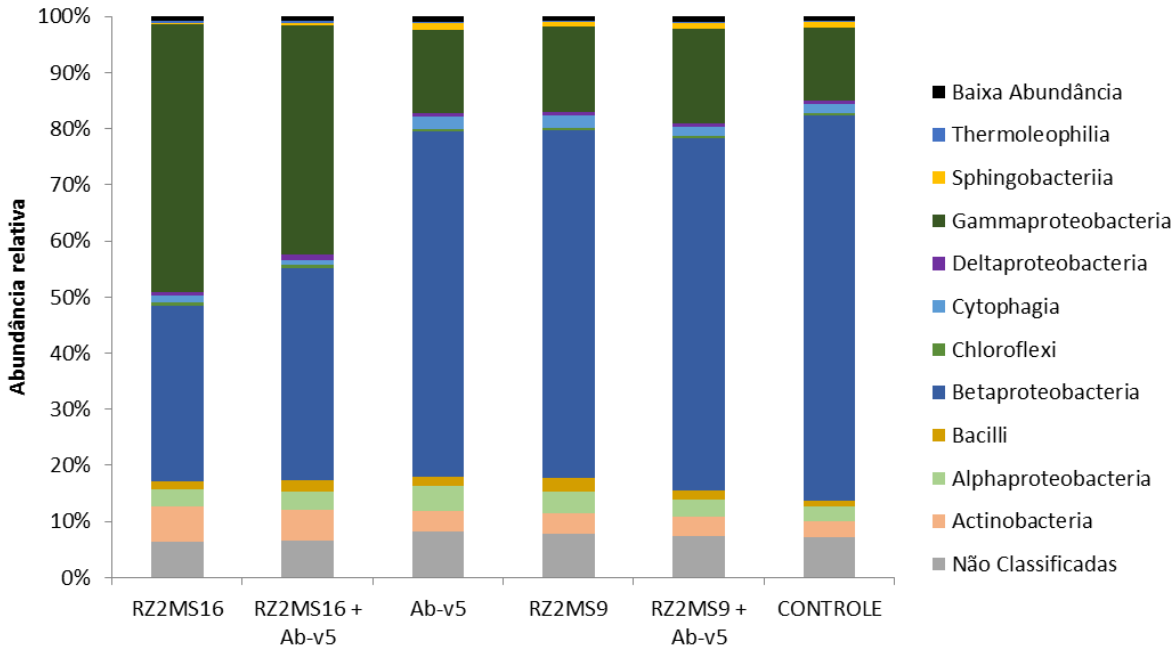

Figura 9. Perfil da abundância relativa de classes bacterianas associadas à raiz, mediante a inoculação de diferentes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. O gráfico foi construído no *software* Microsoft Excel® a partir da abundância de cada classe, obtida através do *software* QIIME a partir de dados de UTO normalizados. Classes com abundância menor que 0,25%, considerando todos os tratamentos, foram agrupadas.

4.4.3. Impacto da inoculação de BPCP na estrutura da comunidade microbiana associada à folha

Pela análise de PCoA, observa-se que a inoculação de BPCP foi capaz de modular a estrutura da comunidade microbiana associada à folha, principalmente o tratamento RZ2MS9 + Ab-v5, que apresentou menor sobreposição com os outros tratamentos. A análise realizada explica 39,51% da variação entre os tratamentos, com 16,15, 12,35 e 11,01% nas PC1, PC2 e PC3, respectivamente, e a análise de PERMANOVA mostra que a diferença observada é significativa a p = 0,025 (Figura 10).

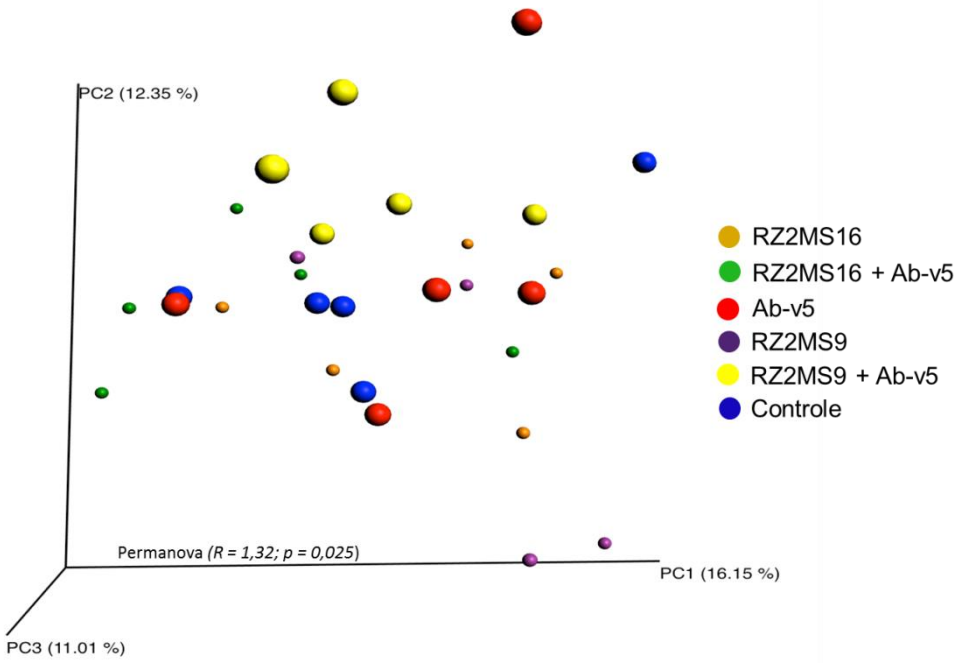

Figura 10 – Análise de coordenadas principais (PCoA) do perfil de UTOs na folha, mediante a inoculação de diferentes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. A PCoA foi gerada pelo *software* QIIME. Observa-se variação da distribuição das UTOs, com os eixos (coordenadas principais) explicando 39,51%. A análise de PERMANOVA foi significativa, com p = 0,025.

Mediante a distribuição de classes bacterianas, percebe-se que a inoculação com RZ2MS16 foi o tratamento que apresentou maior diferença na estrutura da comunidade bacteriana associada à folha quando comparado ao controle, enquanto que os outros tratamentos mostraram diferenças mais sutis (Figura 11). O tratamento controle apresentou as seguintes participações de cada um das classes na composição da comunidade bacteriana: *Gammaproteobacteria* (48,20%), *Actinobacteria* (20,40%), *Cytophagia* (13,02%), *Alphaproteobacteria* (9,47%), *Sphingobacteria* (0,19%) e *Bacilli* (0,04%). Quando comparado ao controle, o tratamento RZ2MS16 mostrou maior abundância de *Gammaproteobacteria* (62,07%) e *Bacilli* (0,39%), e menor abundância das classes *Actinobacteria* (31,25%) e *Cytophagia* (5,89%). A coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5 mostrou maior abundância de *Alphaproteobacteria* (12,82%) e *Bacilli* (0,27%) e menor abundância de *Cytophagia* (8,76%). A inoculação de Ab-v5 apresentou aumento na abundância de *Bacilli* (0,29%) e leve redução de *Cytophagia* (10,85%). A inoculação com RZ2MS9 apresentou aumento na abundância de *Alphaproteobacteria* (11,19%) e *Bacilli* (0,67%), e uma leve redução de *Gammaproteobacteria* (43,38%). A

coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5 causou aumento na abundância de *Sphingobacteria* (0,70%) e *Bacilli* (0,56%), e redução de *Alphaproteobacteria* (5,85%).

