Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

Identificação de bactérias promotoras de crescimento de trigo e seu impacto na comunidade bacteriana da rizosfera

Fernanda de Almeida Godoy

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

Fernanda de Almeida Godoy
Engenheira Agrônoma

Identificação de bactérias promotoras de crescimento de trigo e seu impacto na comunidade bacteriana da rizosfera

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **RODRIGO MENDES**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia Agrícola

Piracicaba
2020

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

Godoy, Fernanda de Almeida

Identificação de bactérias promotoras de crescimento de trigo e seu impacto na comunidade bacteriana da rizosfera/ Fernanda de Almeida Godoy. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2020.

103 p.

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

1. *Triticum aestivum* 2. Bactérias promotoras de crescimento 3. Rizosfera 4. Inoculantes. I.Título

Ao meu pai José Mário,
Dedico

A minha mãe Cleonice,
Ofereço

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Rodrigo Mendes, pelos ensinamentos e contribuição para o meu crescimento científico e intelectual.

A minha mãe Cleonice e meu irmão Henrique por me ensinarem o amor incondicional e não medirem esforços para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao Guilherme, por toda cumplicidade, paciência e apoio para conduzir o meu mestrado e a minha vida.

Todos os amigos que fiz durante este período e que foram essenciais para a realização deste trabalho. Em especial aos integrantes do LMA, onde a solidariedade impera e sempre há tempo para um cafezinho.

A Josiane Barros e Lilian Abreu, sendo que faltariam páginas para expressar a minha gratidão.

A todos os funcionários da ESALQ e da EMBRAPA Meio Ambiente.

A Neusa Domingos, Rosely dos Santos e Elke Vilela.

Ao José Pereira e equipe da Embrapa Trigo.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", e pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A todos os professores da ESALQ que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

À EMBRAPA Meio Ambiente por colocar à disposição o laboratório e área experimental.

A CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

E por fim, todos que contribuíram de alguma forma (consciente ou não) para a materialização deste estudo.

"Deem graças ao Senhor porque ele é bom; o seu amor dura para sempre" (Salmos 106:1)

Obrigada!

"Aplique o seu máximo em cada coisa que fizer para que tudo seja da forma que deve ser"
Shundo Aoyama Roshi

RESUMO

Identificação de bactérias promotoras de crescimento de trigo e seu impacto na comunidade bacteriana da rizosfera

Os microrganismos na rizosfera podem operar diretamente em benefício da planta através de funções como defesa, saúde e promoção do crescimento, e o uso desses microrganimos como inoculantes representam uma alternativa viável para uma produção agrícola mais sustentável e equilibrada sem diminuir os níveis de produção e tecnológicos já alcançados. Neste trabalho foram isoladas e caracterizadas 71 bactérias da rizosfera de cultivares modernos e variedades crioulas de trigo. Os isolados foram caracterizados através do sequenciamento do gene 16S rRNA e selecionados após testes bioquímicos de produção de ácido-indol acético, solubilização de fosfato, fixação de nitrogênio eantagonismo contra fungos patógenos de doenças de solo. Além de estimar a contribuição destes microrganismos selecionados na promoção de crescimento de trigo em bioensaios, buscou-se avaliar o impacto da inoculação na comunidade bacteriana da rizosfera. O efeito dos isolados na planta foi verificado em experimento em casa de vegetação, com 11 tratamentos, utilizando-se três genótipos comerciais de trigo que foram avaliados quanto à altura, diâmetro, quantidade de clorofila, peso seco e fresco da raiz e parte aérea e análisedas enzimas FDA, β-glicosidase e fosfatasepara mensurar a atividade microbiana no solo. Além do tratamento na semente, foram realizadas inoculações quinzenais eamostragens de solo rizosféricoao longo de todo experimento, antes e depois de cada inoculação bacteriana. Foi possível observar uma promoção de crescimento especialmente em plantas inoculadas com bactérias dos gêneros *Lysinibacillus* e *Pseudomonas* na cultivar BRS Parrudo, e na cultivar BRS Reponte o tratamento com o consórcio de todos isolados testados no bioensaio foi o mais eficiente, indicando que a interação benéfica é cultivar-dependente. Além disso, a análise multivariada permutacional dos dados de 16S rRNA das amostras de solo indicou que existe uma alteraçãosignificativa na estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera ao longo do desenvolvimento da planta a qual também é impactda pela inoculação. O inoculante se estabelece mais facilmente nos primeiros estádios de desenvolvimento da planta hospedeira e sua abundância relativa diminui gradualmente dias após a inoculação. Os resultados fornecem conclusões sobre a influência do genótipo na resposta da planta e sugere que o desenvolvimento de inoculantes deve ser cultivar específico.

Palavras-chave: *Triticum aestivum*; Rizobactérias; BPCV; Sequenciamento; 16S rRNA; Inoculantes

ABSTRACT

Identification of plant growth promotion bacteria and its impact in the rizosphere bacterial community

Microorganisms in the rhizosphere can operate directly for the benefit of the plant through functions such as defense, health and growth promotion, and the use of these microorganisms as inoculants represents a viable alternative for a more sustainable and balanced agricultural production without achieved the levels of production and technology already in place. In this study, 71 bacteria from the rhizosphere of modern cultivars and wheat landraces were isolated and characterized. The isolates were characterized by sequencing the 16S rRNA gene and selected after biochemical tests for acetic acid-indole production, phosphate solubilization, nitrogen fixation and antagonism against soil borne fungalpathogens. Weassessed the contribution of these selected microorganisms forwheat growth promotion in bioassays and we evaluated the impact of inoculation in the rhizosphere bacterial community. The effect of the isolates on the plant was verified in a greenhouse experiment, with 11 treatments, using three commercial wheat genotypes that were evaluated for height, diameter, amount of chlorophyll, dry and fresh weight of the root and aerial part and analysis of the enzymes FDA, β-glycosidase and phosphatase to measure microbial activity in the soil. In addition to seed treatment, biweekly inoculations and rhizospheric soil sampling were carried out throughout the experiment, before and after each bacterial inoculation. It was possible to observe a plant growth promotion especially in plants inoculated with bacteria of the genus *Lysinibacillus* and *Pseudomonas* in the cultivar BRS Parrudo, and in the cultivar BRS Reponte the treatment with the bacterial consorsium including all isolates tested in the bioassay was the most efficient, indicating that the beneficial interaction is cultivar-dependent. In addition, the permutational multivariate analysis of the 16S rRNA data in soil samples indicated that there is a significant change in the structure of the bacterial community of the rhizosphere over plant development, which is also impacted by the bacterial inoculation. The inoculant is more easily established in the early stages of the plant development and its relative abundance gradually decreases days after inoculation. The results provide conclusions about the influence of the genotype on the plant's response and suggest that the development of inoculants must be cultivar-specific.

Keywords: *Triticum aestivum*; Rhizobacteria; BPCV; Sequencing; 16S rRNA; Inoculants

SUMÁRIO

RESUMO 6
ABSTRACT 7
1. INTRODUÇÃO 11
2. OBJETIVOS 13
2.1. Objetivos específicos 13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 15
3.1. Diversidade microbiana no solo 16
3.2. Bactérias benéficas para as plantas 17
3.3. O Microbioma da rizosfera 19
3.4. Uso do sequenciamento do gene 16S rRNA no estudo de bactérias 22
3.5. Microrganismos na agricultura 24
4. MATERIAL E MÉTODOS 27
4.1. Material vegetal utilizado para obtenção dos isolados 27
4.2. Obtenção e conservação dos isolados 27
4.3. Triagem de isolados para características benéficas 28
4.3.1. Antagonismo contra patógenos de solo 28
4.3.3. Solubilização de fosfato 29
4.3.4. Fixação de Nitrogênio 29
4.4. Identificação molecular dos isolados bacterianos por seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA 30
4.4.1. Extração do DNA bacteriano e preparo das amostras para seqüenciamento 30
4.4.2. Análise das sequências do gene 16S rRNA e reconstrução filogenética. 31
4.5. Bioensaio em casa de vegetação 31
4.5.2. Seleção dos microrganismos e tratamento de sementes 33
4.5.3. Condução do experimento 34
4.5.4. Análise enzimática da rizosfera 37
Fosfatase 37

Hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador da atividade microbiana no solo 37

Beta Glicosidase 38

4.6. Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNAdas amostras de solo 38

5. Resultados e discussão 41

5.1. Triagem para características benéficas e identificação molecular 41

5.2. Testes bioquímicos quantitativos 47

5.3. Bioensaio em casa de vegetação 51

5.4. Análise enzimática da rizosfera 62

5.5. Sequenciamento do gene 16SrRNA das amostras da rizosfera 65

5.6. Efeito dos inoculantes na comunidade bacteriana da rizosfera 67

6. CONCLUSÃO 86

REFERÊNCIAS 87

ANEXOS 102

1. INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma das culturas mais importantes do mundo, ocupando cerca de 17% do total de terras cultivadas e fornecendo alimento básico para aproximadamente 35% da população mundial (Laino et al., 2015). Esta cultura foi um dos primeiros cultivos agrícolas domesticados há cerca de dez mil anos no Crescente Fértil, localizado no Sudoeste da Ásia e, desde então, passou por um processo de grande expansão em todo o mundo (Bell, 1987).

As plantas são colonizadas e vivem em associação com milhares de microrganismos de diversos grupos.Estudos revelam que eles podem causar efeitos profundos na germinação de sementes, vigor de plântulas, crescimento e desenvolvimento de plantas, nutrição, proteção a doenças e produtividade (Mendes et al., 2013). Em troca, as plantas direcionam o seu carbono produzido por fotossíntese para diversas regiões, como, por exemplo, a rizosfera, e assim fornecem substrato para as comunidades microbianas (Mendes et al., 2013). Dessa forma, os vegetaissão capazes de regular a diversidade e atividade dos microrganismos nas raízes e, ao longo dacoevolução algumas plantas conseguiram estimular microrganismos com características positivas para crescimento e saúde, em seu próprio benefício.

Diante deste cenário, a utilização de microrganismos benéficos na agricultura se mostra como uma chave para o aumento da produtividade e uma forma promissora de superar os desafios de produzir alimento para uma população em constante crescimento, gerando economia na adubação (Muller, 2013), principalmente por estarem relacionadasa processos como solubilização de fosfatos, produção de fitormônios (Bashan E Holguin, 1997) e aumento da absorção de nutrientes minerais e água que atribuem características vantajosas aos hospedeiros.

Um estudo anterior realizado pelo grupo de pesquisa considerou materiais crioulose cultivares modernos de trigo em uma abordagem independente de cultivo onde foram utilizados primers específicos para acessar comunidades de bactérias (16S rRNA), fungos (ITS1/ITS2) e cercozoários (18S), e os resultados indicaram que as variedades crioulas sustentam na rizosfera um microbioma diferente e mais complexo do que o microbioma de cultivares modernos de trigo (Rossmann et al., 2020). Portanto, o objetivo deste trabalho foiisolar e caracterizar a diversidade de comunidades bacterianas associadas à rizosfera de cultivares melhoradas e variedades crioulasde trigo e então estudar o impacto destes isolados na promoção de crescimento de trigo e na comunidade bacteriana da rizosfera em variedades comerciais de trigo. Os resultados poderão fornecer conclusões sobre a utilização de bactérias

e consórcios microbianos que podem operar importantes funções de crescimento e proteção para as plantas, contribuindo na busca por inovações que sejam mais sustentáveis para aagricultura e no desenvolvimento de inoculantes.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foiobter bactérias promotoras do crescimento de trigo avaliando o impacto no desenvolvimento da planta e na comunidade bacteriana da rizosfera.

2.1. Objetivos específicos

a) Isolar e identificar bactérias da rizosfera de variedades melhoradas e crioulas de trigo;

b) Realizar testes bioquímicos com as bactérias isoladas a fim de averiguar a presença de características relacionadas à promoção de crescimento;

c) Avaliar os isolados quanto ao potencial de promoção de crescimento em condições de casa de vegetação;

d) Avaliar o efeito da inoculação das bactérias benéficas no desempenho da planta e na comunidade bacteriana da rizosfera (sequenciamento 16S rRNA);

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A cultura do Trigo

O trigo (*Triticum aestivum*) é uma gramínea pertencente à família Poaceae, e se caracteriza por ser uma espécie hexaploide (2n=42), originadade uma hibridação natural entre um tetraplóide e uma gramínea selvagem (Scheeren et al., 2015). Produz grãos comestíveis classificados como cereais e que apresentam uma grande relevância alimentar, tanto por sua qualidade e quantidade de proteínas quanto pela variedade de produtos derivados, tornando esta cultura uma das mais produzidas no mundo (CNNPA, 1978; Santos, 2017). Além da sua integração com numerosas cadeias produtivas, sobretudo no setor de alimentos, também serve como matéria prima para alimentação animal (Farias et al., 2017).

Em relação à produção agrícola, se destaca como uma cultura importante e parceira principalmente da soja no tocante à promoção da sustentabilidade da agricultura, como alternativa para sucessão e rotação em sistemas de produção e formação de palhada para cobertura, contribuindo na logística e eficiência da manutenção das áreas onde é tradicionalmente cultivado (Mori, 2015; Pires, 2017).

Pesquisadores e produtores desta cultura possuem um grande desafio pela frente, visto que a produção deste cereal deve ser aumentada em cerca de 60% até 2050 para atender a demanda de uma população em constante crescimento (FAO, 2013). A preocupação com a qualidade do grão que será colhido deve ser iniciada desde a implementação da cultura no campo, uma vez que a variedade da semente, as condições de solo, o manejo adotado, entre outros, afetam diretamente as características do produto final (Pinto et al., 2017).

Os principais países produtores de trigo são a União Européia, China, Índia e Rússia, que juntos somam aproximadamente 60% da produção mundial, estimada em 771,46 milhões de toneladas (USDA, 2019). No Brasil, as áreas destinadas a lavouras de trigo somam mais de 2 milhões de hectares e espera-se uma produção de 5,49 milhões de toneladas na safra 2019/2020 (Conab, 2020), com destaque para a região Sul do país que concentra a maior parte destes indicadores. Entretanto, apesar das estimativas da produção de trigo no Brasil aumentar nos próximos anos, ainda assim o país deve manter-se como um grande importador mundial (MAPA, 2018).

O crescimento da produção de grãos de trigo observada nos últimos anos ocorreu principalmente devido ao seu aprimoramento genético. A seleção de cultivares com alto potencial produtivo, elevada estabilidade de produção, alta capacidade de adaptação às

condições ambientais, aliada às qualidades agronômicas, são os principais objetivos da maioria dos programas de melhoramento (Santos, 2017). Vale ressaltar que os trigos primitivos possuíam espigas frágeis e grãos com características menos atrativas, bem diferentes das plantas modernas, sendo necessários milhares de anos de seleção natural e artificial para chegar aos genótipos cultivados atualmente (Scheeren et al., 2015).

3.1. Diversidade microbiana no solo

Os microrganismos representam as formas de vida mais abundantes do planeta e possuem a maior proporção da diversidade genética global estimada (Lambais et al., 2005). O solo é considerado como um dos principais reservatórios de diversidade biológica, sendo que em apenas um grama de solo são encontradas de 10^7 a10^9 células ativas. Caracterizando-o como um sistema vivo, extremamente dinâmico e complexo (Alexander, 1977; Cardoso et. Al., 2016).

A importância dessas comunidades microscópicas no solo está relacionada com seu papel fundamental nos ciclos biogeoquímicos (Paul, 2014), pela decomposição da matéria orgânica (Neill et al., 2006), formação e manutenção da estabilidade dos agregados além da capacidade de desempenhar funções no controle biológico e biorremediação (Bollag et al., 1994; Whipps, 2001; Gadd, 2010). A diversidade microbiana do solo é uma medida da heterogeneidade dentro da comunidade de microrganismos que habitam este ambiente (Weinmann, 2017).

Em particular, altos níveis de diversidade e atividade biológica têm sido associados à capacidade de longo prazo dos solos naturais e agrícolas de fornecer suprimento adequado de nutrientes minerais às plantas, melhorando o crescimento sob condições ambientalmente estressantes e aumentando a adaptação e resiliência das culturas (Brussaard et al., 2004; van Bruggen et al., 2006).

Por muitos anos os enfoques para avaliar a qualidade do solo eram dados principalmente nos atributos físicos e químicos, subestimando-se o papel da biota do solo. No entanto, muitos desses atributos são afetados diretamente pelos processos biológicos (Lee, 1994). Sendo assim, o conhecimento das comunidades microbianas presentes no solo (diversidade genética) e sua relação com os processos que acontecem no sistema (diversidade funcional) nos possibilitam entender e avaliar a dinâmica ecológica existente, podendo os microrganismos atuar como bioindicadores da qualidade do solo (Lambais et al., 2005; Bispo et al. 2009; Ritz et al. 2009; Griffiths et al. 2016).

A diversidade microbiana pode ser avaliada principalmente por meio de índices matemáticos, utilizados para descrever o estado das comunidades microbianas e o efeito das perturbações naturais ou antropogênicas (Turco et al., 1994). Esses índices levam em consideração informações taxonômicas na definição das unidades de medida. Sendo alguns desses índices: o de diversidade, de ShannonWeaver, Simpson e Hill; de riqueza, de Margalef e Menhinik; e de equitabilidade, de Pielou, que fornecem informações importantes acerca do padrão de distribuição de espécies microbianas dentro de um ecossistema (Kennedy, 1999).

Em relação à interação entre esses microrganismos e as plantas, estudos iniciais concentravam-se apenas em evidências patogênicas, relacionando a presença de microrganismos à ocorrência de doenças (Andreote et al., 2014). Agora já é reconhecido que a grande maioria dos organismos microbianos não são agentes causadores de danos nas plantas, e inclusive descobertas mais específicas como a fixação biológica de nitrogênio e supressão de patógenos, demonstram que os microrganismos são chaves para o funcionamento do sistema solo-planta. (Mendes et al., 2013; Jacoby et al., 2017).

Sendo assim, um solo saudável é aquele que fornece além de um substrato físico-químico favorável para o crescimento radicular e a aquisição de nutrientes das plantas, também hospeda uma comunidade biótica ativa (Alabouvette et al., 2004; Janvier et al., 2007). Sendo que o desenvolvimento das plantas e as práticas agrícolas utilizadas no solo podem modificar a fisiologia e a estrutura genética das comunidades microbianas da rizosfera, como demonstrado em um trabalho realizado por Di Salvo et al. (2018), que analisou a resposta agronômica e a ecologia microbiana do trigo sob inoculação de *Azospirillum brasilense* e adubação nitrogenada em condições de campo.

3.2. Bactérias benéficas para as plantas

Os microrganismos associados às plantas podem gerar respostas benéficas, prejudiciais ou neutras ao desenvolvimento de seu hospedeiro. As bactérias que causam efeitos positivos são comumente denominadas de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). As primeiras descobertas desses microrganismos foram relatadas por volta do ano de 1890, após Hellriegel (1831-1895) e Wilfarth (1853-1904) observarem a capacidade de plantas leguminosas em fixar o nitrogênio atmosférico por meio de microrganismos presentes nos nódulos de suas raízes e o posterior isolamento e descrição de uma bactéria do gênero *Rhizobium* por Beijerinck (1851-1931).

Estes estudos foram importantes para a elucidação do ciclo do nitrogênio e também para alavancar os estudos das associações das plantas com microrganismos. E então,

reconhecendo a necessidade de maiores produtividades agrícolas e com a possibilidade desta associação ser utilizada como ferramenta na agricultura, as pesquisas com a fixação biológica do nitrogênio passaram a ter um enfoque agronômico principalmente na primeira metade do século XX (Araujo, 2013).

No Brasil, bactérias associativas fixadoras de nitrogênio em gramíneas tropicais foram identificadas em estudos pioneiros realizados por Johanna Döbereiner (1924-2000), que observava que algumas essas plantas permaneciam verdes mesmo sem serem fertilizadas com nitrogênio (Döbereiner, 1966; Döbereiner, 1972; Coelho, 2000; Südhoff, 2006). Desde então, o estudo desses microrganismos benéficos para as plantas aumentou e várias formas de associação foram sendo descobertas. Dentre os gêneros mais comuns de bactérias benéficas para as plantas destacam-se: *Pseudomonas, Burkholderia, Bacillus, Bradyrhizobium, Rhizobium, Gluconacetobacter, Herbaspirillum* e *Azozpirillum* (Hungria et al., 2010; Videira et al., 2012).

As bactérias promotoras de crescimento podem interagir com o hospedeiro através de processos simbióticos, endofíticos ou associativos, e podem estar presentes em todos os tecidos da planta ou até mesmo no solo (Souza et al., 2015). As BPCP podem contribuir com o aumento do rendimento da cultura e também aliviar os efeitos de estresses bióticos ou abióticos por diversos mecanismos diretos ou indiretos (Chauhan et al., 2015).

A promoção direta do crescimento ocorre quando as bactérias aumentam o crescimento das plantas por favorecerem a disponibilidade de nutrientes ou a regulação hormonal do hospedeiro (Lugtenberg et al., 2009). Incluindo mecanismos como a fixação de nitrogênio (dos Santos et al., 2019); solubilização de fosfato ou produção de sideróforos (Nassal et al., 2018); e fornecimento de hormônios como o ácido indol-acético (Kafrawi et al., 2014). Já a promoção indireta do crescimento vegetal ocorre quando BPCP favorecem o desenvolvimento do hospedeiro suprimindo o crescimento ou a atividade de patógenos de plantas (Chung et al., 2008).