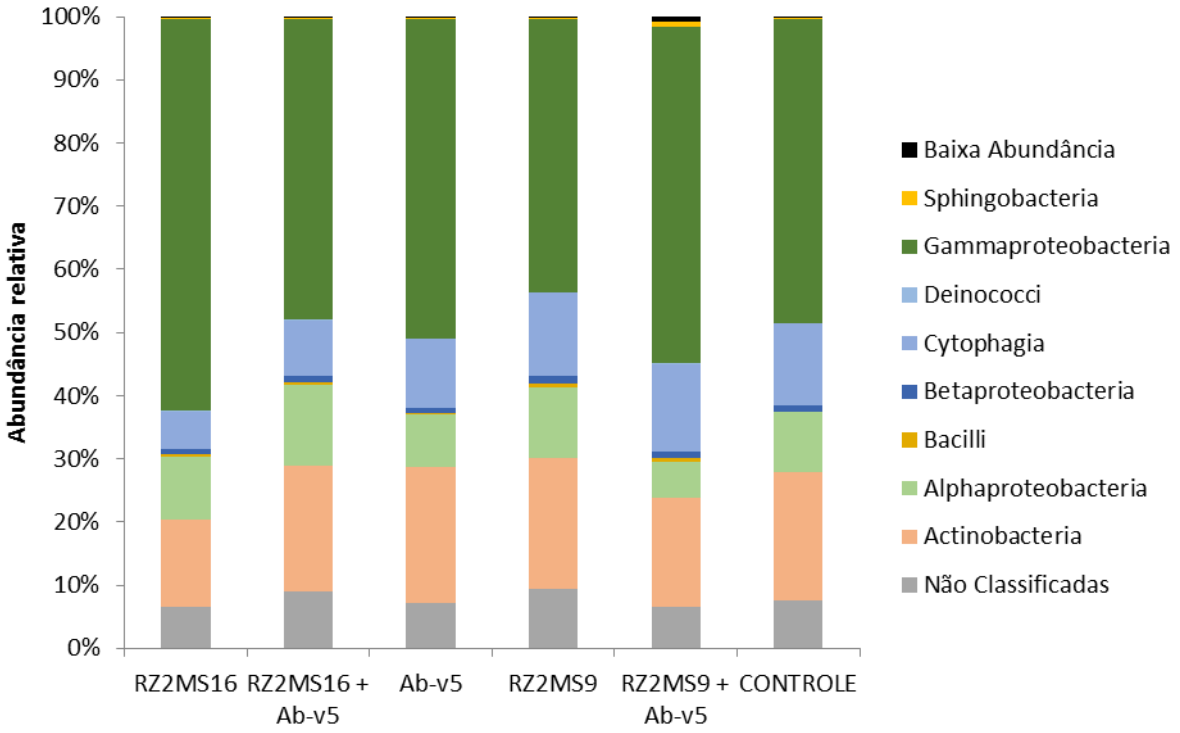

Figura 11. Perfil da abundância relativa de classes bacterianas associadas à folha, mediante a inoculação de diferentes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. O gráfico foi construído no *software* Microsoft Excel® a partir da abundância de cada classe, obtida através do *software* QIIME a partir de dados de UTO normalizados. Classes com abundância menor que 0,20%, considerando todos os tratamentos, foram agrupadas.

Ao nível de famílias, a comunidade bacteriana da folha do tratamento controle apresentou maior abundância de *Pseudomonadaceae* (53,42%), *Microbacteriaceae* (23,02%), *Aurantimonadaceae* (8,07%), *Sphingomonadaceae* (1,43%), *Methylobacteriaceae* (1,28%), *Xanthomonadaceae* (1,14%), *Kineosporiaceae* (0,65%) e *Comamonadaceae* (0,54%), além de outras famílias com abundância relativa menor que 0,50%. Todos os tratamentos de inoculação apresentaram alguma diferença na estrutura quando comparados ao controle. A inoculação com RZ2MS16 apresentou aumento na abundância das famílias *Pseudomonadaceae* (65,61%) e *Kineosporiaceae* (2,15%), enquanto que houve redução nas famílias *Microbacteriaceae* (12,42%), *Methylobacteriaceae* (0,46%), *Xanthomonadaceae* (0,14%) e *Sphingobacteriaceae* (0,09% contra 0,23% no tratamento controle). A coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5 apresentou aumento em *Aurantimonadaceae* (10,72%), *Kineosporiaceae* (2,55%) e *Paenibacillus* (0,12% contra 0,00% no tratamento controle), e redução em *Xanthomonadaceae* (0,35%) e *Rhizobiaceae* (0,07% contra 0,13% no tratamento controle). O tratamento Ab-v5 apresentou maior abundância da família *Kineosporiaceae* (1,68%) enquanto que as famílias *Methylobacteriaceae* (0,43%) e *Xanthomonadaceae* (0,16%) apresentaram redução. O tratamento RZ2MS9 apresentou maior abundância das famílias *Sphingomonadaceae* (2,54%), *Kineosporiaceae* (1,37%), *Acetobacteraceae* (2,59% contra 0,04% no tratamento controle), *Neisseriaceae* (0,46% contra 0,02%), *Beutenbergiaceae* (0,31% contra 0,01%) e *Paenibacillus* (0,56% contra 0,00%), enquanto que houve redução na abundância de *Xanthomonadaceae* (0,16%). A coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5 apresentou aumento na abundância das famílias *Pseudomonadaceae* (61,63%), *Kineosporiaceae* (3,35%), *Sphingobacteriaceae* (0,82%), *Beutenbergiaceae* (0,58%) e *Leuconostocaceae* (0,39% contra 0,00%), enquanto que as famílias *Microbacteriaceae*

(16,13%), *Aurantimonadaceae* (5,17%), *Sphingomonadaceae* (0,98%), *Methylobacteriaceae* (0,41%) e *Xanthomonadaceae* (0,17%) apresentaram redução (Figura 12).

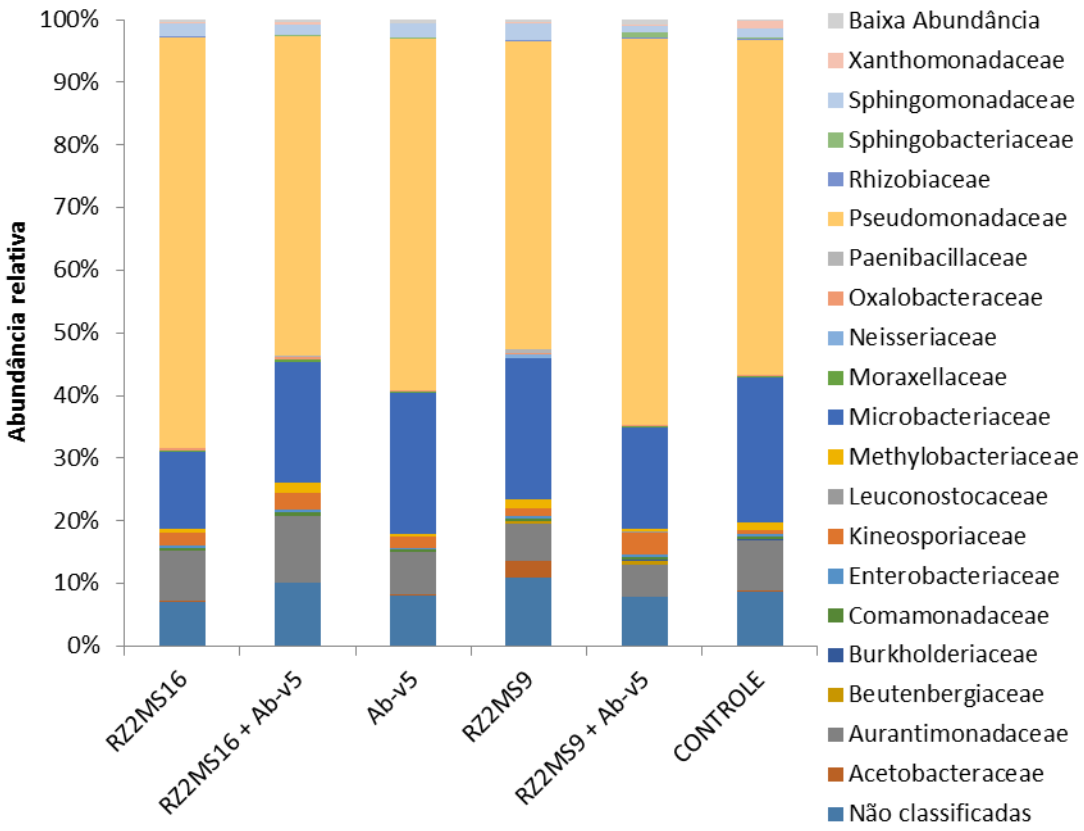

Figura 12. Perfil da abundância relativa de famílias bacterianas associadas à folha, mediante a inoculação de diferentes linhagens de BPCP: RZ2MS16; coinoculação de RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5; e tratamento controle. O gráfico foi construído no *software* Microsoft Excel® a partir da abundância de cada classe, obtida através do *software* QIIME a partir de dados de UTO normalizados. Famílias com abundância menor que 0,15%, considerando todos os tratamentos, foram agrupadas.

5. DISCUSSÃO

No atual cenário de preocupação com a sustentabilidade da atividade de produção agrícola, têm sido realizados esforços na pesquisa por soluções biotecnológicas que possam reduzir o consumo de insumos químicos como fertilizantes e defensivos, reduzindo possíveis danos ambientais e socioeconômicos. As bactérias promotoras de crescimento de plantas surgem como potenciais soluções, devido à capacidade em estimular o crescimento das plantas, aumentar a disponibilidade de nutrientes no solo e em controlar potenciais organismos patogênicos (BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012; BHATTACHARYYA; JHA, 2012; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010; DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; KLOEPPER; SCHROTH, 1981). Gêneros como *Azospirillum*, *Bacillus* e *Burkholderia* estão frequentemente associados à promoção do crescimento de suas plantas hospedeiras, através da habilidade de colonizar a rizosfera de diversos tipos de culturas, e atuação como fixadores de nitrogênio, solubilizadores de fosfato, produtores de fitohormônios e controle de patógenos (BAIS; FALL; VIVANCO, 2004; DOBBELAERE et al., 2002; ESTRADA-DE LOS SANTOS; BUSTILLOS-CRISTALES; CABALLERO-MELLADO, 2001; KUREPIN et al., 2015; MCSPADDEN GARDENER, 2004; MEHNAZ, 2015; OKON; HEYTLER; HARDY, 1983; ONOFRE-LEMUS et al., 2009; ORTÍZ-CASTRO; VALENCIA-CANTERO; LÓPEZ-BUCIO, 2008; RODRIGUEZ et al., 2004; SESHADRI et al., 2000).

No presente trabalho, primeiramente, foi determinado, através de ensaio de antibiose, a compatibilidade entre as linhagens RZ2MS9 e Ab-v5, possibilitando a inoculação dessas bactérias de forma consorciada nas sementes. Quando no desenvolvimento de um inoculante composto por mais de uma linhagem bacteriana é essencial que haja compatibilidade entre as bactérias que constituem sua formulação, de modo que uma não influencie negativamente no crescimento da outra e assim ocorra a resposta esperada pela inoculação (JESUS, 2013). Tschoeke (2016), através de ensaio de antibiose, observou compatibilidade da linhagem RZ2MS16 com as linhagens de *A. brasilense* Ab-v5 e Ab-v6, além de outras duas linhagens de *B. japonicum*.

Procedeu-se então com o ensaio de promoção de crescimento, e foi observado que a inoculação de sementes com a linhagem Ab-v5 causou incremento na altura de plantas de milho em condições de campo, e a coinoculação de Ab-v5 com a linhagem RZ2MS9, além do incremento em altura, promoveu aumento no diâmetro das plantas. Muitos trabalhos têm relatado incrementos em altura e massa seca de plantas inoculadas com linhagens pertencentes a estes gêneros. Dobbelaere et al. (2002) observaram estímulo no desenvolvimento da raiz e da parte aérea de plantas de trigo inoculadas com *A. brasilense*, e de plantas de milho inoculadas com *A. irakense*, principalmente no estágio inicial de desenvolvimento das plantas. Saubidet, Fatta e Barneix (2002) observaram o aumento na biomassa da parte aérea de plantas de milho inoculadas com *A. brasilense*. Hungria et al. (2010) observaram incrementos entre 9 e 18% na produtividade de trigo e entre 16 e 30% em milho inoculados com diferentes linhagens de *A. brasilense* em condições de campo. Hafeez et al. (2006) observaram aumento na biomassa e comprimento de raiz de plantas de trigo inoculadas com *Bacillus pumilus*. Adesemoye, Torbert e Kloepper (2009) obtiveram incremento de altura, produção e biomassa seca de tomate inoculado com *Bacillus* spp. Esses trabalhos corroboram com os dados obtidos no presente estudo, onde foi observado incremento de 3% na altura do milho, quando inoculado com Ab-v5, e de 3% na altura e 9% no diâmetro do colmo, quando as linhagens RZ2MS9 e Ab-v5 foram coinoculadas, o que deve refletir, provavelmente, em uma maior produção de grãos.

O gênero *Burkholderia* também é apontado como capaz de promover o crescimento de milho (SINGH; MALIK; SINGH, 2013; YOUNG et al., 2013). Embora não tenha sido observada promoção de crescimento nos tratamentos onde foi utilizada a *B. ambifaria* RZ2MS16, essa linhagem foi capaz de promover o aumento de biomassa

de plantas de milho e soja em experimentos anteriores (BATISTA, 2013; TSCHOEKE, 2016). A dificuldade em se estudar BPCP está na reprodutibilidade de resultados e na influência de vários fatores como as condições ambientais e o genótipo da planta hospedeira na resposta da planta à inoculação (BHATTACHARYYA; JHA, 2012). Este foi o primeiro experimento em nível de campo utilizando as linhagens RZ2MS9 e RZ2MS16, e por se tratar de um estudo em estado inicial outros testes devem ser feitos para aperfeiçoar o processo de inoculação, a fim de se obter resultados mais consistentes.

Interessantemente, foi observado que a coinoculação das linhagens RZ2MS9 e Ab-v5 produziu melhores resultados que a inoculação individual das mesmas. Em leguminosas já foi descrita a interação sinérgica entre *Bradyrhizobium* ou *Rhizobium* quando coinoculados com linhagens de BPCP. Molla et al. (2001) observaram que a coinoculação de *Bradyrhizobium* e *Azospirillum* em sementes de soja foi capaz de estimular o desenvolvimento da raiz e a nodulação, Hungria, Nogueira e Araujo (2015) observaram aumento na produção de sementes em soja inoculadas com estes mesmos gêneros bacterianos. A inoculação de feijão com *Rhizobium* e *Paenibacillus* aumentou a eficiência da fixação de nitrogênio pela planta, além de estimular a nodulação (FIGUEIREDO et al., 2008). Como as BPCP tem a capacidade de estimular o desenvolvimento de raízes laterais, ocorre aumento do número de potenciais locais para infecção por *Rhizobium*, e como resultado mais nódulos são desenvolvidos (ANDREEVA; REDKINA; IZMAILOV, 1993).

Em plantas não-leguminosas a coinoculação de BPCP também tem mostrado resultados positivos. Saber, Pirdashti e Esmaeili (2012) utilizando uma combinação de inoculantes comerciais com características de FBN (*B. subtilis*, *P. fluorecens* e *Azospirillum* spp.) e solubilização de fosfato (*B. lentus* e *P. putida*) em milho, obteve maior número de grão por espiga, número de perfilhos e comprimento da raiz, quando comparada à inoculação de apenas um dos inoculantes. Cassan et al. (2009) observaram que a coinoculação de *A. brasilense* e *B. japonicum* em milho foi responsável por aumento do comprimento e massa seca da parte aérea, e aumento da massa seca da raiz quando comparada a inoculação de apenas uma das linhagens ou ausência de inoculação. Espera-se, em etapa posterior a este projeto, avaliar a produção de grãos da cultura mediante a inoculação das linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho: RZ2MS16; consórcio entre RZ2MS16 e Ab-v5; Ab-v5; RZ2MS9; e consórcio entre RZ2MS9 e Ab-v5.

A promoção de crescimento causado pela coinoculação de diferentes bactérias pode estar relacionada à diversidade de mecanismos que possa ocorrer, realizado pelas diferentes bactérias. A linhagem *A. brasilense* Ab-v5 é descrita como FBN, e produtora de AIA (HUNGRIA et al., 2010), enquanto que a linhagem *Bacillus* sp. RZ2MS9 é descrita como produtora de AIA, solubilizadora de fosfato e produtora de sideróforos (BATISTA, 2013). Outro fator que pode estar relacionado à promoção de crescimento é a alteração do microbioma da planta, causada pela adição de linhagens bacterianas exógenas na cultura, que podem promover a alteração do ambiente diretamente, através de suas atividades metabólicas, ou indiretamente, influenciando nos compostos liberados pelas plantas hospedeiras, assim favorecendo o desenvolvimento de determinadas espécies bacterianas em detrimento a outras (CASTRO-SOWINSKI et al., 2007). O microbioma possui grande influência em fatores ligados ao crescimento e desenvolvimento das plantas, e também na manutenção de sua sanidade (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013).