Alguns trabalhos mostram que as plantas possuem a capacidade de atrair ou repelir microrganismos utilizando diferentes estratégias (Mendes et al., 2011; Schulz-Bohm et al., 2018). Embora ainda seja em parte desconhecido como atuam esses mecanismos, é evidente que a taxonomia limitada dos microrganismos associados a plantas, comparada com a vasta diversidade destes no solo, sugere que as plantas atuem para o favorecimento de um nicho microbiano altamente seletivo (Finkel et al., 2017).

Entre os mecanismos apresentados capazes de favorecer o desenvolvimento das plantas, não está claro se um traço individual ou um conjunto de características poderia ser

preditivo da promoção do crescimento (Akirinlola et al., 2018). Inclusive alguns pesquisadores sugerem que um consórcio de bactérias poderia ser mais eficaz para promoção de crescimento vegetal do que uma única bactéria (Sundaramoorthy et al., 2012).

Diversos estudos realizados com plantas de trigo demonstram o potencial das bactérias promotoras de crescimento para essa cultura. Arkhipova et al. (2019) avaliou o efeito da inoculação de sementes com esses microrganismosna produtividade do trigo e mobilidade de fósforo na rizosfera e observou que todas as linhagens estudadas foram capazes de colonizar o sistema radicular da planta e resultaram em um aumento na mobilidade do fosfato na rizosfera e teor de auxina nas raízes. Além disso, observou-se o aumento nos componentes da produção de trigo nas sementes que foram tratadas.

O consórcio de três rizobactérias também aumentou significativamente a germinação, o comprimento das raízes e da parte aérea e o peso fresco e seco da planta de trigo em comparação à inoculação única de qualquer rizobactéria e controle não inoculado em um trabalho realizado por Kumar et al. (2018) para avaliar os efeitos do consórcio e da cepa individual na promoção do crescimento, biocontrole e absorção de nutrientes neste cereal.

Em adendo, foi demonstrado que a inoculação com *Bacillus* sp. e *Pseudomonas* sp. (considerados promotores do crescimento de plantas) diminuiu a população de pulgões e aumentou o rendimento dos grãos em até 35% em plantas de trigo cultivadas em campo (Naeem et al., 2018). Reforçando a capacidade desses microrganismos de incrementar a produção e controlar pragas agrícolas sem causar danos ambientais, como observados em fertilizantes químicos e pesticidas utilizados em larga escala.

Um trabalho realizado por Donn et al., 2014 demonstrou que a plasticidade na rizosfera gerada a partir do manejo do sistema radicular das culturas e da genética oferece a promessa de manipular a ecologia do solo em sistemas intensos de cereais. Portanto, entender os mecanismos que governam a interação planta-microrganismo, bem como os processos moleculares que os facilitam pode ter um efeito direto na agricultura, possibilitando uma transformação na nossa compreensão sobre a relação planta-microrganismo na natureza e levar o estabelecimento de novas estratégias orientadas pelo microbioma, resultando no progresso de uma agricultura mais eficaz e sustentável (Andreote et al., 2014; Finkel et al., 2017).

3.3. O Microbioma da rizosfera

O termo microbioma pode ser designado como um conjunto de microrganismos que ocupam simultaneamente um ambiente ou que habitam um determinado hospedeiro (Boon et al., 2014). Este conceito,referindo-se aos microrganismos que habitam o corpo humano,foi sugerido pela primeira vez em 2001 (Lederberg et al., 2001). Desde então diversos estudos foram realizados a fim de conhecer e desvendar a importância desses seres, que chegam a ser considerados como uma extensão do genoma do seu hospedeiro. Sendo que o ápice das descobertas veio através do "Projeto Microbioma Humano", que caracterizou completamente as comunidades microbianas que compõem o nosso corpo (Peterson et al., 2009; Huttenhoweret al., 2012).

De forma semelhante, o microbioma das plantas é cada vez mais atribuído como um fator determinante da saúde e produtividade vegetal (Berg et al., 2015), sendo que abordagens mais profundas sobre a estrutura e função dessas comunidades evidenciam a capacidade de controlar várias características do hospedeiro, como metabolismo, nutrição e fisiologia (Ottman et al., 2012). Um estudo realizado por Mendes et al. (2011) demonstrou a capacidade do microbioma da rizosfera em atuar como supressor no solo contra a doença damping-off ocasionada por *Rhizoctonia solani* em beterraba.

A definição de rizosfera foi propostaem 1904, por Hiltner, como uma área em torno da raiz da planta habitada por uma comunidade microbiana que é altamente influenciada por compostos químicos liberados porela. Sua importância é comprovada pela capacidade da planta em recrutar microrganismos benéficos que auxiliam em sua proteção e desenvolvimento para essa região (Berendsen et al., 2012; Bakker et al., 2013; Mendes et al., 2013). Sendo assim, em 1981, Kloepper e Schroth utilizaram o termo "RPCP" rizobactérias promotoras de crescimento de plantas para descrever um subconjunto de bactérias associadas à rizosfera que induzem o aumento do crescimento das plantas após a inoculação em sementes de rabanetes, sendo observado incremento no crescimento das plantas inoculadas já desde este período.

Sabe-se que o solo na região rizosférica é altamente influenciado por exsudatos radiculares, onde as raízes podem regular o pH do solo e alterar a capacidade de tamponamento desta região (Wang et al., 2017). Um estudo realizado por Fan et al. (2017) demonstrou que as comunidades bacterianas no solo fortemente ligado as raízes de plantas de trigo apresentavam uma maior estruturação em rede e interação mais eficiente, o que pode estar associado à rápida ciclagem de elementos e transmissão de sinais na rizosfera.

Ainda não é claro como a interação entre a química do exsudato de raiz e as preferências de substrato microbiano se combinam para influenciar a montagem e sucessão da comunidade rizosférica (Zhalnina et al., 2018), mas é evidente que esta estrutura é o resultado de uma série complexa de interações e feedbacks entre as raízes, os microrganismos e o ambiente físico e químico do solo (Braga et al., 2016; Fitzpatrick et al., 2018).

Dessa forma, a exposição da planta a patógenos ou eventos extremos de temperatura, produtos químicos ou antibióticos pode influenciar a composição da rizosfera e do microbioma, bem como alterações no genoma do hospedeiro também podem refletir na estrutura destas comunidades (Mendes et al., 2011; Turner et al., 2013; Andreote et al., 2017). Em culturas de trigo com diferentes idades e genótipos, foi possível observar uma evolução das comunidades bacterianas no campo da rizosfera, sendo que no início dos estudos as comunidades fortemente ligadas à raiz eram mais simples, e aumentaram em diversidade com a idade da planta e a senescência (Donn et al., 2014).

Frente a isso, alguns autores defendem que o processo de domesticação tem impactado negativamente a composição e a função dos microrganismos associados as plantas, diminuindo os efeitos benéficos observados no hospedeiro (Pérez-Jaramilloet al., 2018). Na cultura da soja isto foi demonstrado em um estudo em que cultivares mais antigas apresentavam maior capacidade de atingirem pleno potencial simbiótico quando comparado a genótipos mais novos (Kiers et al., 2007). Apesar disso, um trabalho realizado por Mendes et al. (2017), que trabalhou analisando diferentes cultivares de feijão comum com níveis variados de resistência ao patógeno *Fusarium oxysporum* sugere que melhoramento para resistência ao fungo pode ter co-selecionado para outras características desconhecidas de plantas que suportam uma maior abundância de famílias bacterianas benéficas específicas na rizosfera com características funcionais que reforçam a primeira linha de defesa.

Dessa forma, sugere-se que o papel da associação microbiana deve ser levado em consideração em futuros programas de melhoramento. E o que se espera é que a pesquisa passe da descrição da composição das comunidades microbianas para a elucidação dos princípios que governam sua montagem, dinâmica e funções, permitindo manipular a ecologia do solo em sistemas intensos de cereais para que esse conhecimento possa ser utilizado na agricultura a favor da saúde e produtividade das plantas (Waldor et al., 2015; Turner et al., 2013; Donn 2014; Andreote et al., 2017; Pérez-jamillo et al., 2017).

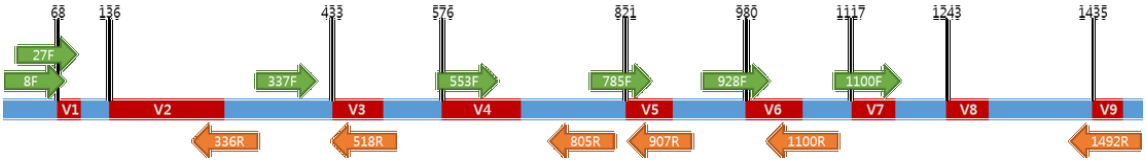
3.4. Uso do sequenciamento do gene 16S rRNA no estudo de bactérias

Tradicionalmente, o estudo de microrganismos associados às plantas é baseado em técnicas de isolamento e cultivo em meio de cultura, sendo estes métodos considerados clássicos e dependentes do crescimento de organismos vivos *in vitro*, proporcionando a caracterização genética e fenotípica dos isolados recuperados (Binneck, 2004; Maheux et al., 2012).

Um marco importante na evolução da sistemática e métodos de caracterização de microrganismos procariotos foi o estabelecimento de análises comparativas das sequências de ácidos nucléicos do RNA ribossomal, inicialmente proposto por Woese e Fox (1977). Por possuírem sequências bem conservadas e estar presente em todas as espécies bacterianas, o gene 16S rRNA satisfaz quase perfeitamente os requisitos básicos de um marcador filogenético geral (Ludwig, 1998), e atualmente é um importante alvo em estudos de evolução bacteriana e ecologia, incluindo a determinação de relações filogenéticas entre os táxons, a exploração da diversidade bacteriana no ambiente e a quantificação da abundância relativa (Hugenholtz et al., 1998; Vetrovsky et al., 2013)

Os ribossomos estão presentes em todos os procariotos, e são organelas compostas por duas subunidades, denominadas 50S e 30S. O gene RNA ribossomal 16S codifica o componente RNA da subunidade 30S do ribossomo bacteriano (Achtman, 2002). Este marcador apresenta regiões conservadas e nove regiões variáveis (Figura 1), onde áreas conservadas refletem relação filogenética entre os organismos que o possuem, e regiões variáveis refletem diferenças entre as espécies (Chakravort et al., 2007). A utilização de primers específicos que se anelam em pares de bases conhecidos possibilita o sequenciamento de uma ou mais regiões de interesse.

Figura 1. Esquema representativo do gene 16S rRNA. Nove regiões variáveis identificadas entre as bactérias são representadas em vermelho, denominadas de V1 a V9. O gene 16S completo é geralmente amplificado pelo par de iniciadores 27F e 1492R. Para obter uma sequência mais precisa, recomenda-se que ambas as sequências de DNA (*forward* e *reverse*) sejam sequenciadas utilizando-se vários iniciadores sugeridos na imagem.



Fonte: Ezbiocloud, 2019.

Portanto, a comparação da sequência deste gene de um isolado com sequências de estirpes tipo de todas as espécies procariotas disponíveis nos bancos de dados possibilita a identificação de bactérias e arqueias em nível de espécie e auxilia na diferenciação entre espécies bacterianas intimamente relacionadas (Kim et al., 2014; Achtman, 2002).

O método molecular tradicional de identificação bacteriana pelo sequenciamento do 16S rRNA inclui etapas como: extração do DNA; amplificação do gene da amostra; determinação da sequência nucleotídica e, por fim a análise da sequência (Santos et al., 2013). Sendo que o DNA utilizado como substrato para as reações é obtido a partir de uma cultura pura que a qual deseja identificar. Entretanto, apenas 1% do total das bactérias do solo podem ser isoladas e cultivadas artificialmente, fazendo com que todo o conhecimento gerado através de abordagens dependentes de crescimento *in vitro* represente uma pequena proporção da diversidade bacteriana total existente (Torsvik et al., 1990).

Com o advento das plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS) e análise de alto rendimento, os pesquisadores adquiriram novas oportunidades para investigar a composição indeterminada de microrganismos (Misra et al., 2017). Cada vez mais os estudos voltados para um gene ou uma função de cada vez dão lugar para a análise quantitativa de centenas de genes, caracterizando uma abordagem de integração comparativa de dados interespecíficos (Binneck, 2004). A análise da estrutura da comunidade pela extração direta de DNA do solo é considerada por alguns autores como o melhor método disponível para demonstrar como as populações são afetadas por perturbações e como isso refletirá qualidade do solo (Melloni, 2007).

Portanto, a extração direta de material genético do ambiente como um todo, conceituado como “metagenômica” (Handelsman et al., 1998), pode ser considerada como uma verdadeira ferramenta de descoberta para identificar e caracterizar novas famílias de genes (Nacke et al., 2011), traços metabólicos (McGarvey et al., 2012), compostos bioativos (Craig et al., 2010) ou comunidades (Illeghems et al., 2015) de microrganismos do solo não cultivados, possibilitando maior resolução e cobertura das análises (Goel et al., 2017).

A metagenômica do solo também tem potencial para melhorar a produção agrícola (Jansson e Hofmockel, 2018). O surgimento de informações sobre o metagenoma da rizosfera expõe informações detalhadas sobre a estrutura, dinâmica e atividades funcionais associadas da comunidade, permitindo uma melhor percepção do desenvolvimento, coordenação interespecífica e competição por nutrientes edistribuição de atividades metabólicas entre os membros associados (Mendes et al., 2013; Ofaim et al., 2017). Além disso, como proposto por Goel et al., 2017 a “engenharia da rizosfera” pode ser explorada através da metagenômica

funcional para remodelar a composição da população microbiana e a atividade microbiana nesta região.

Assim, o acoplamento do método tradicional com abordagens metagenômicas avançadas trará novas abordagens para explorar a vida microbiana no solo. Visto que dados metagenômicos do solo rizosférico revelam possíveis atividades das comunidades microbianas existentes, a aplicação de microrganismos na agricultura através da produção de um inoculante deve progredir em estágios, sendo o primordial deles a captura e a produção do microrganismo *in vitro* (Kaminsky et al., 2018).

3.5. Microrganismos na agricultura

O cenário atual da produção agrícola é altamente depende de fertilizantes químicos, e esses produtos apesar de fornecerem nutrientes essenciais para as plantas podem causar impactos ambientais negativos (Savci, 2012). Além disso, a enorme quantidade de energia e água necessária para a síntese dos químicos contribui para o esgotamento dos recursos naturais, evidenciando uma alternativa inviável em longo prazo (García-Fraile et al., 2017).

Não só o excesso de nutriente aplicado no solo, mas também o que é perdido por processos como lixiviação e imobilização acabam fazendo com que nem toda quantidade aplicada seja absorvida pela planta, favorecendo o acúmulo destes produtos no solo. Fox et al. (2007) demonstraram que este excesso de contaminantes, pode reduzir o rendimento dos cultivos, gerando um ciclo vicioso, onde os agricultores tendem a aplicar cada vez mais produtos químicos para incrementar a produção que por sua vez aumentam ainda mais a contaminação do solo e das águas subterrâneas (Fernandéz, 2008).

Diante deste cenário, a busca por microrganismos benéficos é importante pois possibilita o desenvolvimento de produtos biológicos eficientes para a agricultura, sem gerar impactos ambientais e afetar a produtividade (Majeed et al., 2015). Um estudo realizado na cultura do trigo comparou a eficácia de um inoculante microbiano a um fertilizante mineral à base de rocha e um fertilizante químico, e demonstrou que o tratamento com microrganismos não apenas aumentou o crescimento da parte aérea na maturidade da planta, como estimulou o rendimento de grãos de trigo ao mesmo nível que os fertilizantes sintéticos (Assainar et al., 2018).

De acordo com a legislação brasileira, o inoculante é o produto que contém microrganismos com ação favorável ao crescimento das plantas, enquanto biofertilizantes são produtos que contém princípio ativo ou agente orgânico, isento de substâncias agrotóxicas,

capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante (Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004). Na prática, o termo biofertilizante é comumente empregado de forma generalizadaà formulações de microrganismos vivos que quando aplicado a sementes, superfícies de plantas ou solo, colonizam a rizosfera ou o interior da planta e promovem o crescimento (Vessey, 2003; Bucher et al., 2008).

A inserção de fertilizantes sintéticos na produção agrícola remediou a dependência da ciclagem de nutrientes, que é uma das principais funções microbiana no solo. Como resultado, variedades modernas podem ter perdido sua capacidade de sustentar microbiomas que degradam o nitrogênio orgânico e solubilizam nutrientes minerais como o fósforo (Wallenstein, 2017). Assim sendo, a restauração da diversidade microbiana pode melhorar simultaneamente a produção agrícola e condições do solo, necessitando-seselecionar microrganismos benéficos competitivos e com boas habilidades de colonização para o desenvolvimento de um microbioma com características de interesse (Rojas-Solís et al., 2016; Andreote et al., 2017).

Como sugerido por Santoyo et al., 2017, o suporte para que plantas diferentes consigam se desenvolver em diferentes latitudes ou altitudes, suportar solos pobres em nutrientese apresentar diferentes níveis de tolerância a estresses bióticos ou abióticos em muitos casos, pode ser atribuída ao seu microbioma. Dessa forma, seria interessante conseguir transferir essas capacidades para as plantas que não as possuem (Yuan et al., 2016).A "engenharia de microbiomas" apresenta uma estratégia viável para resolver problemas associados à agricultura de uma forma ecológica (del Carmen Orozco-Mosquedaet al., 2018), sendo que pode ser consolidado através de práticas de gestão agrícola que visem promover e melhorar a diversidade microbiana do solo (Foo et al., 2017). Espera-se que a medida que for possível projetar a rizosfera que interage com as raízes das plantas, será possível melhorar a eficiência e a sustentabilidade da produção agrícola apenas emulando as interações simbióticas entre plantas, solos e micróbios que evoluíram ao longo de milhões de anos na natureza (Wallenstein, 2017).

Diversos inoculantes microbianos já estão disponíveis no mercado (AGROFIT, 2019). Especificamente para a cultura do trigo, o primeiro inoculante que obteve registro para esta cultura no Brasil foi registrado no ano de 2011 e contém as estirpes Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* (Embrapa, 2019). Desde então vários outros produtos desta categoria foram sendo registrados e o que se espera para a próxima década é uma grande expansão do

uso de inoculantes, tornando a agricultura brasileira ainda mais competitiva e sustentável (Castro, 2019).

Entretanto, um dos desafios na difusão do uso de biofertilizantes se dá pela variação das respostas em diferentes cultivares hospedeiras e locais de campo (Kaminsky et al., 2018). Formulações bacterianas com BPCP podem não apresentar a resposta esperada, por serem dependentes de vários fatores que limitam sua eficácia (Dobbelaere et al., 2001). Alguns principais que podem ser citados são o conteúdo mineral do solo, o tipo de cultura e seu genótipo, a cepa bacteriana, condições ambientais e a competição com os outros microrganismos presentes no solo (Bashan et al., 2014).

Ainda assim, em comparação com pesticidas e fertilizantes químicos ou sintéticos, os biofertilizantes apresentam vantagens, pois além de serem mais seguros e não causarem impactos ambientais, apresentam atividade mais direcionada e fornecem a planta a quantidade requerida de nutrientes (Mahanty et al., 2016). Também se decompõem mais rapidamente do que os insumos agrícolas tradicionais, podendo também ser uma alternativa em sistemas convencionais ou integrados de controle de pragas (Singh et al., 2011; Grobelak, et al., 2018).

Dessa forma, estudos e investimentos são necessários em tecnologias que possam contribuir para aumentar a eficiência do inóculo e a taxa de sobrevivência de bactérias, fornecendo um microambiente mais adequado, combinado com proteção física por um período prolongado no solo para conter o rápido declínio das bactérias introduzidas (Bashan et al., 2014; Finkel et al., 2017). Além da importância em conhecer a diversidade local existente, visto que inóculos eficazes devem ser capazes de formar associações com o restante do microbioma, sobressaindo-se sobre as redes fortemente estruturadas nos solos da rizosfera nativa (Fan et al., 2017).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Ambiental (LMA), pertencente a Embrapa Meio Ambiente, no município de Jaguariúna-SP.

4.1.Material vegetal utilizado para obtenção dos isolados

A escolha dos materiais vegetais utilizados para obtenção das comunidades microbianas foi realizada de acordo os seguintes critérios: disponibilidade no Banco de Germoplasma da Embrapa Trigo, pertencentes à espécie *Triticuma estivum* e capazes de crescer e se desenvolver nas condições climáticas de São Paulo. Além disso, trabalhos anteriores realizados no grupo de pesquisa demonstraram que a montagem da rizosfera é diferente e mais complexa em materiais ancestrais (Rossmann et al., 2020), sendo assim selecionamos genótipos contrastantes para condução deste estudo. Foram escolhidas duas variedades crioulas: Karakilcik (originado na Turquia), Iran 1-29-11334 (originado no Iran), considerando o centro de origem, e duas variedades comerciais, BRS Guamirim, originada em 2005, e Quartzo, originada em 2007. O solo agrícola usado nesse estudo foi coletado na cidade de Assis – SP (coordenadas: 29° 39’ 42’’ S e 50° 24’ 44’’ O) para crescimento dos genótipos e posterior coleta do solo rizosférico e isolamento. Outros genótipos de trigo comerciais foram selecionados de acordo com a recomendação da Embrapa Trigo para os ensaios em casa de vegetação.