Através do sequenciamento do fragmento 16S rRNA do DNA extraído das raízes e folhas de plantas de milho, foi realizada a análise da estrutura da comunidade microbiana associada a estes nichos, e constatado diferenças estruturais entre elas. Primeiramente a riqueza, diversidade e abundância de espécies associadas à raiz foram significativamente maiores quando comparado com a comunidade associada à folha. O ambiente associado à raiz, compreendendo a endosfera, camada epifítica e solo rizosférico, é rico em nutrientes, contendo uma variedade de

compostos orgânicos exsudados pela planta, que atuam como fonte de carboidratos e nitrogênio para a microbiota associada (WALKER et al., 2003). Além disso, possui maior estabilidade, estando sujeito a menor variação do ambiente, assim favorecendo o crescimento e a variedade bacteriana neste nicho, o que explica a maior diversidade e abundância encontrada (TURNER; JAMES; POOLE, 2013). Por outro lado, o ambiente filosférico, compreendendo superfície foliar e camada endofítica, é pobre em nutrientes, geralmente contendo aminoácidos e açúcares mais simples, além de ser mais dinâmico, envolvendo grandes mudanças de temperatura, umidade e radiação através do dia, o que limita o desenvolvimento da comunidade bacteriana (VORHOLT, 2012). A abundância e diversidade endofítica é geralmente menor na filosfera quando comparada à raiz (MONTEIRO et al., 2012), o que vai ao encontro de nosso resultado.

Quando analisada a comunidade bacteriana associada à raiz, foi observada maior abundância do filo *Proteobacteria*, em grande parte representada pelas classes *Beta-, Gamma-* e *Alphaproteobacteria*, uma pequena participação das classes *Actinobacteria*, *Cytophagia* e *Bacilli*, além de outras classes com menor participação. O filo *Proteobacteria* geralmente apresenta domínio sobre este nicho, principalmente as classes *Alfa-* e *Beta-*, devido a assimilar de maneira mais eficiente os exsudatos e por apresentar crescimento acelerado (PHILIPPOT et al., 2013), além disso, outros estudos semelhantes em diferentes culturas notaram o enriquecimento deste filo associado a este nicho. Li et al (2014) analisando dados de sequência de solo rizosférico de milho, encontraram maior abundância de *Proteobacteria*, em especial a classe *Beta-* que correspondeu a 25,27% do total de sequências, além de participação das classes *Actinobacteria* e *Sphingobacteria* na composição. Sun et al. (2008) notaram maior abundância de *Beta-*, *Gamma-* e *Alphaproteobacteria* em raiz de arroz, representando 27,08, 25,00 e 12,49% das sequências identificadas. Knief et al. (2012) analisando a rizosfera de arroz encontraram maior abundância das classes *Alfa-*, *Beta-* e *Deltaproteobacteria*, representando 14,0, 16,6 e 10,6% das sequências, respectivamente, além destas, as classes *Actinobacteria*, com 8,5%, e *Chloroflexi*, com 4,6%, também tiveram representação. Bodenhausen, Horton e Bergelson (2013) analisando a comunidade bacteriana associada à raiz de arabidopsis, notaram grande abundância de *Actinobacteria*, seguida por *Proteobacteria* e *Bacteriodetes*.

A folha apresentou diferença na composição de sua comunidade microbiana quando comparada à raiz. Embora tenha também apresentado domínio do filo *Proteobacteria*, houve divergência na abundância de cada classe quando comparado à rizosfera, com *Gammaproteobacteria* apresentando maior abundância, seguida de *Alphaproteobacteria*, e *Betaproteobacteria* tendo uma pequena participação. Também foi notado o enriquecimento das classes *Actinobacteria* e *Cytophagia*. Os filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroidetes* geralmente dominam o ambiente endofítico das plantas, se apresentando como os filos mais abundantes tanto na rizosfera quanto na filosfera (PEIFFER et al., 2013; SHAKYA et al., 2013; UROZ et al., 2010). A abundância de *Gammaproteobacteria* na folha está diretamente relacionada com o grande número de sequências da família *Pseudomonadaceae*, que geralmente são enriquecidas na camada epifítica desse tecido (BODENHAUSEN; HORTON; BERGELSON, 2013).

Outros estudos também têm reportado o predomínio do filo *Proteobacteria* em folhas. Lopez-Velasco et al. (2013) notaram predomínio de *Proteobacteria* associada à folha de espinafre, principalmente da classe *Gamma-*. Romero, Marina e Pieckenstain (2014) reportaram predomínio de *Proteobacteria* em folhas de tomate, principalmente a classe *Gamma-* e em menor parte a classe *Alpha-*. Bodenhausen, Horton e Bergelson (2013) observaram predomínio de *Proteobacteria*, principalmente da classe *Alpha-* na camada endofítica de folha de arabidopsis, com enriquecimento de *Gammaproteobacteria* na camada epifítica das plantas, além de participação considerável de *Actinobacteria*. Knief et al. (2012) demonstraram predomínio de *Alphaproteobactéria* e *Actinobactéria* na folha de arroz.

A variação da comunidade microbiana associada às plantas pode causar profundos impactos no crescimento e saúde de suas hospedeiras (LINDOW; BRANDL, 2003). Neste trabalho objetivamos avaliar se a inoculação com diferentes linhagens de BPCP é capaz de modular a comunidade associada à raiz e à folha de plantas de milho. A inoculação com linhagens de BPCP pode promover alterações nos compostos exsudatos pelas raízes (HEULIN; GUCKERT; BALANDREAU, 1987; LEE; GASKINS, 1982), e assim causar mudanças estruturais na comunidade rizosférica. Através da análise de PCoA foi descartada a hipótese de alteração na comunidade bacteriana causado pela inoculação de diferentes linhagens de BPCP. Herschkovitz et al. (2005) também não encontraram diferenças na estrutura da comunidade rizosférica de milho, causado pela inoculação com *Azospirillum brasilense*. Correa et al. (2007) através da inoculação de duas cultivares de tomate com *A. brasilense*, reportaram que houve alteração na estrutura da comunidade microbiana associada à raiz de uma das cultivares, indicando que a alteração na estrutura esteja ligada também ao genótipo da planta hospedeira. Além disso, estes pesquisadores observaram diferenças metabólicas entre as plantas inoculadas e não inoculadas das duas cultivares, constatando que a alteração causada pelo inoculante pode estar no nível fenotípico e não no genotípico.

A análise de PCoA da comunidade filosférica mostrou que as diferentes inoculações foram capazes de modular a estrutura destes nichos. A inoculação de BPCP também é capaz de regular os nutrientes contidos na filosfera e como estes nutrientes regulam a microbiota associada pode ocorrer alteração na comunidade deste nicho (TURNER; JAMES; POOLE, 2013). Correa et al. (2007) reportaram que a inoculação com *A. brasilense* foi capaz de modular genotipicamente e metabolicamente a comunidade da filosfera de plantas de tomate. A inoculação de *Bacillus thurigiensis* em pimenta foi capaz de modular a estrutura da filosfera, enriquecendo a classe *Gammaproteobactera* e reduzindo *Firmicutes*, quando comparado ao tratamento sem inoculação (ZHANG et al., 2008). Por outro lado a inoculação de *Azospirillum* não causou alteração na filosfera de arroz irrigado (PEDRAZA et al., 2009).

Como foi encontradas diferenças nas estruturas das comunidades filosféricas, procedeu-se uma classificação da comunidade no nível de famílias bacterianas. A família mais abundante em todos os tratamentos foi a *Pseudomonadaceae*, principalmente nos tratamentos de inoculação com RZ2MS16 e coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5. Essa família contém uma diversidade de espécies bacterianas com variedade metabólica e catabolica, e são amplamente encontradas em associações com as plantas na natureza (MILLER et al., 2008). A sua interação com as plantas também é variadas, havendo espécies que exercem função benéfica à saúde e crescimento da hospedeira, como fitoestimulação, produção de metabólitos antimicrobianos e ISR, e espécies patogênicas (MILLER et al., 2008).

A segunda família mais abundante em todas as comunidades bacterianas foi *Microbacteriaceae*, família frequentemente encontrada associada a plantas e contém várias espécies descritas como fitopatógenas (EVTUSHENKO; TAKEUCHI, 2006). O tratamento controle foi o que apresentou maior abundância, enquanto que os tratamentos RZ2MS16 e RZ2MS9 + Ab-v5 foram os que apresentaram menor quantidade.

Os tratamentos RZ2MS16, Ab-v5 e RZ2MS9 + Ab-v5, apresentaram menor abundância da família *Methylobacteriaceae* quando comparadas ao controle. A família *Methylobacteriaceae* possui ampla ocorrência na filosfera de diversas culturas, colonizando-as de maneira epifítica e endofítica. São metilotróficas facultativas, atuando na metabolização do metanol liberado pela planta através da degradação da parede celular, auxiliando na detoxificação (KNIEF et al., 2010). Algumas espécies também possuem capacidade de produção de fitohormônios (KWAK et al., 2014).

Todos os tratamentos com inoculação foi capaz de reduzir a quantidade de bactérias da família *Xanthomonadacea*, quando comparadas ao controle. As espécies pertencentes à família *Xanthomonadaceae* são

conhecidas por apresentar fitopatogenecidade e mais de 400 espécies conhecidas de plantas, e são capazes de colonizar epifiticamente as folhas, por onde adentram as plantas através de aberturas naturais, como hidatódios, estômatos ou rachaduras. Estes patógenos são hemibiotróficos, se alimentando inicialmente do tecido vivo das plantas, e, nos estágios tardios de infecção, causam a morte das células vegetais (RYAN et al., 2011). Não foi notado sintomas de patogenecidade nas plantas.

Quando comparado aos demais tratamentos, a coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5 apresentou ainda maiores quantidades de *Sphingobacteriaceae*, *Beutenbergiaceae* e *Leuconostocaceae*.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados apresentados neste trabalho, conclui-se que:

- Não ocorre antibiose entre as linhagens RZ2MS9 e Ab-v5, podendo ser utilizadas em consórcio na formulação de inoculantes;
- A inoculação com a linhagem Ab-v5 foi capaz de promover incremento de 3% na altura, e a coinoculação de RZ2MS9 e Ab-v5 promoveu incremento de 3% na altura e 9% no diâmetro do colmo de plantas de milho, quando comparadas ao controle sem inoculação, em experimento realizado em condições de campo;
- A inoculação foi capaz de modular a comunidade bacteriana associada à folha, apresentando diferenças sutis na abundância de determinadas famílias, como *Pseudomonadaceae*, *Microbacteriaceae*, *Methylobacteriaceae* e *Xanthomonadaceae*. Por outro lado, a inoculação não foi capaz de causar alterações na comunidade bacteriana associada à raiz;
- Quanto aos dois nichos analisados, independente de inoculação, a raiz do milho apresentou maior estimativa de riqueza, índice de diversidade e densidade bacteriana quando comparada à folha, além de diferir na estrutura, apresentando maior abundância de *Betaproteobacteria*, enquanto que a filosfera apresentou maior abundância de *Gamma-* e *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria* e *Cytophagia*.

Estes resultados indicam que a coinoculação das linhagens RZ2MS9 e Ab-v5 possa vir a ser utilizada como inoculante biológico para a cultura do milho, dado a capacidade em incrementar a altura e diâmetro de plantas, em condições de campo. No entanto, são necessários ainda novos estudos, principalmente a avaliação de dados de produtividade e resultados em diferentes anos agrícolas e locais, para comprovar a eficácia destas linhagens e a estabilidade dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

ABRAMOVAY, R. Alimentos versus população: está ressurgindo o fantasma malthusiano? **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 4, p. 38–42, 2010.

ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 921–929, 2009.

AMANN, R. I.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological reviews**, v. 59, n. 1, p. 143–169, 1995.

ANDREEVA, I. N.; REDKINA, T. V; IZMAILOV, S. F. The involvement of indoleacetic-acid in the stimulation of Rhizobium legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 40, n. 6, p. 780–784, 1993.

ARAÚJO, P. P. et al. Classificação hidroquímica e contaminação por nitrato no aquífero livre Barreiras na bacia do rio Capitão Pocinho região do médio rio Guamá na Amazônia oriental. **Revista Ambiente & Água**, v. 6, n. 2, p. 266, 2011.

ARKHIPOVA, T. N. et al. Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. **Plant and Soil**, v. 272, n. 1-2, p. 201–209, maio 2005.

BAIS, H. P.; FALL, R.; VIVANCO, J. M. Biocontrol of Bacillus subtilis against infection of Arabidopsis roots by Pseudomonas syringae is facilitated by biofilm formation and surfactin production. **Plant Physiology**, v. 134, n. 1, p. 307–319, 2004.

BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 3, p. 541–555, 2003.

BAL, H. B. et al. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. **Plant and Soil**, v. 366, n. 1-2, p. 93–105, 15 maio 2013.

BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5-6, p. 485–491, 2000.

BAR, T.; OKON, Y. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamide in *Azospirillum brasilense* Sp7. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 81–86, 1993.

BASTIÁN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 1, p. 7–11, 1998.

BATISTA, B. D. **Promoção de crescimento em milho (Zea mays L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (Paullinia cupana var. sorbilis).** 2013. 96p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas): Escola Superior de Agricultura "Luiz de Querioz", Universidade de Sào Paulo, Piracicaba, 2013.

BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4 SUPPL., p. 1044–1051, 2012.

BENIZRI, E.; BAUDOIN, E.; GUCKERT, A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. **Biocontrol science and technology**, v. 11, n. 5, p. 557–574, 2001.

BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.

BODDEY, R. M. et al. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on nitrogen accumulation by field-grown wheat.

Plant and Soil, v. 95, n. 1, p. 109–121, 1986.

BODENHAUSEN, N.; HORTON, M. W.; BERGELSON, J. Bacterial Communities Associated with the Leaves and the Roots of Arabidopsis thaliana. **PLoS One**, v. 8, n. 2, 2013.

BONTEMPS, C. et al. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 1, p. 44–52, 2010.

BRANDI, M.; CLARK, E. M.; LINDOW, S. E. Characterization of the indole-3-acetic acid (IAA) biosynthetic pathway in an epiphytic strain of *Erwinia herbicola* and IAA production in vitro. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 586–592, 1996.

BRASIL. **Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma economia de baixa emissão de carbono na agricultura.** Brasília: MAPA/ACS, 2012.

BROEK, A. VANDE et al. Transcription of the Azospirillum brasilense nifH gene is positively regulated by NifA and NtrA and is negatively controlled by the cellular nitrogen status. **Molecular and General Genetics**, v. 232, n. 2, p. 279–283, 1992.

BULGARELLI, D. et al. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 807–38, 2013.

CAPORASO, J. G. et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature methods**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CASSAN, F. et al. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28–35, 2009.

CASTRO-SOWINSKI, S. et al. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. **FEMS microbiology letters**, v. 276, n. 1, p. 1–11, 2007.

CAVAGLIERI, L. et al. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides in vitro* and at the maize root level. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5, p. 748–754, 2005.

CHELIUS, M. K.; TRIPLETT, E. W. The diversity of *archaea* and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. **Microbial Ecology**, v. 41, n. 3, p. 252–263, 2001.

CHEN, Y. et al. Biocontrol of tomato wilt disease by Bacillus subtilis isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 848–864, 2013.

CHEN, Y. P. et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. **Applied soil ecology**, v. 34, n. 1, p. 33–41, 2006.

CLAUS, D.; FRITZE, D. Taxonomy of Bacillus. In: HARWOOD, C. R. (Ed.). . **Bacillus**. New York: Springer US, 1989. p. 5–26.

CLEVELAND, C. C. et al. Patterns of new versus recycled primary production in the terrestrial biosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 31, p. 12733–12737, 30 jul. 2013.

COENYE, T. et al. *Burkholderia ambifaria* sp. nov., a novel member of the *Burkholderia cepacia* complex including biocontrol and cystic fibrosis-related isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1481–1490, 2001.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environmental Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 719–729, 2003.