4.2.Obtenção e conservação dos isolados

O solo rizosférico de cada uma das amostras foi coletado na fase reprodutiva das plantas, segundo o código decimal 60-69 e 70-79 para as fases de crescimento dos cereais de Zadoks, Chang e Konzak (1974) e diluído em solução salina 0,85%, compondo a primeira diluição (10^{-1}) da diluição seriada. Posteriormente 1 ml dessa soluçãofoi adicionado a 9 ml de solução salina, que correspondeu a diluição de 10^{-2} e assim por diante, até o tubo de diluição 10^{-5}. As diluições 10^{-3},10^{-4} e 10^{-5} foram selecionadas para o trabalho.

Um volume de 100 µl das diluições 10^{-3},10^{-4} e 10^{-5} foi transferido para placas de TSA (*TrypticSoy Agar*) 1:10 e espalhados com a alça de Drigalski. O procedimento foirealizado com 3 repetições para cada diluição, totalizando 144 placas que foram incubadas à 28°C por 4 dias.

Após o período de incubação, foi realizada a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs) resultantes das três diluições do solo rizosférico. Foram selecionadas placas que continham um número de colônias dentro do intervalo de precisão e repetibilidade, descartando-se as placas com contagens de UFCs maiores que 300 e menores que 30. Dentre as que restaram, uma placafoi escolhida para cada uma das 16 amostras que melhor representasse a comunidade microbiana.

O isolamento foi feito através da técnica de esgotamento por estrias simples transferindo colônias das placas de diluição para placas de TSA. O próximo passo foi a preservação dos isolados de duas formas: em Castellani, utilizando água ultrapura autoclavada três vezes, e em glicerol 20%. O volume de 1,5 ml de cada uma dessas soluções foi adicionado em um tubo criogênico, onde os isolados foram depositados. O Castellani foi mantido na geladeira a 4°C e o glicerol em -80°C.

4.3.Triagem de isolados para características benéficas

4.3.1. Antagonismo contra patógenos de solo

Para este teste, os fungos *Bipolaris sorokiniana* e *Fusarium graminearum*, dois patógenos de trigo, foram repicados em BDA (Batata Dextrose Ágar) e incubados por 5 dias. Foi retirada uma alíquota de 20 µl dos tubos do Castellani para o crescimento dos isolados em meio GY (10 g de extrato de levedura; 15 g de Agar; 0,01 g de $FeSO_4.H_2O$; 0,5 g de KCl; 0,5 g de $MgSO_4$; 1 g de K_2HPO_4 e 10 g de dextrose, para 1L de água destilada) por 24 h. Em placas de Petri contendo BDA foi colocado um disco do fungo com 4 isolados para um *screening* inicial. Posteriormente, aqueles isolados que inibiram o crescimento dos fungos foram testados individualmente com triplicatas. Foram medidos o diâmetro do halo de inibição, o diâmetro da colônia e o tamanho do fungo.

4.3.2. Produção de Ácido Indol-Acético

Os isolados foram submetidos à avaliação da produção de ácido indol-acético (AIA) primeiramente de forma qualitativa e posteriormente algumas estirpes selecionadas foram verificadas quanto à produção de AIA pelo uso do método quantitativo colorimétrico adaptado por Quecine (2010). Para o teste, os isolados foram inoculados em meio tripticaseína de soja (TSB) 10% contendo 5 mM de L-triptofano e incubados no escuro a 28°C por 72 h

sob agitação constante. Após este período, as culturas foram centrifugadas por 5 min a 10.000 g e 900 µl do sobrenadante foi coletado e transferido para cubetas contendo 400 µldo Reagente de Salkowski (Bric et al., 1991). Após duas horas de incubação a temperatura ambiente foi realizada a leitura das amostras, preparadas em triplicatas, no espectrofotômetro com comprimento de onda de 520 nm de absorbância. As leituras foram normalizadas por meio da curva padrão com diferentes concentrações de AIA comercial. Foi utilizada uma bactéria previamente reconhecida pela capacidade em produzir ácido indol-acético através de testes laboratoriais como controle positivo, fornecida pela Coleção de Microrganismos da Embrapa Meio Ambiente.

4.3.3. Solubilização de fosfato

Para o teste qualitativo de solubilização do fosfato os isolados foram repicados em meio GY e incubados à 28°C por 48 h, posteriormente inoculados em meio NBRIP (Nautiyal, 1999), composto por 10 g de $C_6H_{12}O_6$; 5 g de $MgC_{l2}.6H_2O$; 0,25 g de $MgSO_4.7H_2O$; 0,2 g de KCl; 0,1 g de $(NH_4)_2SO_4$; 5 g de $Ca_3(PO_4)_2$ e 15 g de ágar para 1 L de água destilada. As placas foram feitas em triplicatas e mantidas em B.O.D à 28°C e a avaliação realiza após 15 dias. Os isolados que formaram halo no entorno da colônia foram considerados como capazes de solubilizar o fosfato do meio de cultura. Como controle positivo foi utilizado uma bactéria previamente reconhecida pela capacidade de solubilizar fosfato (Kavamura et al., 2013) pertencente a Coleção de Microrganismos da Embrapa Meio Ambiente. O teste foi realizado posteriormente com isolados selecionados de forma quantitativa, utilizando-se o mesmo meio de cultura NBRIP de forma líquida (sem adição de ágar), em Erlenmeyers com capacidade de 250 ml contendo 100 ml do meio de cultura e pH ajustado para 7. As bactérias foramcultivadas em meio GY líquido, calibradas para 10^8 UFC.ml^{-1} (DO_{550}=0,1) e 1ml deste inóculo foi transferido para o meio NBRIP. Após 15 dias com agitação constante de 150 rpm e temperatura a 28°C, 1000 µl de cada tratamento foi coletado e transferido para eppendorfs e centrifugados por 5 min a 10.000g. Em seguida, na placa de Elisa, foi adicionado 36 µl do sobrenadante bacteriano, 142 µl de H_2O destilada e 71 µl do reagente molibdato-vanadato de amônio. Após 10 min da adição do reagente as amostras foram lidas em espectofotômetro a 420 nm.

4.3.4. Fixação de Nitrogênio

O teste para averiguação da capacidade das bactérias em fixar nitrogênio atmosférico foi realizado segundo Dobereiner et al. (1995), após um *screening* inicial de outras características benéficas. Para isso, as bactérias foram inoculadas em meio semi-sólido NFB contendo 5 g de ácido málico; 0,5 g de K_2HPO_4; 0,2 g de $MgSO_4.7H_2O$; 0,1 g de NaCl; 0,01 g de$CaCl_2.2H_2O$; 4 ml de Fe-EDTA (solução 1,64 %); 2 ml de azuldebromotimol (0,5 %); 2 ml de solução de micronutrientes (0,2 g L^{-1} de $Na_2MoO_4.2H_2O$; 0,235 g L^{-1} de $MnSO_4.H_2O$; 0,28 g L^{-1}de H_3BO_3; 0,008g L^{-1} de $CuSO_4.5H_2O$); 1,8g de ágar; dissolvido em 1 L de água destilada e pH final ajustado para 6,5. Após incubação a 28°C por cinco dias, os resultados positivos foram caracterizados pela alteração da cor do meio de cultura e formação de um véu característico. Os experimentos foram realizados em triplicatas e como controle positivo utilizou-se uma estirpe de *Azospirillum brasilense* (Hungria, 2011) cedida pela Embrapa Agrobiologia.

4.4.Identificação molecular dos isolados bacterianos por seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA

4.4.1. Extração do DNA bacteriano e preparo das amostras para seqüenciamento

Os isolados bacterianos foram repicados em meio GY e incubados a 28°C por 48h ou até o aparecimento de colônias. Após o crescimento em placa de Petri e verificação da pureza dos isolados visualmente, as colônias foram transferidas para tubos falcon (50 ml) contendo aproximadamente 25 ml de meio GY líquido. Os tubos foram submetidos à agitação constante e mesmas condições de crescimento anteriormente descritas, por um período de 48h ou até a formação de pellet suficiente para extração de DNA.

O DNA dos microrganismos isolados foi extraído utilizando-se o DNeasy® Ultraclean® Microbial Kit (QIAGEN, Hilden, GER), de acordo com instruções do fabricante. Após obtenção, a qualidade do DNA dos isolados extraídos foram verificadas por eletroforese em gel de agarose a 1% (w/v) e através do aparelho Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA) para prosseguir com a amplificação.

A identificação dos isolados foi realizada por análise de sequência parcial do gene 16S rRNA bacteriano. Para amplificação deste gene no DNA extraído foi utilizado a técnica de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores universais 27 F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT) (Lane et al.,

1991). A reação de amplificação foi feita para 25 µl, e constituiu-se 2,5 µlde tampão 10X, 1,5 µl de $MgSO_4$ 50X, 1 µl deDNTp 10 mM, 0,5 µl de cada um dos primers 10 mM, 0,5 µl deTaq DNA polimerase e 1 µl de DNA, sendo o volume restante completado com água ultrapura (Milli-Q) estéril. As condições de amplificação foram 2 min a 94°C; 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C, com extensão final por 10 min a 72°C.

O produto da PCR de cada uma das amostras foi verificado quanto a qualidade em gel de agarose 1,2% (w/v). A etapa posterior de purificação foi realizada utilizando-se o kit comercial Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up Systen (Promega, Madison, USA) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

Para avaliar a qualidade e pureza dos produtos de PCR purificados foi realizada uma corrida em gel de agarose a 2% e leitura no aparelho Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, USA). Para verificar a concentração de DNA presente nas amostras foi realizada a quantificação através de fluorometria (Qubit 2.0 - Invitrogen).

Ao final as amostras foram enviadas para a empresa Myleus (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) com volume e concentrações previamente preparadas de acordo com especificações recomendadas, onde foi realizado o sequenciamento de DNA por método de Sanger em plataforma ABI 3730 –AppliedBiosystems.

4.4.2. Análise das sequências do gene 16S rRNA e reconstrução filogenética

Os resultados do sequenciamento do gene ribossomal das bactérias foram visualizados utilizando-se o programa Sequencher 4.1.4 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA). As sequências obtidas foram comparadas àquelas disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta BLASTN disponível no National Center for BiotechnologyInformation (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado no programa MEGA 5.0, com o auxílio da ferramenta CLUSTALW e posterior correção manual (Kumar et al., 2018). Para matriz de distância da árvore filogenética foi utilizado o método Maximum Likelihood e o modelo Kimura 2-parameter (Kimura, 1980), sugerido pela ferramenta *Best model* do mesmo programa utilizado para o alinhamento.

4.5.Bioensaio em casa de vegetação

O bioensaio foi realizado em casa de vegetação, pertencente a Embrapa Meio Ambiente, no município de Jaguariúna-SP, no período de maio a julho de 2019 (Figura 2).

O solo utilizado foi coletado em áreas de cultivo da Embrapa Meio Ambiente e apresentava as seguintes características químicas: pH (H_2O): 6,0; P disponível (Mehlich-1): 3 mg dm^{-3}; K (Mehlich^{-1}): 45 mg dm^{-3}; Ca^{2+} (KCl 1 mol L^{-1}): 2,0cmolc dm^{-3}; Mg^{2+} (KCl 1 mol L^{-1}): 1,4 cmolc dm^{-3}; Al^{3+} (KCl 1 mol L^{-1}): 0,1 cmolc dm^{-3}; $H^{+}Al$ (pH SMP 7,5): 4,5 cmolc dm^{-3}. Este foi adubado com 1g de calcário e 0,22 g de Super Fosfato Simples (18% de P) por litro de solo, de acordo com a tabela de recomendação de adubação, para a cultura do trigo irrigado para o Estado de São Paulo (Raij et al., 1997). Como unidades experimentais foram utilizados vasos de polietileno com capacidade para 3 kg, que foram preenchidos com solo já corrigido.

Figura 2 - À esquerda a casa de vegetação pertencente a Embrapa Meio Ambiente onde o ensaio experimental foi conduzido. À direita os vasos com plantas de trigo no interior da casa de vegetação durante a condução do experimento. Jaguariúna, 2019.

4.5.1. Delineamento experimental

Para o experimento em casa de vegetação foi empregado o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com 11 tratamentos (Tabela 1), 5 repetições e 3 genótipos (BRS Reponte, BRS Marcante e BRS Parrudo) (11x5x3 = 165 vasos). Os dados métricos mensurados foram submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Barlett (P> 0,05) para verificar os pressupostos de normalidade de homocedasticidade respectivamente e submetidos à análise

de variância (*one-way* ANOVA), sendo as médias comparadas entre si pelo teste de Scott-Knott (P<0,05) (Scott &Knott, 1974). Para realização das análises utilizou-se o software R (R Core Team, 2019).

Os três genótipos de trigo utilizados para o bioensaio correspondem a cultivares comerciais e escolhidos levando em consideração a área expressiva que estas cultivares representam hoje no Brasil. Sendo que a cultivar BRS Marcante apresenta uma genealogia divergente das demais (BRS Parrudo e BRS Reponte).

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos utilizados no Bioesaio em casa de vegetação.

Tratamento	Descrição	Código*
T1	Controle – sem inoculação de bactérias	-
T2	W2-5/1	CMAA 1742
T3	W2-3/2a	CMAA 1741
T4	W2-3/5	CMAA 1739
T5	C6-3/11	CMAA 1740
T6	W1-5/7	CMAA 1743
T7	W1-2/2	CMAA 1738
T8	W2-5/1 + W2-3/2a + W2-3/5	-
T9	C6-3/11 + W1-5/7 + W1-2/2	-
T10	Todos os 6 isolados	-
T11	*Azospirillum brasilense*	-

*Isolados depositados na Coleção de Culturas de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CMAA) da Embrapa Meio Ambiente

4.5.2. Seleção dos microrganismos e tratamento de sementes

Para os ensaios em casa de vegetação foram selecionadas seis bactérias a partir dos testes e análises descritos anteriormente. Assim, a seleção das bactérias classificadas como benéficas à planta foi baseada nos seguintes critérios: distância filogenética (foram selecionadas bactérias mais distintas filogeneticamente); não patogênicos ouoportunistas a seres humanos; capacidade de solubilizar fosfatos e produzir ácido indol-ácetico; e preferencialmente apresentar antagonismo a fitopatógenos e fixar nitrogênio. Além disso, uma estirpe do *Azospirillum brasilense* V5-b6, fornecida pela Embrapa Agrobiologia, também foi utilizada como controle positivo.

A preparação dos inóculos foi realizada após o crescimento das bactérias em meio de cultura GY líquido, por 48 h a 28°C e agitação constante. Após o crescimento bacteriano, o isolado foi quantificado em espectrofotômetro a 550 nm, sendo padronizada uma densidade ótica de 0,1 (10^8 UFC/ml), por meio de diluição com o mesmo meio de cultura.

Foram separadas 30 sementes de trigo por recipiente, num total de 22 recipientes, sendo dois para cada tratamento, e adicionado 10 ml de cada isolado ao recipiente correspondente a cada tratamento. Em parcelas com combinação entre microrganismos (consórcios), o volume total foi divido pela quantidade de estirpes a serem adicionadas, priorizando-se o volume padrão de inóculo estabelecido.

A suspensão das sementes com os microrganismos foi submetida a agitação leve, por um período de 1 h antes da semeadura. Em cada vaso do bioensaio foram semeadas 6 sementes de trigo (Figura 3). Após dez dias da semeadura foi realizado um desbaste deixando apenas duas plantas por vaso.

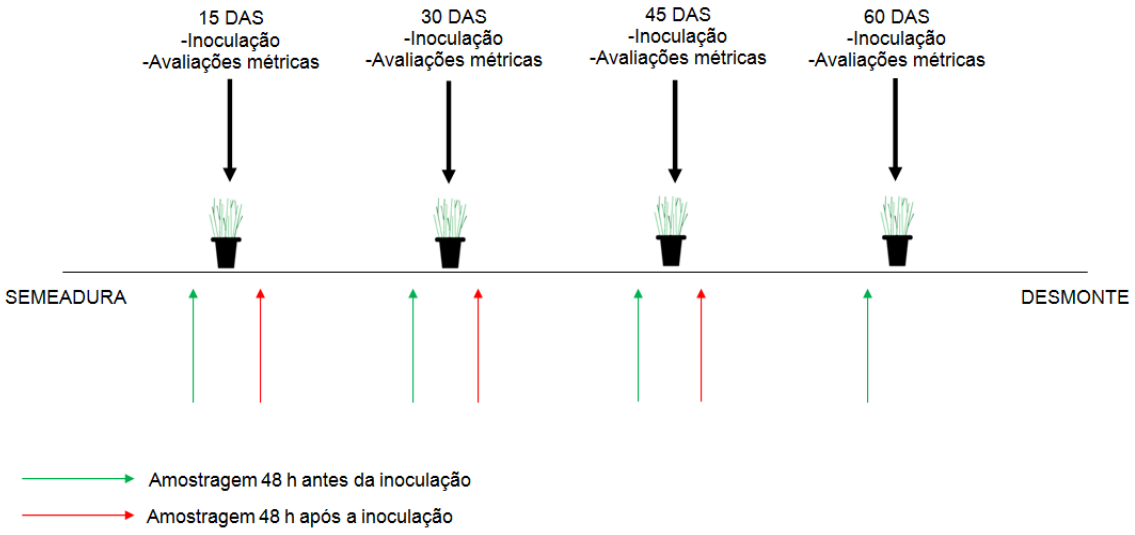
Figura 3 - Plântulas de trigo distribuídas no vaso antes do desbaste. Jaguariúna, 2019.

4.5.3. Condução do experimento

Aos 15, 30, 45, 60 dias após a semeadura (DAS) foi avaliado a altura das plantas, o diâmetro do colmo e teor de clorofila (SPAD). Além disso, nestas mesmasdatas, foi realizado em cada tratamento correspondente a inoculação de 1 ml do isolado bacteriano tendo 10^8 UFC

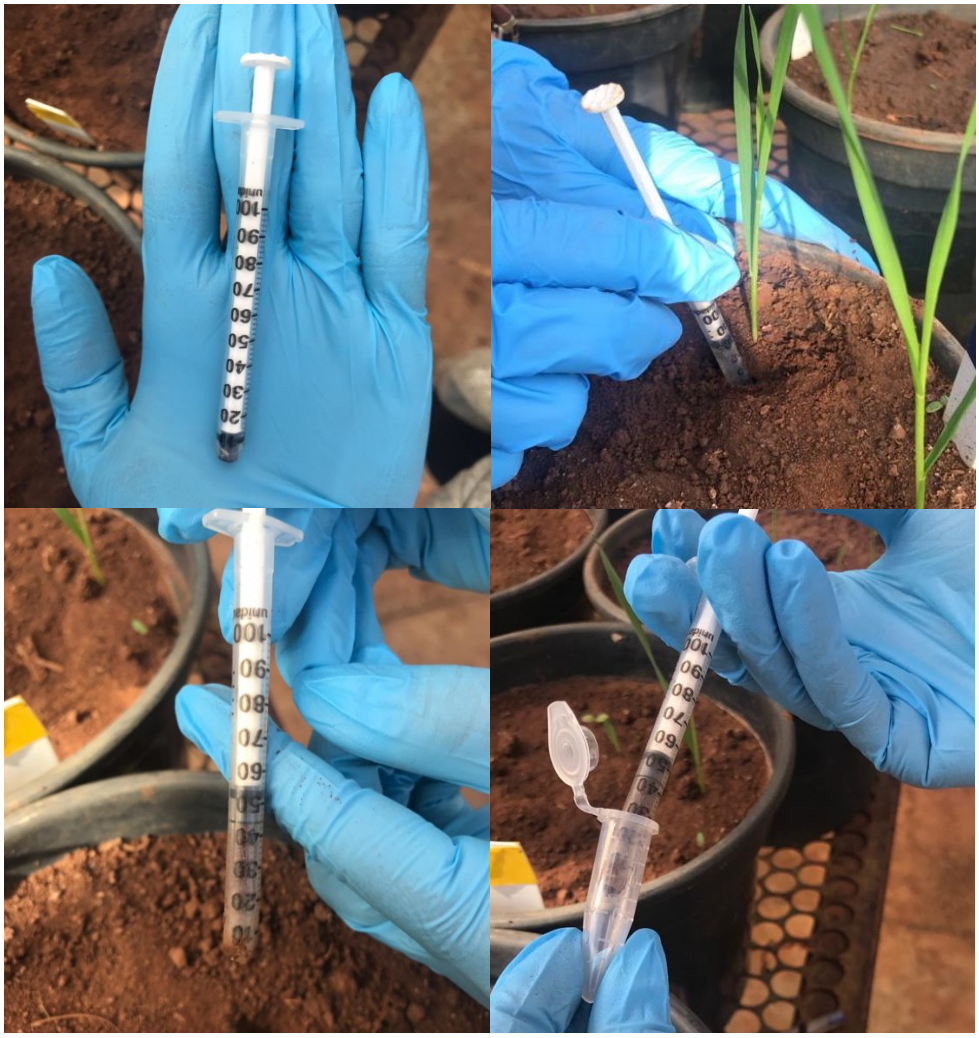
ml^{-1} (DO_{550}= 0,1). Estabeleceu-seque 48 h antes e 48 h após a inoculação dos microrganismos, seriam coletadas amostras do solo altamente influenciado pela rizosfera de cada um dos vasos. Na Figura 4 está demonstrado a condução do bioensaio.

Figura 4 - Representação da dinâmica de inoculação de microrganismos, avaliações fenotípicas e coletas de solo realizadas ao longo do ciclo da cultura do trigo em casa de vegetação. Jaguariúna, 2019.