COHEN, A. C.; BOTTINI, R.; PICCOLI, P. N. *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. **Plant Growth Regulation**, v. 54, n. 2, p. 97–103,

2008.

COLE, J. R. et al. The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. **Nucleic acids research**, v. 33, n. suppl 1, p. D294–D296, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos - sétimo levantamento 4/2016**. Brasília: CONAB, 2016.

COMPANT, S. et al. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and Future Prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951–4959, 2005.

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, 2010.

CORDELL, D.; WHITE, S. **Peak phosphorus: Clarifying the key issues of a vigorous debate about long-term phosphorus securitySustainability**Molecular Diversity Preservation International, , 24 out. 2011. Disponível em: <http://www.mdpi.com/2071-1050/3/10/2027/>. Acesso em: 19 jun. 2016

CORREA, O. S. et al. Tomato genotype and *Azospirillum* inoculation modulate the changes in bacterial communities associated with roots and leaves. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 3, p. 781–786, 2007.

COSTACURTA, A.; KEIJERS, V.; VANDERLEYDEN, J. Molecular cloning and sequence analysis of an Azospirilium brasilense indole-3-pyruvate decarboxylase gene. **Molecular and General Genetics**, v. 243, n. 4, p. 463–472, 1994.

CREWS, T. E.; PEOPLES, M. B. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: Ecological tradeoffs and human needs. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 102, n. 3, p. 279–297, 2004.

DALMASTRI, C. et al. A rhizospheric *Burkholderia cepacia* complex population: genotypic and phenotypic diversity of *Burkholderia cenocepacia* and *Burkholderia ambifaria*. **FEMS microbiology ecology**, v. 46, n. 2, p. 179–187, 2003.

DE SALAMONE, I. E. G. et al. Biological nitrogen fixation in *Azospirillum* strain-maize genotype associations as evaluated by the 15N isotope dilution technique. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, n. 3, p. 249–256, 1996.

DEKALB. **Produtos: DKB 390**. Disponível em: <http://www.dekalb.com.br/produto/detalhe?id=DKB390>. Acesso em: 1 abr. 2016.

DESANTIS, T. Z. et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 5069–5072, 2006.

DIMKPA, C. O. et al. Production of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in the plant-beneficial bacterium Pseudomonas chlororaphis O6 is inhibited by ZnO nanoparticles but enhanced by CuO nanoparticles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 5, p. 1404–1410, 2012.

DOBBELAERE, S. et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize. **Biology and Fertility of Soils**, v. 36, n. 4, p. 284–297, 2002.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107–149, 2003.

DORIGON, E. B.; STOLBERG, J.; PERDOMO, C. C. Qualidade da água em um microbacia de uso agrícola e urbano em Xanxerê-SC. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 2, n. 2, p. p–105, 2008.

EADY, R. R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 3013–3030, 1996.

EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. **Applied Soil Ecology**, v. 36, n. 2, p. 184–189, 2007.

EMMERT, E. A. B.; HANDELSMAN, J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. **FEMS Microbiology letters**, v. 171, n. 1, p. 1–9, 1999.

ERISMAN, J. W. et al. How a century of ammonia synthesis changed the world. **Nature Geoscience**, v. 1, n. 10, p. 636–639, 2008.

ERISMAN, J. W. et al. Consequences of human modification of the global nitrogen cycle. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1621, p. 20130116–20130116, 2013.

ESALQ. **BASE DE DADOS DA ESTAÇÃO METEOROLÓGICA AUTOMÁTICA**. Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/departamentos/leb/automatica/pagina5.html>. Acesso em: 10 jul. 2016.

ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. Burkholderia, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2790–2798, 2001.

EVTUSHENKO, L. I.; TAKEUCHI, M. The family Microbacteriaceae. In: MARTIN DWORKIN, STANLEY FALKOW, EUGENE ROSENBERG, KARL-HEINZ SCHLEIFER, E. S. (Ed.). . **The prokaryotes**. New York: Springer US, 2006. p. 1020–1098.

FANI, R. et al. Nucleotide sequence of the gene encoding the nitrogenase iron protein (nifH) of Azospirillum brasilense and identification of a region controlling nifH transcription. **Molecular and General Genetics**, v. 220, n. 1, p. 81–87, 1989.

FAOSTAT. **Food and agriculture organization of the united nations statistics division**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org>. Acesso em: 29 abr. 2016.

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, 2006.

FIGUEIREDO, M. V. B. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria for improving nodulation and nitrogen fixation in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1187–1193, 2008.

FOWLER, D. et al. The global nitrogen cycle in the twenty- first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, p. 1–13, 2013.

FRANSSEN, H. et al. Plant genes involved in root-nodule development on legumes. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 350, n. 1331, p. 101–107, 1995.

GALLOWAY, J. N. et al. The nitrogen cascade. **Bioscience**, v. 53, n. 4, p. 341–356, 2003.

GARCÍA DE SALAMONE, I. E.; HYNES, R. K.; NELSON, L. M. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 404–411, 2001.

GARCIA, J. C. et al. Aspectos Econômicos da Produção e Utilização do Milho. **Circular Técnica**, v. 74, p. 1–12, 2006.

GARDENER, B. B. M. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1252–1258, 2004.

GEURTS, R.; XIAO, T. T.; REINHOLD-HUREK, B. What Does It Take to Evolve A Nitrogen-Fixing Endosymbiosis? **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 3, p. 199–208, 2016.

GHOSH, S. et al. Three newly isolated plant growth-promoting *bacilli* facilitate the seedling growth of canola, Brassica campestris. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 277–281, 2003.

GLASS, A. D. M. **Plant mineral nutrition. An introduction to current concepts.** 1. ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, Inc., 1989.

GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 109–117, 1995.

GLICK, B. R. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 251, n. 1, p. 1–7, 2005.

GOLDSTEIN, A. H. Bacterial solubilization of mineral phosphates: Historical perspective and future prospects. **American Journal of Alternative Agriculture**, v. 1, n. 02, p. 51–57, 13 mar. 1986.

GOOLSBY, D. A. et al. Nitrogen Input to the Gulf of Mexico. **Journal of Environment Quality**, v. 30, n. 2, p. 329, 2001.

GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 395–412, 2005.

GRIME, J. P. Evidence for the Existence of Three Primary Strategies in Plants and Its Relevance to Ecological and Evolutionary Theory. **The American Naturalist**, v. 111, n. 982, p. 1169–1194, 1977.

GUPTA, M. et al. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis* Miller. **Microbiological research**, v. 167, n. 6, p. 358–363, 2012.

GUTIERREZ-MANERO, F. J. et al. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. **Physiologia Plantarum**, v. 111, n. 2, p. 206–211, fev. 2001.

HAFEEZ, F. Y. et al. Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 26, n. 2, p. 143–150, 2006.

HAMEEDA, B. et al. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. **Microbiological research**, v. 163, n. 2, p. 234–242, 2008.

HERSCHKOVITZ, Y. et al. *Azospirillum brasilense* does not affect population structure of specific rhizobacterial communities of inoculated maize (*Zea mays*). **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 11, p. 1847–1852, 2005.

HEUER, H. et al. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233–3241, 1997.

HEULIN, T.; GUCKERT, A.; BALANDREAU, J. Stimulation of root exudation of rice seedlings by *Azospirillum* strains: carbon budget under gnotobiotic conditions. **Biology and fertility of soils**, v. 4, n. 1-2, p. 9–14, 1987.

HILL, G. T. et al. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. **Applied Soil Ecology**, v. 15, n. 1, p. 25–36, 2000.

HOLMES, A.; GOVAN, J.; GOLDSTEIN, R. Agricultural use of Burkholderia (Pseudomonas) cepacia: a threat to human health? **Emerging iIfectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 221, 1998.

HONTZEAS, N. et al. Evidence for horizontal transfer of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 7556–7558, 2005.

HU, X. et al. Development of a biologically based fertilizer, incorporating *Bacillus megaterium* A6, for improved phosphorus nutrition of oilseed rape. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 231–236, 2013.

HUANG, C.-J. et al. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. **BMB Reports**, v. 38, n. 1, p. 82–88, 2005.

HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of

maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, 13 jun. 2010.

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

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp . and *Azospirillum brasilense* : A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, n. April, p. 811–817, 2015.

IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: IBGE, 2012.

IFADATA. **International Fertilizer Industry Association Database**. Disponível em: <http://ifadata.fertilizer.org/ucSearch.aspx>. Acesso em: 19 jun. 2016.

IGARASHI, R. Y.; SEEFELDT, L. C. Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 351–384, 2003.

INDIA. **Biology of Maize**. New Delhi: Department of Biotechnology, 2010.

INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION. **Mineral fertilizer use and the environment**. Paris: IFA, International fertilizer industry association, 2000.

JESUS, J. A. DE. **Potencial biotecnológico de actinobactérias e bactérias diazotróficas endofíticas para o crescimento de plantas**. 2013. 83 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal): Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goytacazes, 2013.

JIANBO, S. et al. Phosphorus dynamics: from soil to plant. **Plant Physiology**, v. 156, n. 3, p. 997–1005, 1 jul. 2011.

JOHN, P. Ethylene biosynthesis: the role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase, and its possible evolutionary origin. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 3, p. 583–592, 1997.

JOO, G. J. et al. *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP as a newly isolated gibberellin producing bacterium. **Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 167–171, 2 abr. 2009.

KAMPA, M.; CASTANAS, E. Human health effects of air pollution. **Environmental Pollution**, v. 151, n. 2, p. 362–367, 2008.

KANEKO, T. et al. Complete genomic structure of the cultivated rice endophyte Azospirillum sp. B510. **DNA research**, v. 17, n. 1, p. 37–50, 2010.

KANG, S.-M. et al. Effect of *Burkholderia* sp. KCTC 11096BP on some physiochemical attributes of cucumber. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, n. 3, p. 264–268, 2010.

KHAMMAS, K. M. et al. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. **Research in Microbiology**, v. 140, n. 8, p. 679–693, 1989.

KHAN, A. L. et al. Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 8, p. 689–695, 4 ago. 2014.

KLOEPPER, J. W.; SCHROTH, M. N. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions [Potatoes, radishes]. **Phytopathology**, 1981.

KNIEF, C. et al. Site and plant species are important determinants of the *Methylobacterium* community composition in the plant phyllosphere. **The ISME journal**, v. 4, n. 6, p. 719–728, 2010.

KNIEF, C. et al. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. **The ISME Journal**, v. 6, n. 7, p. 1378–1390, 2012.

KUREPIN, L. V et al. *Burkholderia phytofirmans*-induced shoot and root growth promotion is associated with endogenous changes in plant growth hormone levels. **Plant Growth Regulation**, v. 75, n. 1, p. 199–207, 2015.

KWAK, M.-J. et al. Genome information of *Methylobacterium oryzae*, a plant-probiotic methylotroph in the phyllosphere. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e106704, 2014.

LEE, K. J.; GASKINS, M. H. Increased root exudation of 14C-compounds by sorghum seedlings inoculated with nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, v. 69, n. 3, p. 391–399, 1982.

LEFF, B.; RAMANKUTTY, N.; FOLEY, J. A. Geographic distribution of major crops across the world. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 18, n. 1, p. n/a–n/a, 2004.

LI, X. et al. Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, p. 392–401, 2014.

LIANG, Y. Y. et al. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of nifA, glnA and glnB gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 100, n. 1-3, p. 113–119, 1992.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. Microbiology of the phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875–1883, 2003.

LOPEZ-VELASCO, G. et al. Diversity of the spinach (*Spinacia oleracea*) spermosphere and phyllosphere bacterial communities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 346, n. 2, p. 146–154, 2013.

LPSN. **List of prokaryotic names with standing in nomenclature**. Disponível em: <http://www.bacterio.net/>. Acesso em: 8 jul. 2016.

MACHADO, H. B. et al. The ntrBC genes of *Azospirillum brasilense* are part of a nifR3-like-ntrB-ntrC operon and are negatively regulated. **Canadian journal of microbiology**, v. 41, n. 8, p. 674–684, 1995.

MALIK, K. A. et al. Association of nitrogen-fixing, plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. **Plant and Soil**, v. 194, n. 1-2, p. 37–44, 1997.

MANULIS, S. et al. Biosynthesis of indole-3-acetic acid via the indole-3-acetamide pathway in *Streptomyces* spp. **Microbiology**, v. 140, n. 5, p. 1045–1050, 1 maio 1994.

MANULIS, S. et al. Differential Involvement of Indole-3-Acetic Acid Biosynthetic Pathways in Pathogenicity and Epiphytic Fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophilae*. **The American Phytopathological Society**, v. 11, n. 7, p. 634–642, 1998.

MÄSER, P.; GIERTH, M.; SCHROEDER, J. I. Molecular mechanisms of potassium and sodium uptake in plants. **Plant and Soil**, v. 247, n. 1, p. 43–54, 2002.

MEHNAZ, S. *Azospirillum* : A Biofertilizer for Every Crop. In: ARORA, N. K. (Ed.). . **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**. New Delhi: Springer India, 2015. p. 297–314.

MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 3, p. 620–624, 2007.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634–663, 2013.

MILCAMPS, A. et al. The *Azospirillum brasilense* rpoN gene is involved in nitrogen fixation, nitrate assimilation, ammonium uptake, and flagellar biosynthesis. **Canadian journal of microbiology**, v. 42, n. 5, p. 467–478, 1996.

MILLER, S. H. et al. *Pseudomonas*–plant interactions. **Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory**, p. 353–376, 2008.

MODESTO, R. P.; BARBOUR, E. D. A.; LEMOS, M. M. G.; TOFFOLI, F. F.; COSTA DO VALE, F. R.; RUBY, E. C.; OHBA, M. S.; CAMARGO, G. G.; MORENO, F. N.; RODRIGUES, P. F. **Concentrações de nitrato nas**

águas do Aquífero Bauru – Estado de São Paulo. Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, 16.; Encontro Nacional de Perfuradores de Poços, 17. **Anais**...São Luís: ABAS, 2010

MOLLA, A. H. et al. Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory systems. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 4, p. 457–463, 2001.

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

OBERSTEINER, M. et al. The Phosphorus Trilemma. **Nature Geoscience**, v. 6, n. 11, p. 897–898, 2013.

OKON, Y.; HEYTLER, P. G.; HARDY, R. W. F. N2 fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 694–697, 1983.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 3, p. 115–125, 2008.

ONOFRE-LEMUS, J. et al. ACC (1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6581–6590, 15 out. 2009.

ORTÍZ-CASTRO, R. et al. The role of microbial signals in plant growth and development. **Plant Signaling & Behavior**, v. 4, n. 8, p. 701–712, 2009.

ORTÍZ-CASTRO, R.; VALENCIA-CANTERO, E.; LÓPEZ-BUCIO, J. Plant growth promotion by *Bacillus megaterium* involves cytokinin signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 4, p. 263–265, 2008.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **Circular Técnica**, v. 75, p. 1–6, 2006.

PANDEY, A.; SHARMA, E.; PALNI, L. M. S. Influence of bacterial inoculation on maize in upland farming systems of the Sikkim Himalaya. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 3, p. 379–384, 1998.

PATTEN, C. L.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 207–220, 1996.

PAVÃO, A. R.; FERREIRA FILHO, J. B. D. S. Impactos econômicos da introdução do milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49, n. 1, p. 81–108, 2011.

PEDRAZA, R. O. et al. *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 36–43, 2009.

PEIFFER, J. A. et al. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6548–53, 2013.

PEOPLES, M. B.; HERRIDGE, D. F.; LADHA, J. K. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? **Plant and Soil**, v. 174, n. 1-2, p. 3–28, 1995.

PERRIG, D. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143–1150, 2007.

PHI, Q.-T. et al. Functional identification and expression of indole-3-pyruvate decarboxylase from *Paenibacillus polymyxa* E681. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 1235–1244, 2008.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013.

PLEIJEL, H. et al. Ozone risk assessment for agricultural crops in Europe: Further development of stomatal flux

and flux-response relationships for European wheat and potato. **Atmospheric Environment**, v. 41, n. 14, p. 3022–3040, 2007.

PRINSEN, E. et al. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v. 6, p. 609, 1993.

RAAIJMAKERS, J. M. et al. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 126–135, 1995.