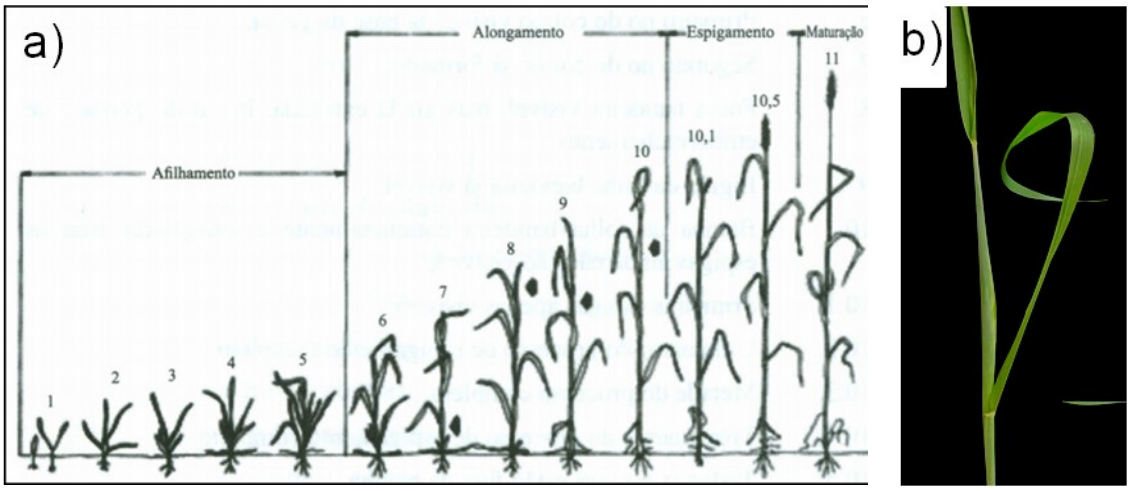
Para as coletas foram utilizadas seringas de 1 ml adaptadas que possibilitaram a amostragem do solo próximo ao sistema radicular planta (Figura 5). Procurou-se manter o mesmo padrão de umidade para todos os vasos, bem como realizar as coletas sempre no mesmo horário e da mesma forma, retirando-se a camada superficial de solo antes de inserir a seringa no vaso e mantendo a mesma profundidade de amostragem. O solo coletado foi transferido para microtubos tipo Eppendorf® e mantidos no freezer a -40°.

Figura 5 - Seringa de 1 ml utilizada para realização das coletas de solo nos vasos. A ponta das seringas foram cortadas para facilitar a penetração no solo. Jaguariúna, 2019.



Após 60 dias do bioensaio, os vasos foram desmontados quando as plantas de trigo alcançaram o estádio de emborrachamento, caracterizado pelo desenvolvimento da bainha da folha bandeira, mas espigas ainda não visíveis, segundo a escala de Feekes e Large (1954) (Figura 6a). A raiz e a parte aérea das plantas foram separadas, pesadas e acondicionadas em sacos de papel e mantidas em estufa até alcançarem peso constante. Nas plantas da cultivar BRS Parrudo, após os vasos serem desmontados e as raízes serem retiradas, amostras de solo da rizosfera foram coletadas para análise enzimática de cada tratamento.

Figura 6 – a) Estádios de desenvolvimento de cereais conforme a escala de Feeks (1940) **b)** Planta de trigo em estádio de emborrachamento (Estádio 10 da escala de Feeks). Esta fase tem início com o crescimento e dilatação da folha bandeira. Jaguariúna, 2019.



Fonte: Scheeren et al. (2015)

4.5.4. Análise enzimática da rizosfera

Fosfatase

Para verificação da atividade da fosfatase, foi utilizado uma sub amostra de 1g de solo e adicionados 4 ml de tampão maleato 0,1M (pH 6,5 para analise ácida da fosfatase), 1 ml da solução de p-nitrofenil fosfato – pNPP 0,002M e incubado a 37°C por uma hora. Após incubação, foi adicionado 1 ml da solução de $CaCl_2$ 0,5 M e 4 ml de solução de NaOH 0,5M, e mantidos sob agitação. A suspensão foi filtrada em papel Whatman n°2 e a formação de p-nitrofenol mensurada em espectrofotômetro a 400 nm (Chavez et al., 2011). Esta análise foi realizada no Departamento de Solos da ESALQ-USP no município de Piracicaba-SP.

Hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) como indicador da atividade microbiana no solo

A análise da hidrólise de diacetato de fluoresceína permite avaliar a atividade dos microrganismos no solo, uma vez que o FDA é hidrolisado por várias enzimas (lipase, protease e esterases) produzidas por células vivas de microrganismos. Em Erlenmeyer de 250 ml foram pesados 5g de solo de cada amostra e adicionados 20 ml de tampão fosfato de potássio e 200 µl da solução estoque de FDA (20 mg de FDA para cada 10 ml de acetona, 2

mg.ml^{-1}. As amostras foramcolocadas em agitador a 160 rpm e incubadas à 25ºC, durante 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 20 ml de acetona por recipiente, com a finalidade de interromper a reação. Todas as amostras foram filtradas utilizando-se o papel de filtro Whatman® n° 1 em funil, recolhendo-se o filtrado em tubos de ensaio. A absorbâncias dos filtrados foi determinada imediatamente em espectrofotômetro a 490 nm (Fernandez et al., 2009).

Beta Glicosidase

Para a análise da atividade da Beta Glicosidase, 1g de solo foi incubado juntamente com 0,1 ml de tolueno por 10 min. Após esse período adicionou-se 0,9 ml de água destilada, 1,5 ml de tampão e 0,6 ml de substrato p-Nitrofenol β-D-glicosidase e foram incubados por 1h. Após o período de incubação foi utilizado etanol para parar a reação e as amostras foram filtradas em papel de filtro. Adicionou-se 2ml de Tris 2M e a atividadeda enzima foi avaliada em espectrofotômetro a 400 nm (Hoffmann e Dedeken, 1965).

4.6.Extração de DNA e sequenciamento do gene 16S rRNAdas amostras de solo

Amostras de solo das três cultivares utilizadas no bioensaio foram coletadas. Entretanto, apenas uma delas, BRS Parrudo, foi selecionada para o sequenciamento do gene 16S rRNAcom o objetivo de identificar, de forma mais ampla e detalhada, a diversidade microbiana presente.

A obtençãodo DNA do solo foi realizada utilizando-se kit comercial DNeasy®PoweSoil® (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.O DNA foi eluído em 50 µL da solução C6 e mantido em freezer a –20ºC para as etapas posteriores.A eficiência do método de extração e a qualidade do material extraído foram avaliados por meio da eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Uniscience) e visualização em transluminador e através do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific, Waltham, USA).

Após a extração do DNA total, as amostras foram enviadas para construção das bibliotecas e sequenciamento de *amplicons* do gene 16SrRNA utilizando a plataforma Miseq-Illumina pela empresa Argonne (EUA). A quantificação do DNA extraído foi realizada por fluorimetria (Qubit®) e o preparo para envio realizado de acordo com especificações da própria empresa. Os iniciadores utilizados na reação de amplificação foram o 515F

(GTGNCAGCMGCCGCGGTAA) e o 926R (CCGYCAATTYMTTTRAGTTT), os quais delimitam a região V4 e parte da região V5 da subunidade 16S do RNA ribossomal de Archaea e Bacteria (Quinceet al., 2011)

4.7.Análises de bioinformática

As sequências obtidas a partir do sequenciamento de 16S rRNA foram pré-processadas usando QIIME v.1.9 (Caporasoet al., 2010). As leituras *forward* e *reverse* geradas foram conjuntas pelo método fastq-join (Aronesty, 2011), seguidas pela demultiplexação, remoção de *barcodes* e sequências de primers. A filtragem de qualidade das sequências foi realizada considerando o limiar de qualidade de Phred superior a Q20. A seleção da Unidade Taxonômica Operacional (OTU) foi realizada identificando as sequências representativasde forma fechada (*ClosedReference*) comparadas em relação a coleção de sequenciasdo *GreenGenes*, o alinhamento foi realizado por meio da ferramenta PyNAST (Caporaso et al., 2010); e a classificação taxonômica e árvore filogenética foi atribuída considerando o banco de dados *Green Genes* (disponível em https://github.com/biocore/qiimedefaultreference/tree/master/qiime_default_reference/gg_13_8_otus).

Uma PERMANOVA (Análise Multivariada Permutacional de Variância) foi realizada para acessar o efeito de cada tratamento na comunidade microbiana da rizosfera usando a função ADONIS no VeganPackage (Anderson, 2001; Dixon, 2003). A análise de ordenação restrita foi realizada com a função Ordinate no software R PhyloseqPackage (McMurdie; Holmes, 2013). Após verificar a existência do efeito da rizosfera, as amostras do *Bulk Soil* foram removidas para visualizar o efeito dos genótipos testados. A análise de ordenação restrita foi realizada utilizando-se a distância de Bray-Curtis, separadamente para cada tratamento, a fim de demonstrar o efeito dos tempos de amostragem na estrutura da comunidade rizosférica (Anderson e Willis, 2003). As significâncias das ordenações foram obtidas por meio de Análise de Variância (ANOVA). As dez classes mais abundantes em cada tratamento foram filtradas de cada tratamento, e sua abundância relativa foi demonstrada por meio de Barplot demonstrando a dinâmica das classes ao longo do tempo. A riqueza das amostras foi analisada pelo número de sequencias observadas em cada tratamento e a significância acessada por meio de análises de variância e Scott Knott. A diversidade foi estimada pelos índices de Shannon (Magurran et al., 1988) e Simpson (Simpson et al., 1949).

Para demonstrar a eficiência dos inóculos na colonização da rizosfera de trigo, os gêneros correspondentes a cada inóculo (com exceção de T5, em que foi usado família),

foram filtradas e a abundância dos mesmos foi demonstrada por Barplot. As análises estatísticas foram realizadas em ambiente R (R Core Team, 2019), usando os pacotes ExpDes (Ferreira et al., 2018), Ggplot2 (Wickham, 2016) e Phyloseq (McMurdie e Holmes, 2013).

5. Resultados e discussão

5.1.Triagem para características benéficas e identificação molecular

Na Tabela 2 são apresentados os resultados da triagem de isolados para características benéficas através dos testes bioquímicos, bem como a caracterização genética obtidas por comparação das sequências no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Todas as estirpes apresentaram um alto índice de similaridade, variando entre 97 e 100%, com sequências depositadas no banco de dados.

O código W refere-se aos genótipos ancestrais e C para os cultivares modernos. Os códigos W1-2, W1-3, W1-4 e W1-5 correspondem às quatro repetições do W1 (Iran 1-29-11334) e assim funciona para os três outros cultivares (W2 = Karakilcik, C5 = BRS Guamirim e C6 = Quartzo) utilizados no trabalho. O número após a barra representa o número do isolado da repetição. Através da Tabela 2 é possível observar que alguns isolados possuem apenas uma função benéfica dentre as testadas, enquanto outros apresentam um conjunto dessas características. Portanto, sendo considerados potenciais isolados para estar em associação com o hospedeiro, pois podem promover funções de crescimento, de saúde e defesa. Algumas bactérias não foram testadas por dificuldades de crescimento das colônias.

Tabela 2 - Resultados da triagem para características benéficas e caracterização genética dos isolados bacterianos de genótipos ancestrais e modernos de trigo. Jaguariúna, 2019.

Isolado	Origem	Antag. Fusarium	Antag. Bipolaris	Solub. P	Prod. de AIA	Identificação molecular	Ident.	Acesso	p.b.
W2_4/6	Karakilcik	+ *	+	+	+	*Agrobacterium salinitolerans*	99%	NR_157010.1	1301
C5_3/14	BRS Guamirim	-	-	+	+	*Agrobacterium salinitolerans*	98%	NR_157010.1	1276
C6_5/4	Quartzo	-	-	+	NT	*Bacillus altudinis*	99%	NR_042337.1	1401
C6_2/2	Quartzo	-	+	+	+	*Bacillus altitudinis*	99%	NR_042337.1	1331
C6_2/3	Quartzo	-	-	+	+	*Bacillus altitudinis*	99%	NR_042337.1	1396
W1_3/8	Iran	-	-	+	-	*Bacillus cereus*	98%	NR_074540.1	1422
W2_3/14a	Karakilcik	-	-	-	+	*Bacillus cereus*	99%	NR_074540.1	1331
C5_4/6	BRS Guamirim	-	-	+	-	*Bacillus cereus*	98%	NR_074540.1	1254
W1_5/3	Iran	-	-	NT	NT	*Bacillus dentrensis*	99%	NR_114085.1	1022
C5_5/x	BRS Guamirim	NT	NT	-	NT	*Bacillus megaterium*	99%	CP009920.1	1414
W1_5/7	Iran	NT	NT	+	+	*Bacillus megaterium*	97%	CP009920.1	1021
C5_3/20	BRS Guamirim	-	-	+	NT	*Bacillus megaterium*	99%	CP009920.1	1296
W1_3/9	Iran	-	-	-	+	*Bacillus megaterium*	99%	CP009920.1	1325
C5_3/14b	BRS Guamirim	-	-	+	+	*Bacillus megaterium*	99%	CP009920.1	1368
C6_2/12	Quartzo	-	-	+	+	*Bacillus megaterium*	100%	CP009920.1	1377
W2_5/bac	Karakilcik	+	+	-	NT	*Bacillus pseudomycoides*	99%	NR_113991.1	1031
W2_2/bac	Karakilcik	NT	-	-	NT	*Bacillus pseudomycoides*	98%	NR_113991.1	1399
C6_5/bac	Quartzo	-	-	-	NT	*Bacillus pseudomycoides*	99%	NR_113991.1	1362

Continua

Continuação

Isolado	Origem	Antag. Fusarium	Antag. Bipolaris	Solub. P	Prod. de AIA	Identificação molecular	Ident.	Acesso	p.b.
W2_4/bac	Karakilcik	+	+	-	NT	*Bacillus pseudomycoides*	100%	NR_113991.1	1372
C5_3/7	BRS Guamirim	-	-	NT	NT	*Bacillus pseudomycoides*	100%	NR_113991.1	1334
C6_3/bac	Quartzo	+	+	-	NT	*Bacillus pseudomycoides*	99%	NR_113991.1	1378
C6_2/bac	Quartzo	-	-	-	NT	*Bacillus pseudomycoides*	99%	NR_113991.1	1356
C6_3/12	Quartzo	NT	-	+	-	*Bacillus proteolitycus*	99%	NR_157735.1	1094
C6_2/1b	Quartzo	-	+	-	+	*Bacillus safensis*	98%	NR_113945.1	1413
W2_4/11	Karakilcik	-	+	+	-	*Bacillus thuringiensis*	98%	CP020754.1	1348
W1_2/bac	Iran	-	-	-	NT	*Bacillus thuringiensis*	99%	CP020754.1	1392
W1_2/7	Iran	-	-	NT	NT	*Cupriavidus gilardii*	99%	NR_114460.1	1216
W2_2/anti8	Karakilcik	NT	-	-	+	*Gordonia terrae*	98%	CP029604.1	1386
C5_3/13	BRS Guamirim	-	-	+	+	*Gordonia terrae*	99%	CP029604.1	1317
W2_2/10	Karakilcik	-	-	-	+	*Lysinibacillus fusiformis*	98%	NR_112569.1	1340
C5_3/23	BRS Guamirim	-	-	-	+	*Lysinibacillus fusiformis*	99%	NR_112569.1	1351
C6_4/7	Quartzo	NT	NT	+	NT	*Lysinibacillus fusiformis*	99%	NR_112569.1	1326
C6_4/8	Quartzo	-	-	-	NT	*Lysinibacillus fusiformis*	99%	NR_112569.1	1365
C6_4/2	Quartzo	NT	-	-	NT	*Lysinibacillus fusiformis*	99%	NR_112569.1	1397
W1_2/4	Iran	NT	NT	-	+	*Lysinibacillus fusiformis*	97%	NR_112569.1	1365
W2_5/1	Karakilcik	-	-	+	+	*Lysinibacillus fusiformis*	99%	NR_112569.1	1154
C5_3/9	BRS Guamirim	-	-	-	+	*Lysinibacillus fusiformis*	99%	NR_112569.1	1419

Continua

Continuação

Isolado	Origem	Antag. Fusarium	Antag. Bipolaris	Solub. P	Prod. de AIA	Identificação molecular	Ident.	Acesso	p.b.
C6_2/4	Quartzo	-	-	-	+	*Lysinibacillus fusiformis*	99%	NR_112569.1	1408
C5_3/19	BRS Guamirim	-	-	+	NT	*Lysinibacillus fusiformis*	99%	NR_112569.1	1408
C5_4/10	BRS Guamirim	-	-	+	+	*Lysinibacillus fusiformis*	98%	NR_112569.1	1111
C6_4/9	Quartzo	NT	-	+	+	*Lysinibacillus pakistanensis*	99%	NR_113166.1	1332
C5_2/8	BRS Guamirim	-	-	+	+	*Microbacterium hibisci*	98%	NR_158048.1	1316
W1_3/10	Iran	-	-	+	+	*Microbacterium hibisci*	98%	NR_158048.1	1266
W2_4/3	Karakilcik	-	-	+	+	*Microbacterium paraoxydans*	99%	LT629770.1	1324
C5_4/11	BRS Guamirim	NT	-	+	NT	*Methylobacterium populi*	98%	NR_074257.1	1288
C6_3/11	Quartzo	-	-	+	+	*Paenarthrobacter ureafaciens*	99%	NR_029281.1	1345
C6_4/5	Quartzo	NT	NT	+	-	*Paenarthrobacter ureafaciens*	98%	NR_029281.1	1258
C6_2/6	Quartzo	-	-	+	+	*Paenarthrobacter nicotivorans*	99%	NR_026194.1	1338
C5_3/11	BRS Guamirim	-	-	+	+	*Paenibacillus esterisolvens*	99%	KP232905	1355
W1_2/5	Iran	NT	NT	-	NT	*Paenibacillus lautus*	97%	NR_117185.1	1358
W1_2/11	Iran	-	-	NT	NT	*Paenibacillus lautus*	98%	NR_117185.1	1389
W2_4/14	Karakilcik	-	-	-	NT	*Paenibacillus massiliensis*	98%	NR_115175.1	1323
C6_3/10	Quartzo	+	+	+	NT	*Paenibacillus peoriae*	99%	NR_042092.1	1377
W2_3/5	Karakilcik	+	+	+	+	*Paenibacillus polymyxa*	99%	R_117732.2	1365
W1_2/12	Iran	NT	NT	+	+	*Pseudomonas taiwanensis*	99%	NR_116172.1	1383
W2_3/2a	Karakilcik	-	-	+	+	*Pseudomonas taiwanensis*	99%	NR_116172.1	1383

Continua

Conclusão

Isolado	Origem	Antag. Fusarium	Antag. Bipolaris	Solub. P	Prod. de AIA	Identificação molecular	Ident.	Acesso	p.b.
C6_3/7	Quartzo	NT	-	+	+	*Rhodococcus erythropolis*	99%	KJ476725.1	1047
W2_4/10	Karakilcik	+	-	+	+	*Streptomyces chartreusis*	99%	NR_114825.1	1274
W1_3/6	Iran	-	-	+	+	*Streptomyces cinereouber*	99%	NR_112261.1	1329
W1_3/5	Iran	-	-	+	+	*Streptomyces katrae*	99%	NR_116090.1	1315
W1_4/1	Iran	-	-	NT	+	*Streptomyces virginiae*	99%	NR_112496.1	1291
W1_2/2	Iran	+	+	+	+	*Streptomyces virginiae*	99%	NR_112496.1	1242
W2_4/12	Karakilcik	-	-	+	+	*Streptomyces viridobrunneus*	97%	NR_112481.1	1017

*O símbolo “+” representa a resposta positiva ao teste e “-“, a resposta negativa. O código “NT” siginifica que o isolado não foi testado por dificuldades de crescimento das colônias.

Dos 71 isolados obtidos e identificados da rizosfera de trigo 37 (52%) foram positivos para a solubilização de fosfato inorgânico, 36 (50%) produziram ácido indol-acético, 8 (11%) mostraram antagonismo contra *Fusarium graminearum* e 10 (14%) contra *Bipolaris sorokiniana.* A análise das comunidades bacterianas associadas à rizosfera de genótipos de trigos ancestrais e modernos foi realizada por meio do alinhamento de sequências geradas neste estudo com sequências próximas depositadas no GenBank (NCBI), seguido por reconstrução filogenética (Figura 7) utilizando-se o algoritmo Maximum Likelihood.

Com base na análise filogenética, identificação molecular e caracterização bioquímica foram selecionados doze isolados como candidatos a inóculo para serem testados em planta. Esses isolados foram inoculados de forma pura ou em consórcio, e seu desempenho avaliado em relação ao crescimento das plantas. Sendo estes: C6-2/2 (*Bacillus*), W1-3/8 (*Bacillus*), W2-3/14a (*Bacillus*), W1-5/7 (*Bacillus*), W2-4/bac (*Bacillus*), W2-5/1 (*Lysinibacillus*), W2-4/3 (*Microbacterium*), C6-3/11 (*Paenarthrobacter*), C6-2/6 (*Paenarthrobacter*), W2-3/5 (*Paenibacillus*), W2-3/2a (*Pseudomonas*), W1-2/2 (*Streptomtyces*).

5.2.Testes bioquímicos quantitativos

Os doze isolados foram submetidos a testes quantitativos de produção de ácido indol-acético (AIA) e solubilização de fosfato (P). A Tabela 3 descreve o resultado dos testes, sendo os isolados e a bactéria utilizada como controle positivo listados em ordem decrescente, do maior para o menor valor observado para cada característica.

Figura 7 - Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S rRNA, incluindo as sequências de estirpes tipo depositadas no banco de dados. A árvore foi gerada pelo método estatístico Maximum Likelihood. Os números mostrados nas conexões indicamos valores de bootstrap (percentual de 1000 repetições). A barra de escala indica a taxa de substituição por base. Setas vermelhas indicam os isolados escolhidos para bioensaio em casa de vegetação.

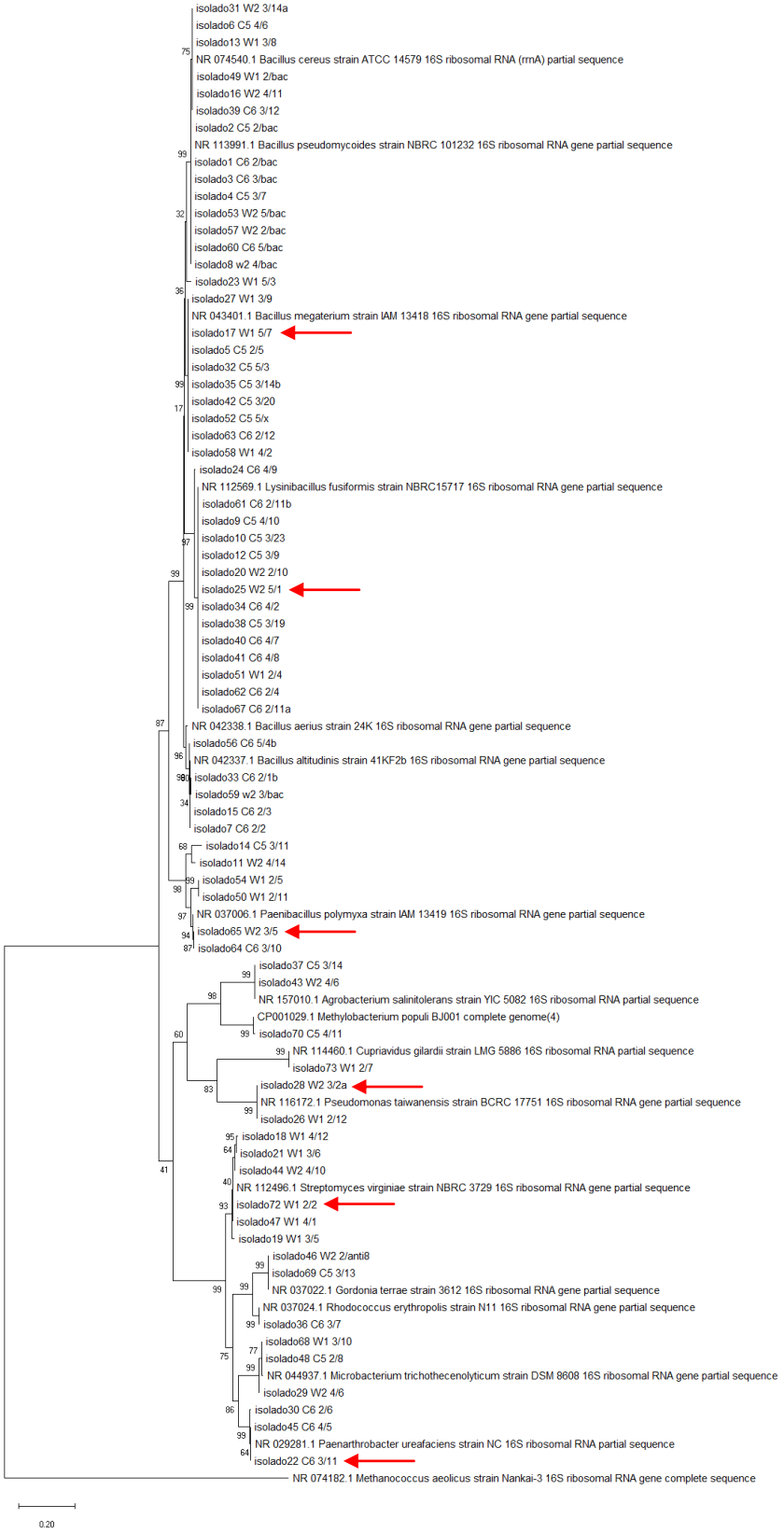


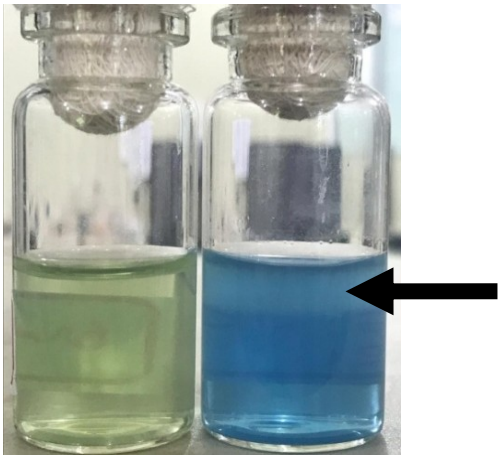
Tabela 3 -Testes qualitativos para a produção de ácido indol-acético e solubilização de fosfato. Jaguariúna, 2019.

AIA			P		
Isolado	**Código**	**Conc. (µg/ml AIA)**	**Isolado**	**Código**	**Conc. (µg /mlP)**
Controle*	A4G3	14,50	W2-5/1[2]	CMAA 1742	1,264405
W2-5/1	CMAA 1742	12,77	W2-3/2a[2]	CMAA 1741	1,241894
C6-3/11[1]	CMAA 1740	5,38	Controle**	1.1 xxs 28	0,782128
W2-3/2a	CMAA 1741	4,60	W2-3/5[2]	CMAA 1739	0,521304
C6-2/6	-	4,32	W1-2/2	CMAA 1738	0,485036
W1-5/7[1]	CMAA 1743	1,56	W2-4/3	-	0,410415
W2-3/5	CMAA 1739	1,24	W1-3/8	-	0,374703
W1-2/2[1]	CMAA 1738	1,15	W2-3/14a	-	0,374101
W2-3/14a	-	1,08	C6-2/2	-	0,352794
W1-3/8	-	1,04	W2-4/bac	-	0,32359
W2-4/3	-	0,76	W1-5/7	CMAA 1743	0,301287
W2-4/bac	-	0,60	C6-3/11	CMAA 1740	0,254921
C6-2/2	-	0,52	C6-2/6	-	0,235467

[1] Estirpe selecionada para o bioensaio classificada como produtora de ácido-indol-acético.
[2] Estipe selecionada para o bioensaio classificada como solubilizadora de fosfato.
* Controle positivo: Bactéria A4G3 pertencente a Coleção de Microrganismos da Embrapa Meio Ambiente.
** Controle positivo: Bactéria 1.1 xxs 28 (Kavamura, 2012).

Ademais, o teste de fixação de nitrogênio também foi realizado e foram classificadas como positivas as bactérias que conseguiram se desenvolver no meio semi-sólido NFb alterando a coloração do meio, de verde para azul, e apresentaram a formação de um véu característico no interior do meio de cultura, como ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Teste de fixação de nitrogênio em meio NFbsemi-sólido. À esquerda o controle que apresenta uma coloração verde límpida. E a direita um resultado positivo cuja coloração do meio torna-se azul e há formação de um véu característico, indicado pela seta preta. Jaguariúna, 2019.



Sendo assim, os isolados positivos para esta característica foram: W2-3/2a, W2-5/1, C6-2/2, W2-3/5, C6-2/6, W1-5/7, C6-3/11 e W2-4/3.

Com base nos critérios pré-estabelecidos para seleção dos isolados, seis microrganismos foram escolhidos para o bioensaio em casa de vegetação. Sendo que na Tabela 4 são descritos os resultados dos microrganismos selecionados bem como o tratamento correspondente.

Tabela 4 - Relação dos isolados bacterianos escolhidos para o bioensaio e resultados da identificação a partir do gene 16S rRNA e testes bioquímicos. Jaguariúna, 2019.

Identificação (16S)	Isolado	Código*	Prod. AIA	Solub. de P	Antag. Fusarium	Antag. Bipolaris	Fix. de N
Lysinibacillus	W2-5/1	CMAA 1742	+	+	-	+	+
Pseudomonas	W2-3/2a	CMAA 1741	+	+	-	+	+
Paenibacillus	W2-3/5	CMAA 1739	+	+	+	+	+
Paenarthrobacter	C6-3/11	CMAA 1740	+	+	-	+	+
Bacillus	W1-5/7	CMAA 1743	+	+	-	+	+
Streptomtyces	W1-2/2	CMAA 1738	+	+	+	+	-

*Isolados depositados na Coleção de Culturas de Microrganismos de Importância Agrícola e Ambiental (CCMA) da Embrapa Meio Ambiente.

Todas as estirpes selecionadas pertencem a gêneros bacterianos já encontrados na rizosfera de plantas de trigo e já foram citados na literatura como promotores de crescimento de plantas. O gênero *Bacillus* é amplamente relatado em estudos de promoção de crescimento vegetal e estápresente em todos os tipos de ambientes, incluindo solo rizosférico, sendo uma tecnologia promissora para agricultura verde (Kashyap et al., 2019).

Em um trabalho realizado por Melnichuk et al. (2019) cinco cepas de bactérias associativas foram selecionadas por a partir das raízes de trigo, sendo elas: *Sinorhizobium meliloti*; *Pseudomonas koreensis*; *Paenarthrobacter nitroguajacolicus*; *Bacillus* sp. e *Agrobacterium tumefaciens*, as quais aumentaram a qualidade das sementes das variedades de trigo estudadas em 5% e a biomassa das mudas em 80%.

Além de diversos outros estudos evidenciando a capacidade de bactérias do gênero *Lysinibacillus* (Naureen et al., 2017), *Paenibacillus* (Liu et al., 2019) e *Streptomyces* (Toumatia et al., 2016) em promover o crescimento das plantas e/ou controle biológico contra patógenos, que corroboram com a escolha destes gêneros bacterianos para bioensaios em casa de vegetação.

5.3.Bioensaio em casa de vegetação

Na avaliação dos resultados do ensaio com inoculação de bactérias a fim de analisar a promoção de crescimento das plantas de trigo foi possível observar variações nas médias dos parâmetros analisados bem como diferenças estatísticas entre os tratamentos ao longo do ciclo da cultura. Sendo que a influência da inoculação microbiana foi diferente para cada cultivar.

A Tabela 5 ilustra os valores das médias obtidas de altura, diâmetro e quantidade de clorofila das plantas da variedade comercial BRS Marcante. Para essa cultivar não houve diferença significativa entre o tratamento controle e os demais inoculados com microrganismos em nenhum período de avaliação.

Já a variedade BRS Reponte (Tabela 6) apresentou uma resposta diante dos tratamentos, sendo que foram observadas diferenças significativas nas avaliações realizadas aos 30 e 45 dias após a inoculação. Com 30 dias houve um incremento no diâmetro das plantas de trigo tratadas com T4, T5, T7, T10 e T11. Para os demais parâmetros não foram observadas diferenças estatísticas neste período. Aos 45 dias após a semeadura desta variedade, as plantas apresentaram uma similaridade de resposta de altura entre os tratamentos T2, T6, T8, T10 e T11 e o controle (T1), sendo significativamente diferente dos demais tratamentos. O mesmo foi observado para o diâmetro das plantas, neste mesmo período, sendo

que também os tratamentos controle, T6, T8, T10 e T11 apresentaram médias superiores que os demais. Entretanto, com 60 dias nenhuma diferença estatística foi significativa, indicando que esses efeitos observados nas outras épocas não foram mantidos com o desenvolvimento da cultura.

Comportamento semelhante foi observado na variedade BRS Parrudo (Tabela 7). Onde efeitos precoces foram observados para alguns parâmetros aos 15, 30 e 45 dias após a semeadura, mas atenuaram-se na última avaliação, não havendo diferenças. No genótipo BRS Reponte, os tratamentos T10 e T11 obtiveram as melhores médias para todos os parâmetros em todas as épocas em quefoi observada diferença estatística, constatando o efeito positivo desses tratamentos para esta variedade.

Vale ressaltar que o T10 é composto pela combinação de todos os isolados bacterianos, demonstrando que o consórcio de bactérias apresentou uma resposta positiva quando comparado à inoculação única de qualquer rizobactéria. Na natureza, muitos microrganismos coexistem no ambiente, havendo vários tipos de interações microbianas conhecidas, como antagonismo, competição e simbiose. Ao longo da história da microbiologia, a maioria dos pesquisadores se interessou nas "interações negativas" entre microrganismos, como a produção de antibióticos e a disputa por substratos. Entretanto, para esta cultivar a combinação de microrganismos usada neste estudo e que foi selecionada de um ambiente natural aprensentou interações positivas entre si. O mesmo foi também observado também por Kumar et al. (2018) ao utilizar a combinação de bactérias para avaliar a promoção de crescimento em plantas de trigo.

Na primeira avaliação da cultivar BRS Parrudo (Tabela 7) as plantas se diferiram quanto à quantidade de clorofila, onde a maioria dos tratamentos comportaram de forma semelhante, com exceção dos tratamentos T4, T8 e T9 que foram menores que os demais para esta característica. Aos 30 e 45 dias os tratamentos apresentaram respostas com destaque para os tratamentos T2, T3 e T6 que obtiveram as maiores médias de altura e diâmetro quando comparadas com o tratamento sem inoculação de microrganismos. Com 45 dias, os menores valores de altura e diâmetro foram observados no tratamento T1, T9, T10 e T11. Sendo que o T9 e o T10 são consórcios bacterianos, o que permite inferir que nem sempre as combinações irão apresentar simbiose positiva, dependendo principalmente do genótipo do hospedeiro. O mesmo resultado negativo para mistura de bactérias foi observado por Xu et al. (2010) e Bora et al. (2004), onde o tratamento das sementes pela mistura de cepas não alcançou tanta eficácia quanto os agentes de biocontrole aplicados separadamente, na cultura do morango e

do melão, respectivamente. Atribuindo-se esse resultado a possível antagonismo ou interferência entre as bactérias inoculadas juntas.

Aos 60 dias após a semeadura os efeitos causados pelos tratamentos foram atenuados e não foi observada nenhuma diferença estatística nos parâmetros observados. Em um trabalho realizado por Bach et al. (2016) onde foi avaliado o controle biológico e competência na promoção de crescimento de bactérias em quatro genótipos de trigo, a inoculação das três bactérias não foi prejudicial para as plantas. No entanto, também não promoveram o crescimento das plantas de qualquer cultivar de trigo em comparação com o controle não inoculado.

Os dados permitem observar que a inoculação bacteriana é bastante influenciada pelo genótipo da planta, visto que cada cultivar apresentou uma resposta diferente para os parâmetros de altura, diâmetro e clorofila. Utilizando-se os mesmos tratamentos o BRS Marcante apresentou resposta neutra com a inoculação, o BRS Reponte obteve maiores médias nos tratamentos com consorcio de seis bactérias (T10) e com *Azospirillum brasilense* (T11) e o BRS Parrudo nos tratamentos com estirpes isoladas principalmente *Lysinibacillus* (T2), *Pseudomonas* (T3) e *Bacillus* (T6).

Em relação a massa seca e fresca destas cultivares, houve uma tendência em maiores valores nos tratamentos que já se destacaram durante o ciclo da cultura, sendo esses novamente diferentes para cada genótipo de trigo. A cultivar BRS Marcante também não apresentou diferenças estatísticas significativas para essas variáveis, como é possível observar na Figura 9a Sendo assim, para esta variedade não houve efeito benéfico mensurável com a inoculação de bactérias, podendo não ter havido sucesso na colonização. Vale ressaltar que a cultivar BRS Marcante foi escolhida para o bioensaio por apresentar uma genealogia divergente das demais cultivares testadas. Confirmando o importante efeito da genética do hospedeirono resultado da inoculação, como mencionado por Neiverth et al., (2014).

A Figura 9b representa os valores de massa seca e fresca da parte aérea e raízes da cultivar BRS Reponte, e nota-se que houve um incremento nas massas referente a parte aérea nos tratamentos inoculados com bactérias. Sendo que as melhores médias foram obtidas pelos tratamentos T11, T10 e T8, tanto fresco quanto seco. O tratamento T11 corresponde a estirpe de *Azospirillum brasilense*, e como já descrito na literatura apresentou capacidade de aumentar aproximadamente 20% o volume da parte aérea das plantas BRS Reponte quando comparado com o controle sem inóculo (Boddey e Dobereiner,1988; Sala et al., 2007). Os tratamentos T10 e T8 correspondem a consórcios bacterianos, com seis e três estirpes, respectivamente.

Tabela 5 –Média das avaliações de altura (cm), diâmetro (cm) e clorofila (SPAD) das plantas da variedade BRS Marcante aos 15, 30, 45 e 60 dias após a semeadura. Jaguariúna, 2019.

BRS Marcante												
	15 dias			30 dias			45 dias			60 dias		
Tratamentos*	Altura	Diâmetro	Clorofila	Altura	Diâmetro	Clorofila	Altura	Diâmetro	Clorofila	Altura	Diâmetro	Clorofila
T1	4,55	1,27	36,68	6,10	2,13	35,94	8,20	3,11	40,20	20,65	4,43	41,12
T2	4,50	1,28	35,08	6,55	2,01	36,57	8,90	3,29	39,11	28,50	4,48	42,91
T3	4,50	1,18	33,51	6,40	2,00	37,43	8,80	3,32	40,32	26,35	4,21	42,91
T4	4,70	1,23	35,18	6,00	1,69	36,65	8,70	3,18	39,88	26,60	4,53	38,68
T5	4,65	1,26	34,07	6,40	2,09	36,51	9,40	3,15	42,28	30,70	3,94	42,66
T6	4,80	1,30	34,92	6,15	1,80	35,41	9,10	2,81	41,23	25,30	4,22	41,16
T7	4,50	1,24	37,14	6,25	2,16	36,41	9,15	3,18	40,19	26,90	4,68	40,32
T8	4,45	1,21	32,74	5,65	1,83	35,83	7,70	2,89	39,45	23,60	4,02	40,99
T9	4,40	1,24	34,77	5,90	1,89	35,29	8,95	2,96	40,19	27,50	4,51	42,45
T10	4,95	1,25	36,36	6,15	2,05	34,57	8,20	3,11	39,58	24,90	3,87	42,12
T11	4,55	1,27	38,27	6,25	1,90	36,95	9,25	3,21	38,42	25,50	4,26	43,23
CV(%)	**8,09**	**9,07**	**7,97**	**11,39**	**15,09**	**4,14**	**12,17**	**15,57**	**4,1**	**26,13**	**18,72**	**4,4**

*T1 = controle; T2 = CMAA 1742 (*Lysinibacillus*); T3= CMAA 1741 (*Pseudomonas*); T4 = CMAA 1739 (*Paenibacillus*); T5 = CMAA 1740 (*Paenarthrobacter*) ; T6 = CMAA 1743 (*Bacillus*); T7 = CMAA 1738 (*Streptomyces*); T8= CMAA 1742 + CMAA 1741 + CMAA 1739; T9= CMAA 1740 + CMAA 1743 + CMAA 1738 ; T10 = Todos os isolados; T11 = *Azospirillum brasilense*.

Tabela 6 - Média das avaliações de altura (cm), diâmetro (cm) e clorofila (SPAD) das plantas da variedade BRS Reponte aos 15, 30, 45 e 60 dias após a semeadura. Jaguariúna, 2019.

	BRS Reponte											
	15 dias			30 dias			45 dias			60 dias		
Tratamentos**	Altura	Diâmetro	Clorofila	Altura	Diâmetro	Clorofila	Altura	Diâmetro	Clorofila	Altura	Diâmetro	Clorofila
T1	5,30	1,14	37,06	7,70	1,60 **b***	34,89	12,35 **a**	2,99 **a**	40,80	42,3	2,87	41,65
T2	4,75	1,19	36,14	7,30	1,68 **b**	33,15	11,65 **a**	2,82 **b**	40,10	38,4	3,03	42,07
T3	4,60	1,24	34,74	7,30	1,61 **b**	32,99	9,40 **b**	2,09 **b**	36,58	33,2	2,34	41,07
T4	5,05	1,25	37,66	7,75	1,78 **a**	35,90	10,20 **b**	2,32 **b**	36,91	38,1	2,86	37,84
T5	4,95	1,37	35,12	8,05	1,89 **a**	36,43	10,50 **b**	2,78 **b**	39,15	40,3	3,02	42,78
T6	4,55	1,24	35,38	7,65	1,55 **b**	38,07	12,25 **a**	3,43 **a**	39,88	42,3	2,82	40,73
T7	4,80	1,35	36,08	7,65	1,74 **a**	32,88	11,10 **b**	2,65 **b**	38,33	39,4	2,72	38,22
T8	5,25	1,23	35,58	7,45	1,53 **b**	33,35	11,70 **a**	3,30 **a**	38,42	40,0	3,06	40,20
T9	4,80	1,30	35,20	6,75	1,67 **b**	34,17	10,90 **b**	2,66 **b**	39,25	40,2	2,77	36,64
T10	5,15	1,26	36,78	8,20	1,78 **a**	35,28	12,85 **a**	3,33 **a**	40,02	42,7	3,17	38,62
T11	5,40	1,22	35,99	7,80	1,80 **a**	35,53	11,75 **a**	3,48 **a**	41,41	42,2	3,18	39,20
CV(%)	**16,61**	**13,37**	**4,38**	**7,81**	**10,47**	**7,35**	**11,86**	**16,88**	**6,22**	**10,43**	**11,47**	**7,67**

*Médias seguidas de letras minúsculas diferem-se entre si nas linhas

**T1 = controle; T2 = CMAA 1742 (*Lysinibacillus*); T3= CMAA 1741 (*Pseudomonas*); T4 = CMAA 1739 (*Paenibacillus*); T5 = CMAA 1740 (*Paenarthrobacter*) ; T6 = CMAA 1743 (*Bacillus*); T7 = CMAA 1738 (*Streptomyces*); T8= CMAA 1742 + CMAA 1741 + CMAA 1739; T9= CMAA 1740 + CMAA 1743 + CMAA 1738 ; T10 = Todos os isolados; T11 = *Azospirillum brasilense*.