RABALAIS, N. N. Nitrogen in Aquatic Ecosystems. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 31, n. 2, p. 102–112, mar. 2002.

RABALAIS, N. N.; TURNER, R. E.; SCAVIA, D. Beyond Science into Policy: Gulf of Mexico Hypoxia and the Mississippi River. **BioScience**, v. 52, n. 2, p. 129, 2002.

RAMAMOORTHY, V. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. **Crop Protection**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2001.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: Application to soil environment. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 167–177, 2000.

RASTOGI, G. et al. A PCR-based toolbox for the culture-independent quantification of total bacterial abundances in plant environments. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p. 127–132, 2010.

REED, S. C.; TOWNSEND, A. R.; CLEVELAND, C. C. Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 42, n. 1, p. 489–512, 2011.

REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: Standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 559–566, 2000.

REIJNDERS, L. Phosphorus resources, their depletion and conservation, a review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 93, p. 32–49, 2014.

REIS, V. M.; DOS SANTOS TEIXEIRA, K. R.; PEDRAZA, R. O. What Is Expected from the Genus *Azospirillum* as a Plant Growth-Promoting Bacteria? In: MAHESHWARI, D. K. (Ed.). . **Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 123–138.

RIBAUDO, C. M. et al. *Azospirillum* sp. promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 25, n. 2, p. 175–185, 2006.

ROBSON, R. L.; POSTGATE, J. R. Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 183–207, 1980.

ROCKSTRÖM, J. et al. Planetary boundaries: Exploring the safe operating space for humanity. **Ecology and Society**, v. 14, n. 2, 2009.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR, V. A.; VICTOR, O. A simple medium to isolation and growth of *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathol**, v. 12, p. 16–20, 1986.

RODRIGUES, E. P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N2 fixation of rice (Oryza sativa L.). **Plant and Soil**, v. 302, n. 1-2, p. 249–261, 2008.

RODRIGUEZ, H. et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, n. 11, p. 552–555, 2004.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology advances**, v. 17, n. 4-5, p. 319–339, 1999.

ROMERO, F. M.; MARINA, M.; PIECKENSTAIN, F. L. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf

endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. **FEMS Microbiology Letters**, v. 351, n. 2, p. 187–194, 2014.

RYAN, R. P. et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 344–355, 2011.

RYU, R. J.; PATTEN, C. L. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by tyrr in *Enterobacter cloacae* UW5. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 21, p. 7200–7208, 1 nov. 2008.

SABER, Z.; PIRDASHTI, H.; ESMAEILI, M. Response of Wheat Growth Parameters to Co-Inoculation of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Different Levels of Inorganic Nitrogen and Phosphorus. **World Applied Sciences Journal**, v. 16, n. 2, p. 213–219, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SAS INSTITUTE. **SAS software 9.2.**Cary, 1999.

SAUBIDET, M. I.; FATTA, N.; BARNEIX, A. J. The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen utilization by wheat plants. **Plant and Soil**, v. 245, n. 2, p. 215–222, 2002.

SCHNABLE, J. C. Genome Evolution in Maize: From Genomes Back to Genes. **Annual Review of Plant Biology**, v. 66, p. 329–343, 2015.

SEKINE, M. et al. Detection of the IAA biosynthetic pathway from tryptophan via indole-3-acetamide in *Bradyrhizobium* spp. **Plant and Cell Physiology**, v. 29, n. 5, p. 867–874, 1988.

SELMAN, M.; SUGG, Z.; GREENHALGH, S.; DIAZ, R. **Eutrophication and hypoxia in coastal areas: a global assessment of the state of knowledge**. Disponível em: <http://www.wri.org/publication/ eutrophication-and-hypoxia-in-coastal-areas>. Acesso em: 20 jun. 2016.

SERGEEVA, E.; HIRKALA, D. L. M.; NELSON, L. M. Production of indole-3-acetic acid, aromatic amino acid aminotransferase activities and plant growth promotion by *Pantoea agglomerans* rhizosphere isolates. **Plant and Soil**, v. 297, n. 1-2, p. 1–13, 15 ago. 2007.

SESHADRI, S. et al. Solubilization of inorganic phosphates by *Azospirillum halopraeferans*. **Current science**, v. 79, n. 5, p. 565–567, 2000.

SESSITSCH, A. et al. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 1187–1192, 2005.

SEVILLA, M. et al. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and 15N2 incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild-type and nif mutant strains. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 14, n. 3, p. 358–366, 2001.

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

SHAKYA, M. et al. A multifactor analysis of fungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76382, 2013.

SHARMA, S. B. et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 587, 2013.

SHENG, X. F. Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 10, p. 1918–1922, 2005.

SINGH, O. et al. Novel phosphate solubilizing bacteria "*Pantoea cypripedii* PS1"along with *Enterobacter aerogenes* PS16 and *Rhizobium ciceri* enhance the growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Plant Growth Regulation**, v. 73, n. 1, p. 79–

89, 2014.

SINGH, R. K.; MALIK, N.; SINGH, S. Impact of rhizobial inoculation and nitrogen utilization in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L .). **Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 8–14, 2013.

SMIL, V. **Enriching the earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the transformation of world food**. Cambridge: The MIT Press, 2001.

SOGIN, M. L. et al. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 32, p. 12115–12120, 2006.

SPAEPEN, S. et al. Phenotypical and molecular responses of *Arabidopsis thaliana* roots as a result of inoculation with the auxin-producing bacterium *Azospirillum brasilense*. **New Phytologist**, v. 201, n. 3, p. 850–861, fev. 2014.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J. Auxin and plant-microbe interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 4, p. 1–13, 2011.

STAROSCIK, A. **Calculator for determining the number of copies of a template**. Disponível em: <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>. Acesso em: 23 maio. 2016.

SUN, L. et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. **Microbial Ecology**, v. 55, n. 3, p. 415–424, 2008.

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, 1978.

THALLER, M. C. et al. Heterogeneous patterns of acid phosphatases containing low-molecular-mass polypeptides in members of the family *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 255–261, 1995.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016–1024, 1979.

TIMMUSK, S. et al. Cytokinin production by *Paenibacillus polymyxa*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 13, p. 1847–1852, 1999.

TSCHOEKE, B. A. P. **Monitoramento da interação entre rizobactéria RZ2MS16 (*Burkholderia ambifaria*) promotora de crescimento e bioinoculantes comerciais aplicados nas culturas de soja e milho**. 2016. 92 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola): Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. 209, 2013.

UROZ, S. et al. Pyrosequencing reveals a contrasted bacterial diversity between oak rhizosphere and surrounding soil. **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, n. 2, p. 281–288, 2010.

VAN HEERWAARDEN, J. et al. 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, 2011.

VAN RAY, B.; VAN DIEST, A. Utilization of phosphate from different sources by six plant species. **Plant and Soil**, v. 51, n. 4, p. 577–589, 1979.

VAZQUEZ, P. et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5-6, p. 460–468, 2000.

VORHOLT, J. A. Microbial life in the phyllosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 828–840, 2012.

VYAS, P.; GULATI, A. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled

environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. **BMC microbiology**, v. 9, n. 1, p. 1, 2009.

WALKER, T. S. et al. Update on Root Exudation and Rhizosphere Biology Root Exudation and Rhizosphere Biology. **Plant Physiology**, v. 132, n. 1, p. 44–51, 2003.

WATANABE, K.; KODAMA, Y.; HARAYAMA, S. Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 3, p. 253–262, 2001.

WHITMAN, W. B.; COLEMAN, D. C.; WIEBE, W. J. Prokaryotes: the unseen majority. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 12, p. 6578–6583, 1998.

WHO, G. Guidelines for drinking-water quality. **World Health Organization**, v. 216, p. 303–304, 2011.

XIE, C.-H.; YOKOTA, A. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1435–1438, 2005.

XU, M. et al. Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 835–845, 11 mar. 2014.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and immunology**, v. 36, n. 12, p. 1251–1275, 1992.

YOUNG, L. SEN et al. Endophytic establishment of the soil isolate *Burkholderia* sp. CC-Al74 enhances growth and P-utilization rate in maize (*Zea mays* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 66, p. 40–47, 2013.

ZHANG, B. et al. Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere. **FEMS Microbiology Letters**, v. 284, n. 1, p. 102–108, 2008.