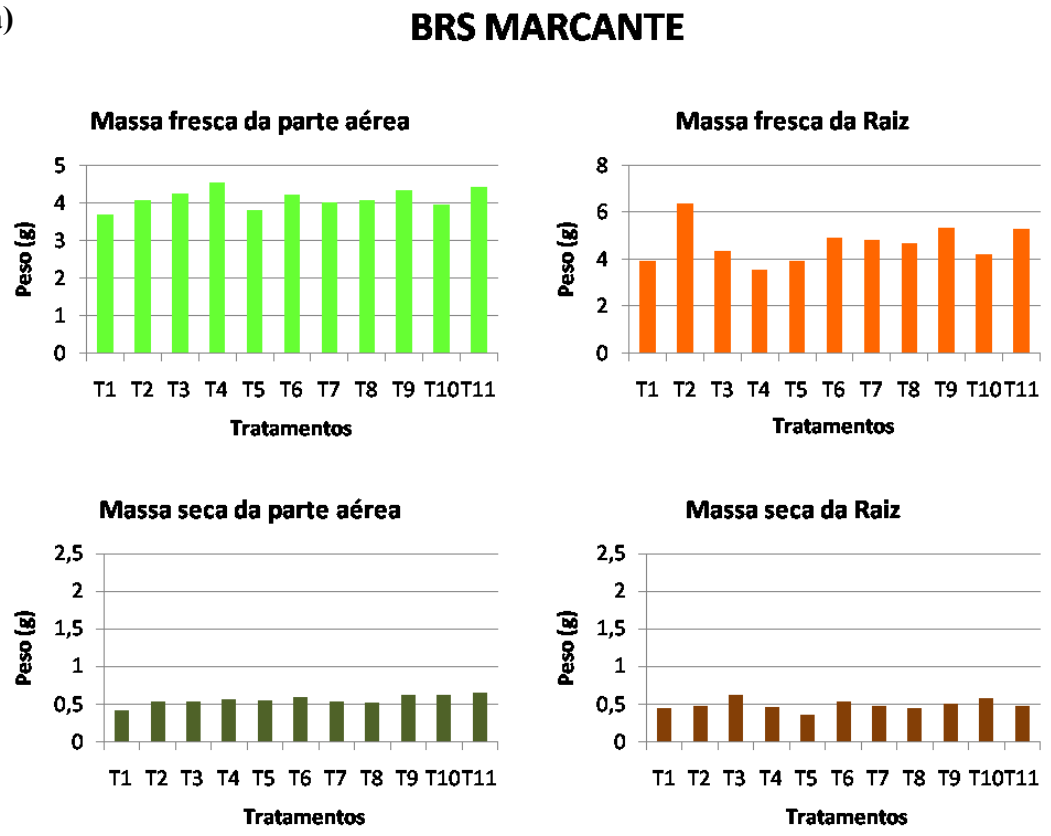
Tabela 7 - Média das avaliações de altura (cm), diâmetro (cm) e clorofila (SPAD) das plantas da variedade BRS Parrudo aos 15, 30, 45 e 60 dias após a semeadura. Jaguariúna, 2019.

	BRS Parrudo											
	15 dias			30 dias			45 dias			60 dias		
Tratamentos**	Altura	Diâmetro	Clorofila	Altura	Diâmetro	Clorofila	Altura	Diâmetro	Clorofila	Altura	Diâmetro	Clorofila
T1	3,95	1,31	38,78 **a***	5,10 **b**	1,87 **b**	38,81	6,60 **b**	2,43 **b**	48,43	9,10	3,83	50,67
T2	4,45	1,25	38,88 **a**	6,00 **a**	2,08 **a**	41,42	7,60 **a**	3,25 **a**	47,28	11,55	4,24	50,21
T3	4,00	1,29	38,42 **a**	5,90 **a**	2,06 **a**	41,74	7,20 **a**	3,16 **a**	46,14	10,15	4,34	48,33
T4	3,40	1,11	34,28 **b**	5,60 **a**	1,68 **b**	41,25	7,10 **a**	2,92 **a**	47,79	10,85	4,28	50,55
T5	3,50	1,17	39,68 **a**	5,30 **b**	2,04 **a**	41,07	7,55 **a**	3,16 **a**	47,53	10,40	4,56	51,48
T6	4,05	1,21	38,77 **a**	5,90 **a**	2,10 **a**	41,51	7,65 **a**	2,96 **a**	48,81	10,00	4,22	50,13
T7	4,05	1,23	39,98 **a**	5,55 **a**	1,82 **b**	43,35	7,10 **a**	2,68 **b**	48,44	10,05	4,51	48,60
T8	3,40	1,20	37,19 **b**	5,60 **a**	1,80 **b**	43,48	7.05 **a**	2,95 **a**	49,39	10,40	4,70	51,52
T9	3,45	1,11	36,96 **b**	5,30 **b**	1,93 **a**	41,00	6,15 **b**	2,36 **b**	47,06	8,80	3,47	51,16
T10	3,75	1,23	39,35 **a**	5,75 **a**	2,01 **a**	41,90	6,35 **b**	2,72 **b**	47,47	9,00	3,99	51,92
T11	4,10	1,16	39,34 **a**	5,15 **b**	1,73 **b**	41,06	6,25 **b**	2,57 **b**	46,65	9,90	3,56	51,43
CV(%)	**16,11**	**9,08**	**6,35**	**8,40**	**11,6**	**4,91**	**9,99**	**16,36**	**4,71**	**15,07**	**18,17**	**5,92**

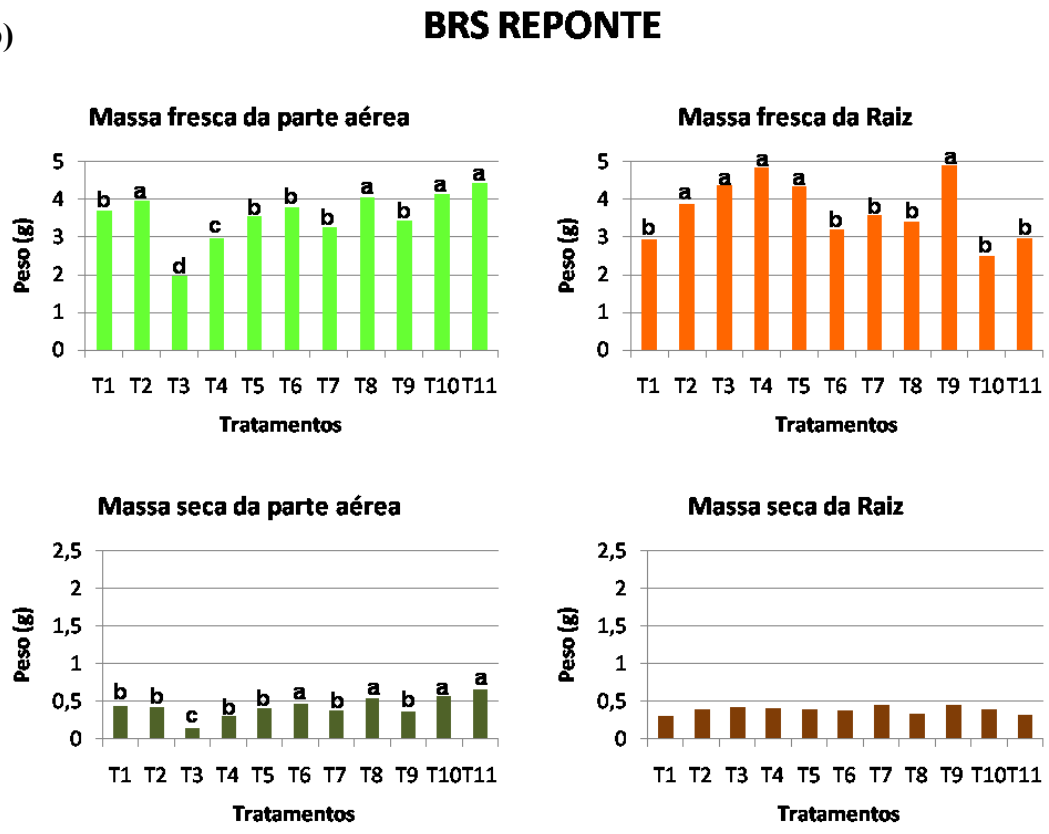
*Médias seguidas de letras minúsculas diferem-se entre si nas linhas
**T1 = controle; T2 = CMAA 1742 (*Lysinibacillus*); T3= CMAA 1741 (*Pseudomonas*); T4 = CMAA 1739 (*Paenibacillus*); T5 = CMAA 1740 (*Paenarthrobacter*) ; T6 = CMAA 1743 (*Bacillus*); T7 = CMAA 1738 (*Streptomyces*); T8= CMAA 1742 + CMAA 1741 + CMAA 1739; T9= CMAA 1740 + CMAA 1743 + CMAA 1738 ; T10 = Todos os isolados; T11 = *Azospirillum brasilense*.

Figura 9 - Médias da massa fresca e seca da parte aérea e raiz das plantas de trigo de acordo com cada tratamento* **a)** Cultivar BRS Marcante **b)** Cultivar BRS Reponte **c)** Cultivar BRS Parrudo. Letras distintas mostram significância pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

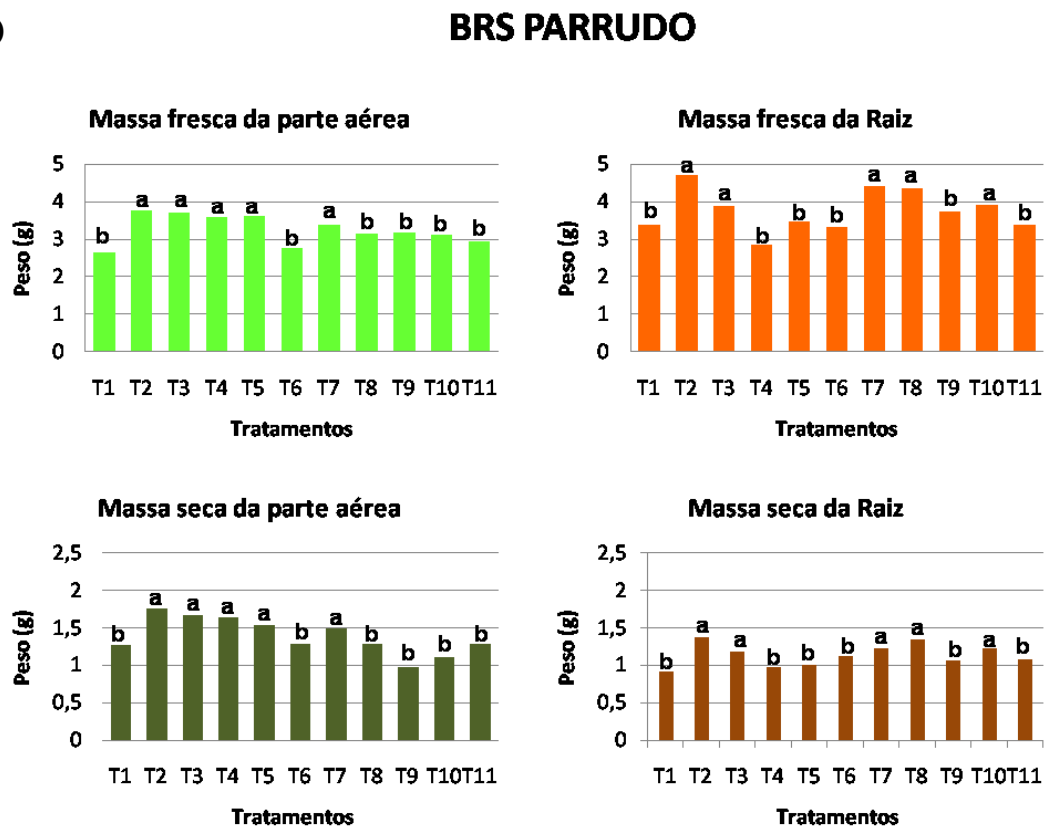
a)



b)



c)



*T1 = controle; T2 = CMAA 1742 (*Lysinibacillus*); T3= CMAA 1741 (*Pseudomonas*); T4 = CMAA 1739 (*Paenibacillus*); T5 = CMAA 1740 (*Paenarthrobacter*); T6 = CMAA 1743 (*Bacillus*); T7 = CMAA 1738 (*Streptomyces*); T8= CMAA 1742 + CMAA 1741 + CMAA 1739; T9= CMAA 1740 + CMAA 1743 + CMAA 1738 ; T10 = Todos os isolados; T11 = *Azospirillum brasilense*.

Ainda para a cultivar BRS Reponte, dois tratamentos com bactérias apresentaram peso de massa fresca inferior que a testemunha, sendo eles o T4 e o T3, evidenciando que a associação planta–bactéria pode ter representado um alto custo para a planta neste caso, não proporcionando benefícios. Em relação a massa seca da parte aérea, o T3 continuou apresentando menor média. Em quanto os demais tratamentos comportaram-se de forma semelhante ao controle. Resultado semelhante foi observado em um trabalho onde buscou-se avaliar o desempenho de diferentes genótipos de trigo inoculados com *Herbaspirillum seropedicae*, sendo que alguns genótipos responderam negativamente com um decréscimo no peso da parte aérea e da raiz após a inoculação, em quanto outros não foram afetados ou apresentaram discreto aumento na parte aérea e/ou no peso das raízes, embora as diferenças não tenham sido significativas (Neiverth et al., 2014).

As raízes da variedade BRS Reponte se diferiram quanto ao peso fresco, com destaque para os tratamentos T9, T4, T3, T5 e T2. Mas não foram significativamente diferentes quando

avaliadas após secagem em estufa. Além disso, é possível observar que os tratamentos T10 e T11, juntamente com a testemunha, apresentaram os menores valores de peso fresco de raiz, o oposto observado para valores de parte aérea. Demonstrando que a inoculação com bactérias promoveu o crescimento das plantas sem aumentar o tamanho de suas raízes. Normalmente, a explicação mais comum proposta para os efeitos benéficos das BPCV no crescimento das plantasse dá pelo aumento na área superficial da raiz e o volume de solo que ela passa a explorar, aumentando a absorção de água e nutrientes. No entanto, as bactérias podem melhorar a captação de minerais não apenas como consequência do aumento da raiz, mas também estimulando os sistemas de captação de íons, melhorando a absorção e/ou gerando maior disponibilização dos nutrientes, sem necessariamente expandir a área radicular (Bertrand et al., 2000; Saubidet et al., 2002). Okon & Kapulnik (1986) descreveram inclusive que a inoculação de várias cultivares de trigo, milho, sorgo com várias linhagens de *Azospirillum* causaram alterações morfológicas na raiz, sendo que durante as primeiras três semanas após a germinação, o número de fios, ramos e raízes laterais foi aumentado por inoculação, mas não houve alteração no peso das raízes.

Ao observar o gráfico de valores de massa da cultivar BRS Parrudo (Figura 9c), é evidente a diferença entre os tratamentos. Sendo que em relação a parte aérea, maiores médias foram obtidos em T2, T3, T4, T5 e T7. Todos estes tratamentos correspondem as bactérias isoladas, demonstrando menor eficiência deste genótipo com consórcios bacterianos para crescimento aéreo. As raízes foram maiores em plantas tratadas com T2, T3, T7, T8 e T10. De um modo geral, levando-se em consideração os parâmetros avaliados, podemos propor uma contribuição positiva da inoculação bacteriana principalmente para acultivar BRS Reponte e BRS Parrudo, sendo a segunda mais responsiva para a maioria dos caracteres avaliados. A cultivar BRS Marcante não foi afetada por nenhum tratamento com microrganismos. Estas evidências podem auxiliar na seleção de genótipos de trigo mais responsivos à inoculação bacteriana e reforçar a evidência de que esta associação é genótipo dependente, contribuindo para o consenso geral de que o genótipo da planta é um fator chave para obtenção dos benefícios propiciados por bactérias (Reis et al., 2000). Esse fator deve ser lavado em consideração principalmente em programas de melhoramento genético, para que sejam selecionadas plantas com maior capacidade de interagir com microrganimos para usufruir e otimizar os benefícios da inoculação na agricultura. Além disso, outros fatores como a estirpe bacteriana, condições ambientais, práticas agrícolas e quantidade e qualidade das células bacterianas utilizadas podem influenciar o sucesso da colonização (Matsumura et al., 2015).

No caso deste trabalho foi possível observar inclusive o contraste gerado com a inoculação de um mesmo tratamento, composto por *Pseudomonas* (T3) que apresentou reposta neutra na cultivar BRS Marcante, negativa com menor média na BRS Reponte e positiva com maior média para a BRS Parrudo. Evidenciando uma das limitações no uso de inoculantes, que normalmente são recomendados para culturas agrícolas de forma geral, não sendo considerado o genoma do hospedeiro. O que pode gerar respostas diferentes e por vezes inconsistentes, cujo motivo ainda não é totalmente esclarecido.

Alguns autores, avaliando a resposta da associação a campo com *A. brasilense* também relatam respostas diferenciadas do trigo dependentes do genótipo, do local, e do estado fenológico das plantas em que foram avaliados (Sala et al., 2007; Diaz-Zorita e Fernandéz-Canigia, 2008). Kennedy et al. (1997) citam que o melhoramento vegetal do trigo visando maiores produtividades foi realizado baseando-se nas melhores respostas dos genótipos à adubação nitrogenada e na alta fertilidade de solos. Este fato pode ter negligenciado a seleção para o estabelecimento de associações planta-bactéria estáveis e benéficas em cereais ao longo dos anos. Sendo assim, o reconhecimento de cultivares contrastantes é útil para estudos comparativos e por auxiliar na busca por germoplasmas mais responsivos à associação bacteriana.

5.4.Análise enzimática da rizosfera

Em geral, maior atividade das enzimas rizosfera pode ser interpretada como uma maior diversidade funcional da comunidade microbiana (Gianfreda, 2015). A hidrólise do diacetato de fluorescência (FDA) é amplamente aceita como um método simples para medir a atividade microbiana total, sendo que FDA é geralmente proporcional à população microbiana (Adam e Duncan 2001). Os resultados obtidos em absorbância (x) foram convertidos em atividade de FDA (PNF. g^{-1}solo . min) (y) por meio da equação y=0,004x + 0,137 (R^2=0,978), sendo que a maior atividade microbiana total foi observada nos tratamentos T6, T8 e T10, seguido dos tratamentos T9, T7 e T11 (Figura 10a). Os demais não se diferiram do controle sem a inoculação de microrganismos (T1). Os três tratamentos compostos por consórcios de bactérias (T8, T9 e T10) apresentaram médias 30 a 40% maiores que T1 (Scott Knott, $p<0.05$).

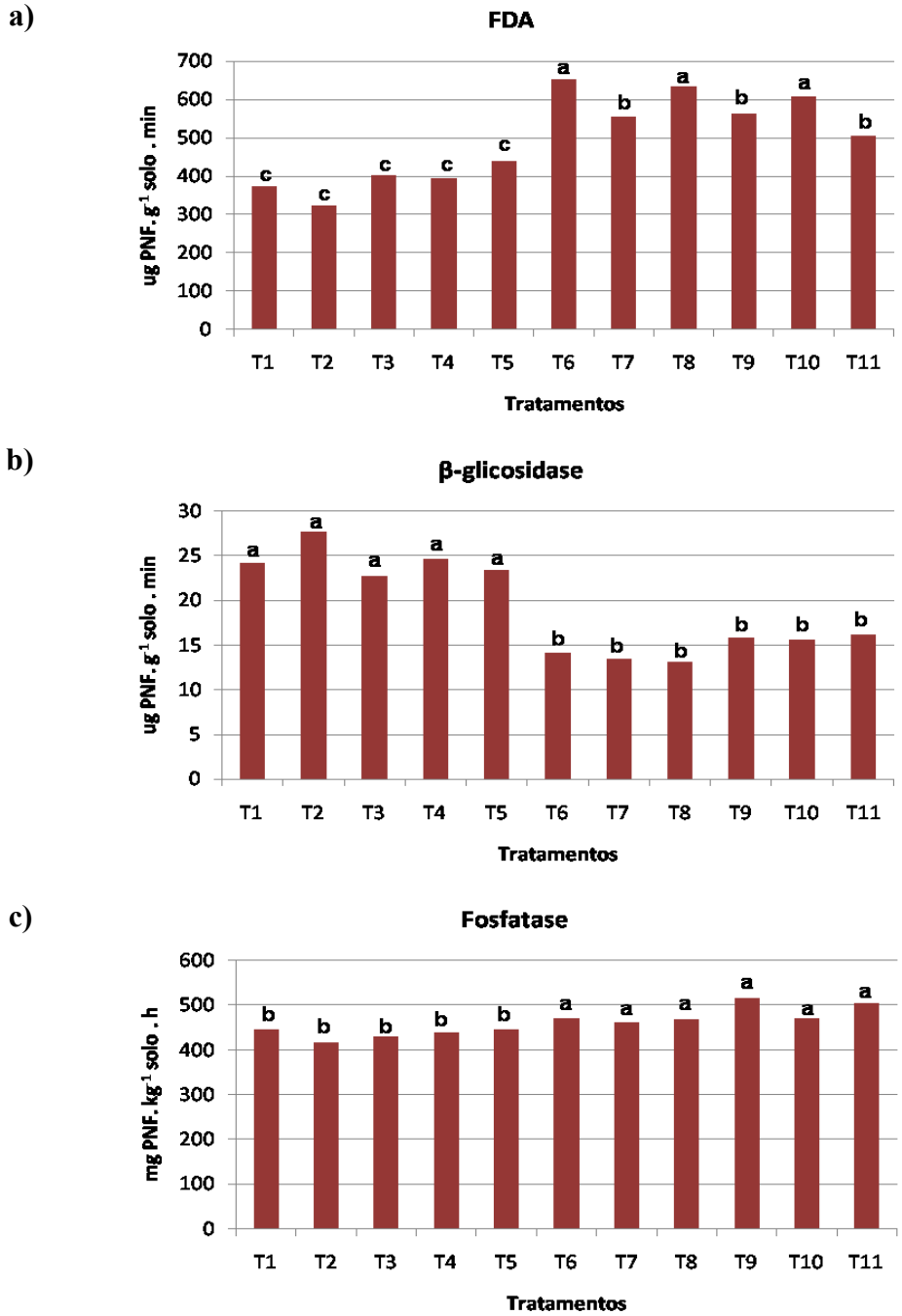
A enzima β-glicosidase é frequentemente utilizada como indicador da mineralização orgânica de C no solo, embora não seja recomendado considerar uma única atividade

enzimática como um indicador da taxa de todo um processo metabólico (Stott et al. 2010; Nannipieri, 2012). Neste trabalho T1, T2, T3, T4 e T5 apresentaram comportamento semelhante para este indicador, com médias superiores que os demais tratamentos (figura 10b). Os valores de absorbância (x) obtidos foram convertidos em atividade de β-glicosidase (µg PNF. g^{-1}solo . min) (y) por meio da equação y=0,063x-0,003 (R^2=0,988). Esses resultados sugerem maior atividade da β-glicosidase em alguns tratamentos, o que pode ser relacionada à matéria orgânica do solo, atividade biológica e ciclagem de C, apesar da atividade microbiológica geral do solo compreender uma ampla gama de reações enzimáticas diferentes (Nannipieri, 2012).

As fosfatases são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres e anidridos do ácido fosfórico (Condron et al., 2005). Como as plantas utilizam apenas P inorgânico e uma grande quantidade de P do solo não está disponível, a mineralização dessa porção orgânica tem uma grande importância no desenvolvimento vegetal (Nannipieri et al., 2011). Por isso a quantidade de fosfatase presente no solo pode ser utilizada como indicador da disponibilidade de fósforo inorgânico para plantas e microrganismos, sendo que a produção desta enzima é aumentada quando o fósforo está ausente no solo, intensificando a solubilização e remobilização do fosfato. O tratamento que apresentou maior atividade dessa enzima foi o T9, que corresponde ao consórcio de três microrganismos previamente reconhecidos pela capacidade de solubilizar fosfato inorgânico *in vitro.* Seguido pelos tratamentos T11, T6, T10, T8 e T7 (Figura 10c). Todos os tratamentos compostos por misturas de três ou mais microrganismos (T8, T9 e T10) demonstraram atividade enzimática superior ao controle não inoculado. Os valores de absorbância (x) foram convertidos em concentração de fosfatase ácida (mg PNF. kg^{-1}solo . hora) (y) por meio da equação y = 80,43x (R^2=0,995)

Diversos trabalhos demonstram variações na resposta das plantas inoculadas com microrganismos e a atividade enzimática no solo, como o trabalho realizado por Ramesh et al (2014), onde um microrganismo foi isolado da rizosfera de plantas de soja e inoculado em genótipos de trigo demonstrou um aumento da atividade da hidrólise do diacetato de fluoresceína, β-glicosidase, fosfatase ácida foi de 16,62, 50,53, 12,75%, respectivamente, sobre o controle não inoculado. Entretanto, como descrito por Nannipierini et al. (2012) o uso de atividades enzimáticas como indicadores das funções do solo é problemático devido muitos efeitos diretos e indiretos que dificultam a interpretação da resposta da atividade das enzimas bem como as grandes variações espaço-temporais que podem alterar esses índices e não são considerados.

Figura 10 - Médias obtidas por cada tratamento* após análise das enzimas **a)** β-glicosidase (CV=11,3%), **b)** fosfatase ácida (CV=9,9%) e **c)** FDA (CV=11,6%). Letras distintas sobre as barras indicam significância pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).



*T1 = controle; T2 = CMAA 1742 (*Lysinibacillus*); T3= CMAA 1741 (*Pseudomonas*); T4 = CMAA 1739 (*Paenibacillus*); T5 = CMAA 1740 (*Paenarthrobacter*); T6 = CMAA 1743 (*Bacillus*); T7 = CMAA 1738 (*Streptomyces*); T8= CMAA 1742 + CMAA 1741 + CMAA 1739; T9= CMAA 1740 + CMAA 1743 + CMAA 1738 ; T10 = Todos os isolados; T11 = *Azospirillum brasilense*.

Entender a dinâmica desta enzima e os fatores que influenciam sua atividade pode ser uma importante ferramenta para aprimorar o manejo biológico da fertilidade do solo na

agricultura (Nannipieri, 2012; Adetunji et al., 2017). Vale ressaltar que a atividade enzimática individual não reflete o status da qualidade do solo, pois as atividades enzimáticas únicas não podem representar a taxa de todos os processos metabólicos (Adetunji et al., 2017). Sendo assim, além dos resultados obtidos é interessante compreender a estrutura e diversidade da comunidade das bactérias, principalmente da rizosfera, visto que a composição e funcionalidade destas comunidades podem ser influenciadas pela forma de uso e manejo do solo.

5.5.Sequenciamento do gene 16SrRNA das amostras da rizosfera

Para estudar o impacto da inoculação de microrganismos na comunidade bacteriana da rizosfera, as amostras de solo das três cultivares foram coletadas durante todo o ciclo da cultura em tempos distintos (Figura 4). Entretanto, escolhemos apenas uma cultivar, BRS Parrudo, para prosseguir com o sequenciamento. Dessa forma, todos os dados aqui apresentados correspondem a amostras deste genótipo, que consideramos como o mais responsivo àinoculação de microrganismos e escolhemos para prosseguir com o estudo.

Através do sequenciamento parcial do gene ribossomal 16S rRNA, foi possível observar a estrutura da comunidade total bacteriana em cada tratamento realizado. As sequências apresentaram índice de qualidade (Q score) acima de 20 e comprimento variando de 250 a 490 p.b., sendo que a maioria das sequências apresentaram de 360 a 390 p.b. (ANEXO A). Após o processamento dos dados brutos a rarefação dos dados foi realizada pela profundidade, sendo que foram mantidos 9775 *taxa*. Antes da rarefação, uma das amostras (T8R3) foi removida da análise, visto que apresentou apenas 16 sequências. Se esta amostra fosse mantida, permaneceriam apenas 4320 *taxa*. Portanto, a perda de dados foi significativamente menor com a remoção desta amostra (ANEXO B).

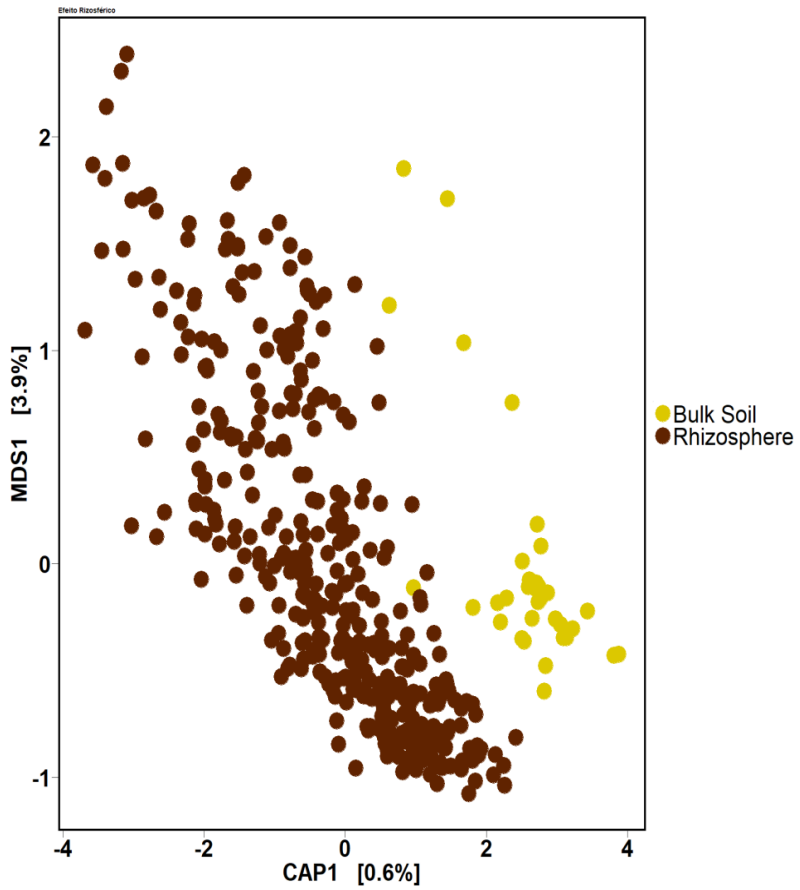
A análise multivariada permutacional (PERMANOVA) foi feita antes da rarefação dos dados e o Bulk Soil foi removido das análises para não mascarar o efeito dos inoculantes. Os resultados indicaram que o tempo teve um efeito significativo na composição da comunidade de bactérias da rizosfera ($p < 0,05$), bem como a interação Inoculante:Tempo (Tabela 7). A interação significativa (inoculante e tempo) demonstra que cada inóculo respondeu de uma forma diferente ao longo do tempo na comunidade bacteriana, com cerca de 16% da variação dos dados.

Tabela 7 - PERMANOVA com base na matriz de dissimilaridade de Bray-curtis mostrando a contribuição (R^2) e a significância (p) de cada fator deste estudo na comunidade da rizosfera. Valores de p destacados com '*' indicam variação significativa para o teste de de Scott-Knott(p<0,05).

	Df	**SumsOfSqs**	**MeanSqs**	**F.Model**	**R^2**	**P**
Inoculante	10	0,990	0,098963	1,1254	0,029	0.073
Tempo	6	0,720	0,119943	1,3639	0,021	**0.005***
Inoculante:Tempo	60	5,692	0,094863	1,0787	0,165	**0.024 ***
Residuals	308	27,085	0,087938		0,785	
Total	384	34,486			1,000	

Uma análise explanatória da constituição da comunidade da comunidade bacteriana levando em conta a abundância relativa separou claramente a comunidade microbiana do Bulk Soil e da rizosfera, demonstrando um forte efeito rizosférico como ilustrado na Figura11.

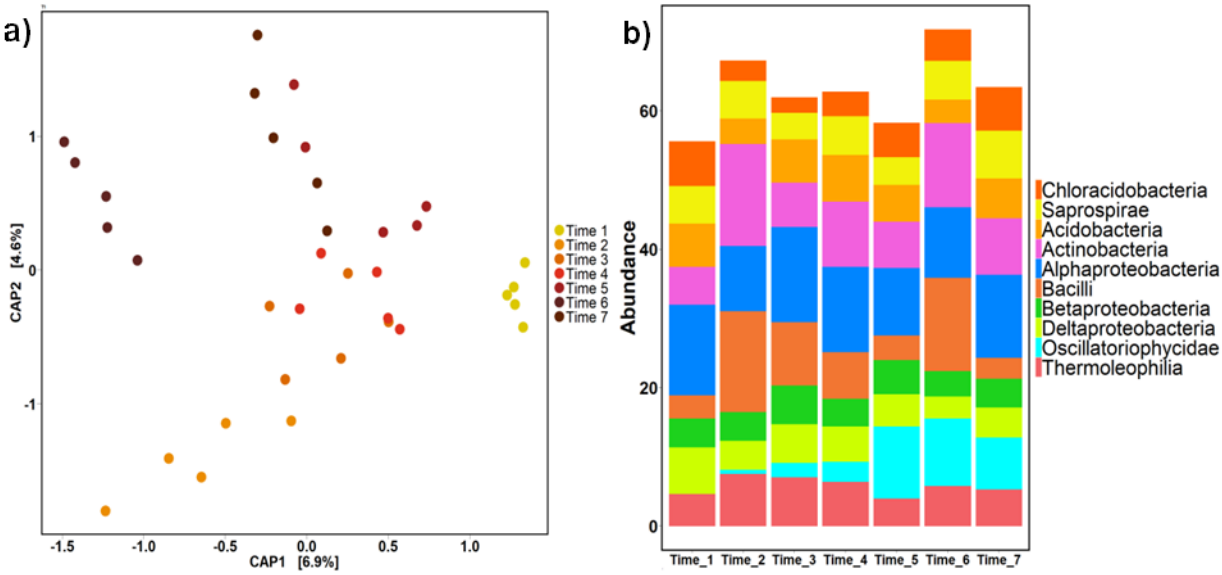
Figura 11 - Análise restrita das coordenadas principais (CAP) mostrando as diferenças entre o solo das amostras de Bulk Soil (amarelo) e da rizosfera (marrom), com significância da ordenação F=2,4778 (p=0,001).



5.6.Efeito dos inoculantes na comunidade bacteriana da rizosfera

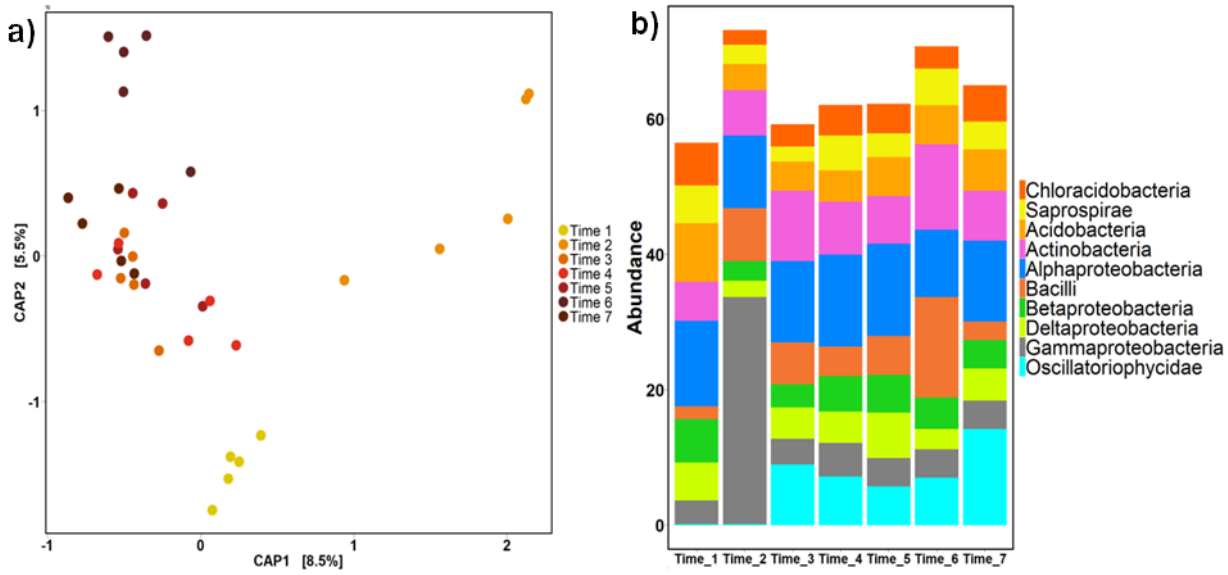
Para avaliar o efeito de cada tratamento ao longo do tempo os dados foram divididos para cada inoculante. No tratamento 1, sem a inoculação de microrganismos, a análise de coordenadas principais restringidas para o fator tempo foi significativa (Significância da ordenação F=1,3527 p=0,001) e mostra as diferenças na estrutura da comunidade rizosférica ao longo do tempo (claro para escuro) (Figura 12a). O Barplot (Figura 12b) correspondente a este tratamento mostra a abundância relativa das 10 classes mais abundantes.

Figura 12 - Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento controle (Tratamento 1) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo (tempo 1,3,5 e 7 correspondem a amostragens 48h antes da inoculação, e o tempo 2,4 e 6 48h após a inoculação de microrganismos) **b)**Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.



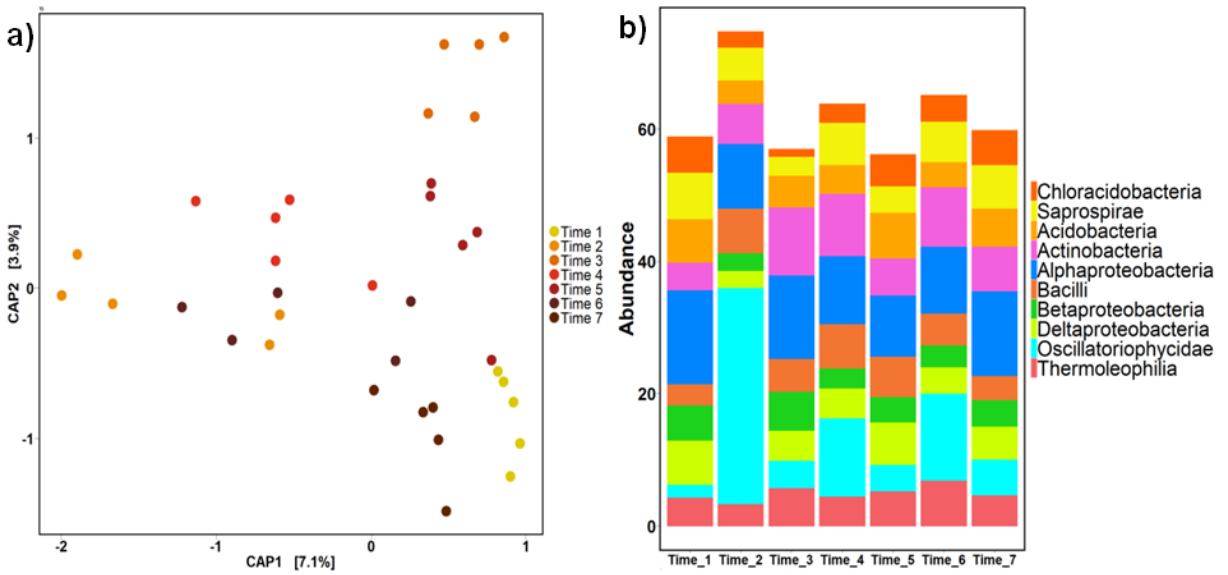
No tratamento 2, com inoculação de bactérias do gênero *Lysinibacillus*, foi possível observar uma mudança abrupta da estrutura da comunidade do tempo 1 em relação aos demais (Significância da ordenação F=1,72 p=0,001)(Figura 13a). Principalmente no tempo 2, em que houve um aparecimento de *Gammaproteobacteria* (Figura 13b). Além disso, neste mesmo período, a classe *Bacilli*, a qual pertence o inóculo de T2 aumentou visivelmente com o decorrer do experimento.

Figura 13 - Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento inoculado com isolado do gênero *Lysinibacillus* (*Bacilli*) (Tratamento 2) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo **b)** Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.



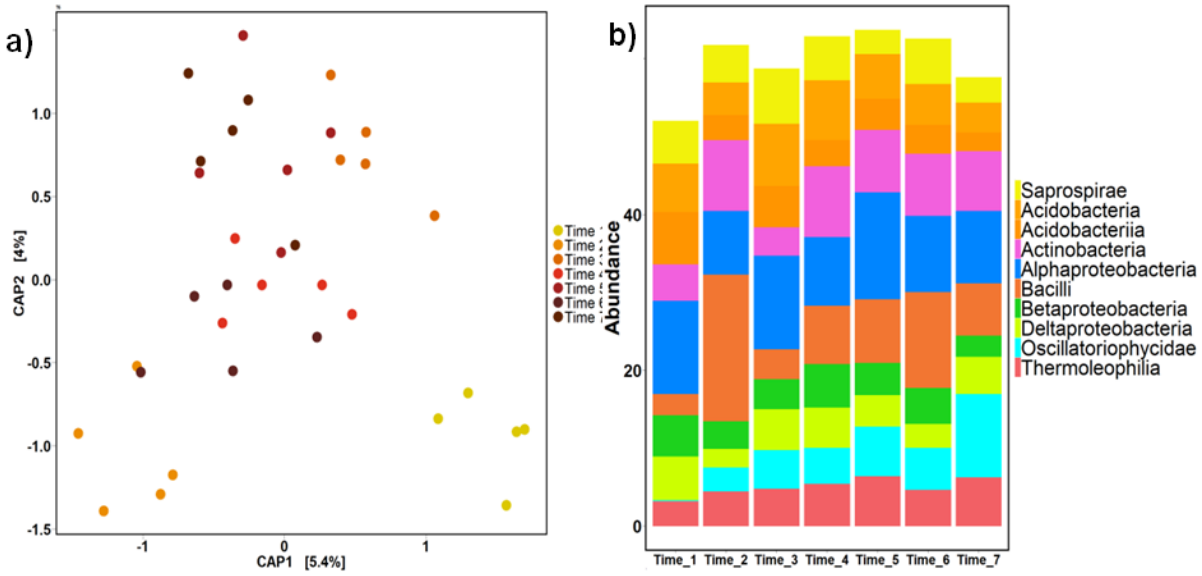
O tratamento 3 é composto por *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) e também apresentou mudanças na comunidade bacteriana do tempo 1 em relação aos demais (Significância da ordenação F=1,3517 p=0,001) (Figura 14a). Foi possível observar o aumento de *Oscillatoriophycidae*, principalmente no tempo 2 (Figura 14b), enquanto a classe *Gammaproteobacteria* não está entre as mais abundantes para este tratamento.

Figura 14 - Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento inoculado com isolado do gênero *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) (Tratamento 3) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo **b)** Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.



A adição do tratamento 4, composta por *Paenibacillus*, causou efeito parecido ao observado no tratamento 2 (Significância da ordenação F= 1,2676 p=0,001) (Figura 15a). A Classe *Bacilli*, a qual pertence o inóculo de T4 aumentou visivelmente após o tempo 2 (Figura 15b)

Figura 15 - Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento inoculado com isolado do gênero *Paenibacillus* (*Bacilli*) (Tratamento 4) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo **b)** Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.



A análise de coordenadas principais do tratamento 5, composto pelo gênero *Paenarthrobacter*, apresentou aumento da classe de *Actinobactérias*, ao longo do experimento, principalmente no tempo 6 (Significância da ordenação F=1,2716 p=0,001) (Figura 16a). A classe *Bacilli*, também teve um aumento expressivo principalmente no tempo 2 como é possível observar na Figura 16b.

O Tratamento 6, composto pelo gênero *Bacillus*, aumentou visivelmente a classe pertencente a esta bactéria com o passar do tempo (Significância da ordenação F=1,2027 p=0,001) (Figura 17a). Sendo possível observar no barplot (Figura 17b) que o aumento ocorre principalmente nas amostragens após a inoculação dos microrganismos no solo (tempo 2, 4 e 6), demonstrando uma boa resposta da bactéria quando inoculada no solo.

Figura 16 - Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento inoculado com isolado do gênero *Paenarthrobacter* (*Actinobacteria*) (Tratamento 5) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo **b)** Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.

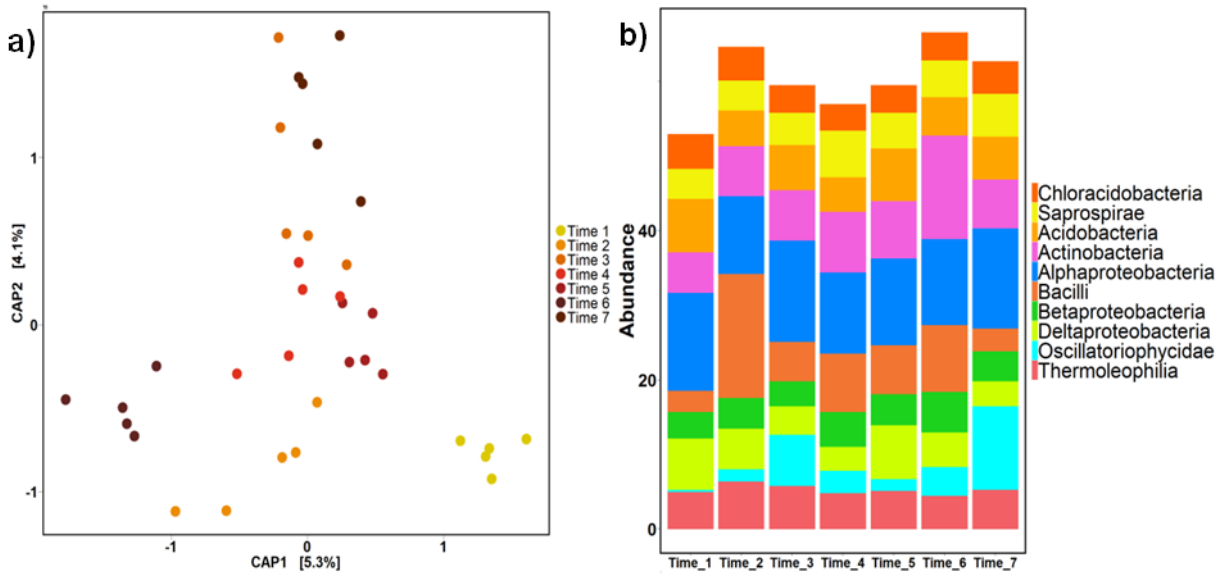
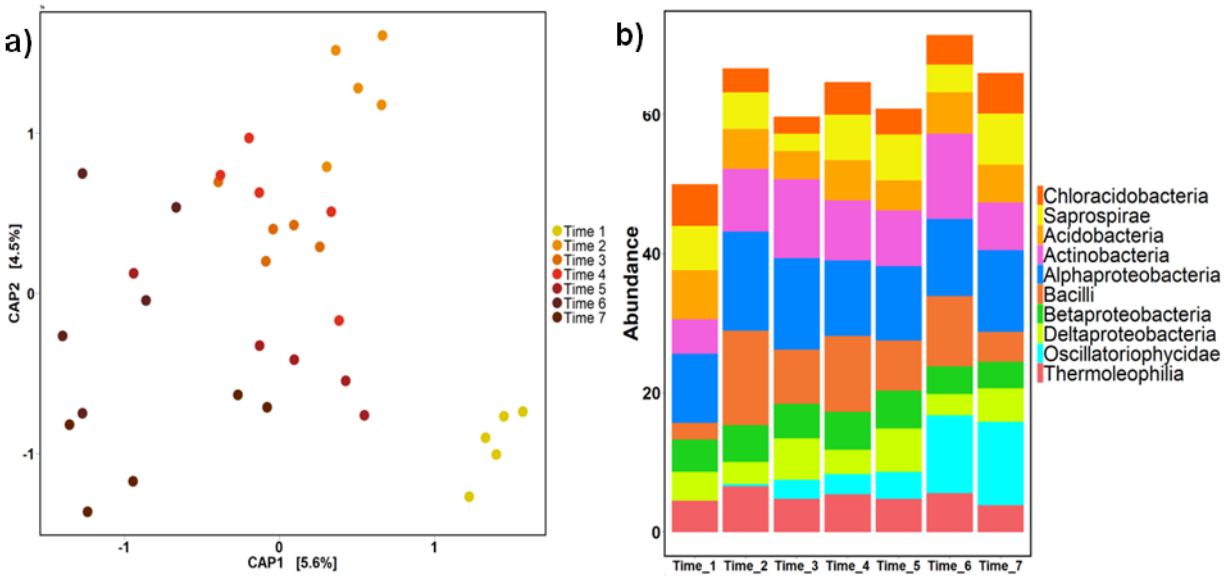


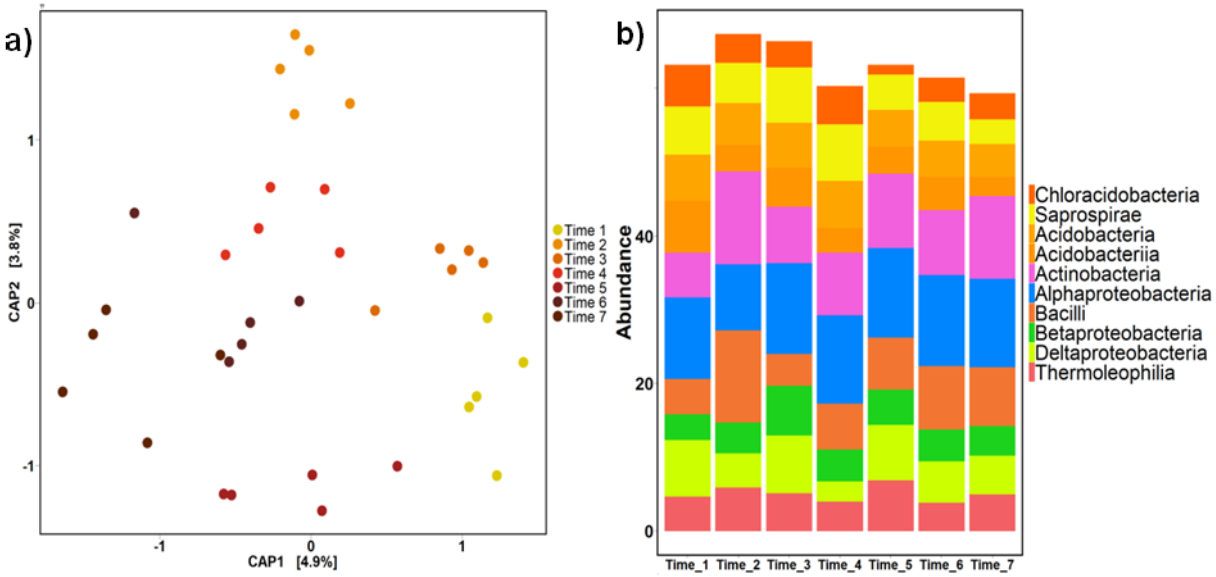
Figura 17 - Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento inoculado com isolado do gênero *Bacillus* (*Bacilli*) (Tratamento 6) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo **b)** Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.



A análise do tratamento 7, que corresponde a uma bactéria do gênero *Streptomyces* também demonstra um amento da classe de actinobactérias (Significância da ordenação F=1,1496 p=0,002) e aumento da classe *Bacilli* (Figura 18). Demonstrando um

comportamento semelhante ao observado no tratamento 5, cujo o inóculo pertence a mesma classe que o tratamento 7 de *Actinobacterias.*

Figura 18 - Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento inoculado com isolado do gênero *Streptomyces* (*Actinobacteria*) (Tratamento 7) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo **b)** Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.



A partir do tratamento 8, começamos a analisar os inoculantes com consórcios de microrganismos. Sendo que o T8 corresponde a duas bactérias da classe *Bacilli* (*Lysinibacillus* e *Paenibacillus*) e uma *Gammaproteobacteria* (*Pseudomonas*). É interessante notar que nesse tratamento apareceu *Gammaproteobacteria*, embora tenha diminuído ao longo do tempo (Figura 19). A classe *Gammaproteobacteria* não foi observada em T3 (*Gammaproteobacteria-Pseudomonas* de forma isolada). Os outros dois *Bacillus* aumentaram a abundância relativa de *Bacilli*, mas não tanto quanto nos tratamentos de forma isolada (T2 e T4) (Significância da ordenação F=1,1584 p=0,002).

O tratamento 9 é composto por duas bactérias da classe *Actinobacteria* (*Paenarthrobacter* e *Streptomyces*) e um *Bacillus* (Classe *Bacilli*). Foi possível observar o aumento de ambas as classes, sendo que *Bacilli* apresentou um crescimento mais expressivo no tempo 2 e *Actinobacteria* aumentando com o passar do tempo, principalmente nas amostras correspondentes as duas últimas inoculações (Significância da ordenação F=2,3624 p=0,001) (Figura 20).

Figura 19 – Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento inoculado com isolado dos gêneros *Lysinibacillus*, *Paenibacillus* e *Pseudomonas* (Tratamento 8) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo **b)** Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.

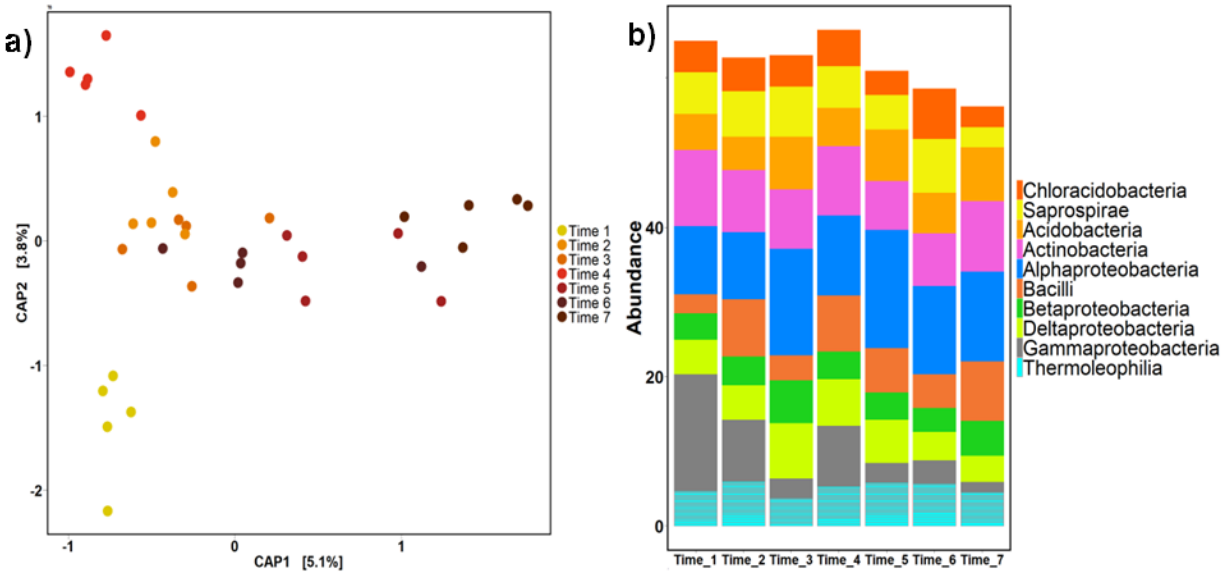
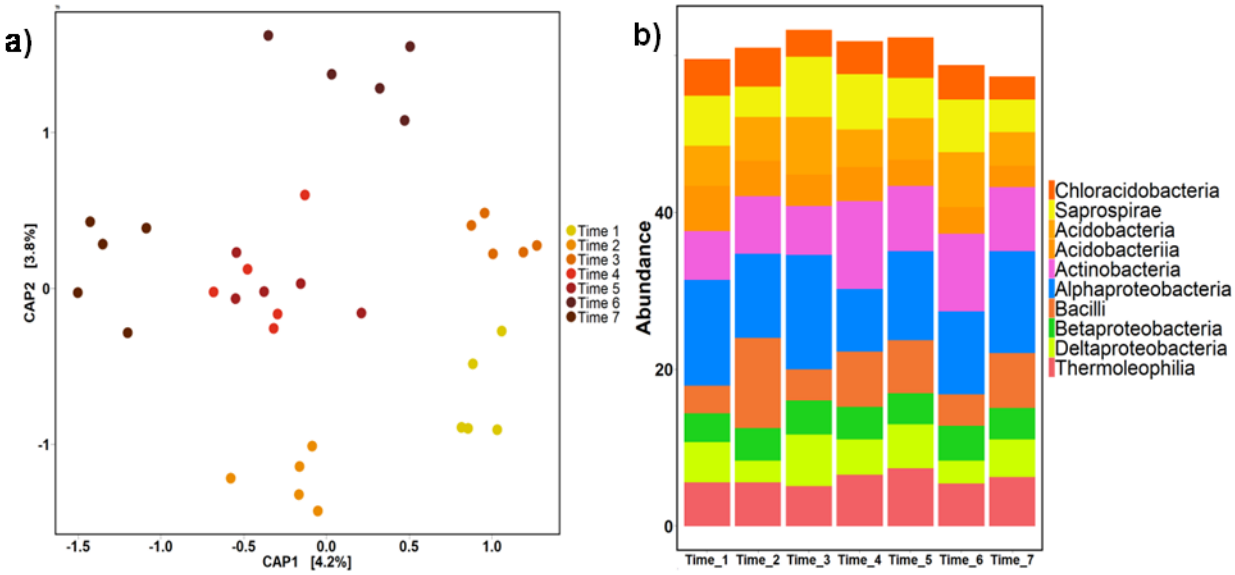
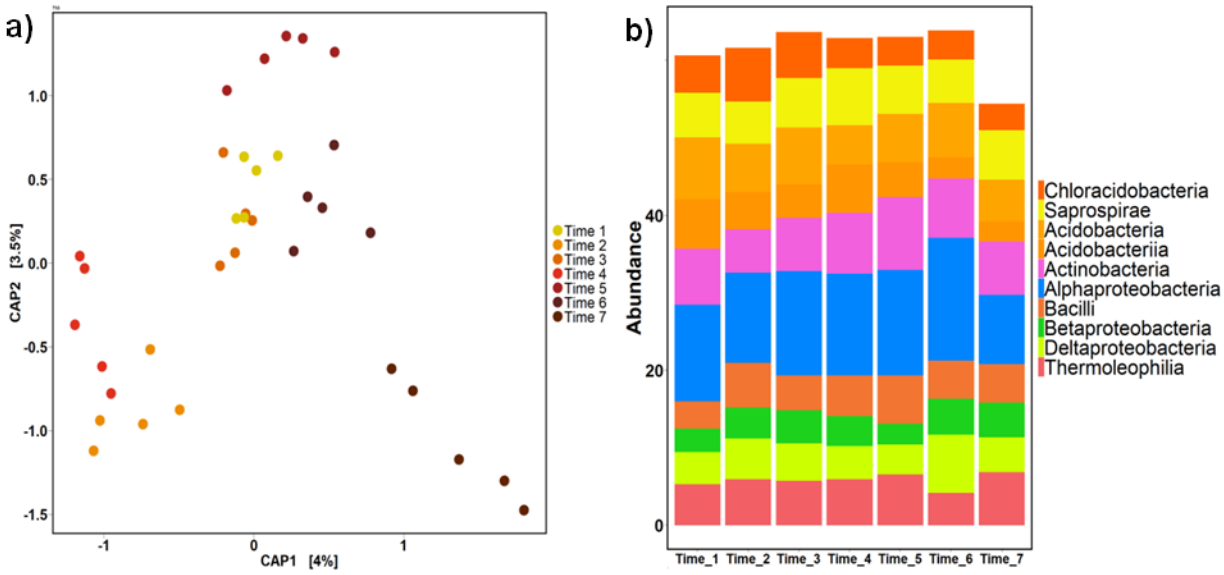


Figura 20 - Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento inoculado com isolado dos gêneros *Paenarthrobacter, Streptomyces* e *Bacillus* (Tratamento 9) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo **b)** Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.



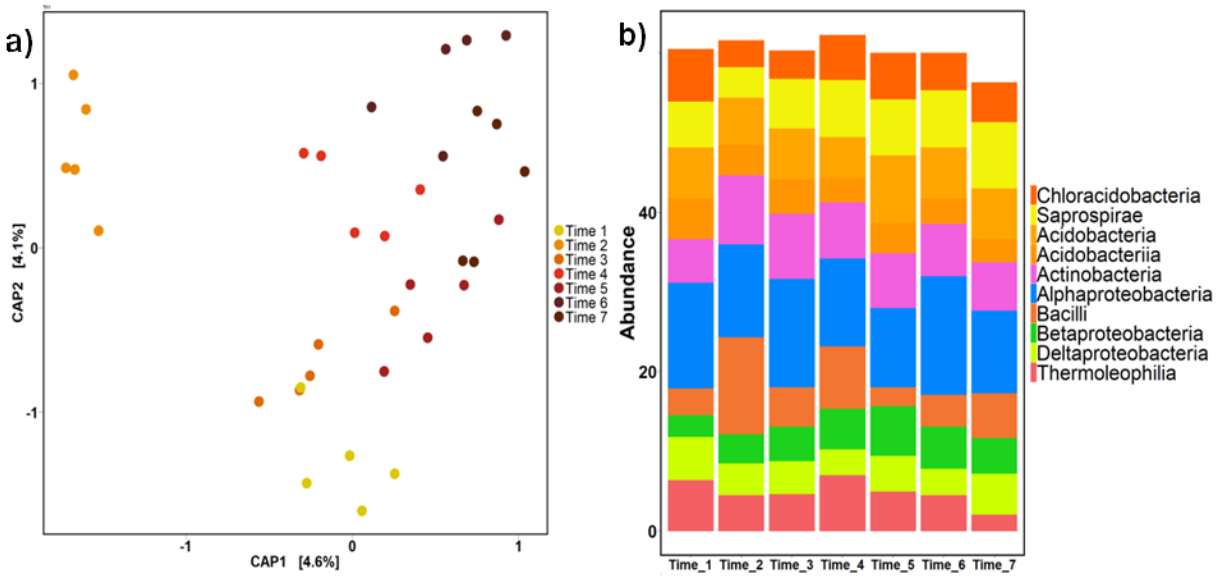
Com a adição de todos os microrganismos descritos anteriormente, no tratamento 10, é possível observar que as abundâncias ao longo do tempo se mantiveram mais constantes, sem um aumento expressivo de nenhuma das classes demonstradas (Significância da ordenação F=2,1353 p=0,001) (Figura 21).

Figura 21 - Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento inoculado com isolados de todos microrganismos utilizados neste estudo (Tratamento 10) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo **b)** Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.



O tratamento 11, que corresponde ao *Azospirillum brasilense* (Classe *Alphaproteobacteria*), demonstrou um aumento da classe deste microrganismo no tempo 6, mas mantendo-se constante em alta abundância ao longo de todo o ciclo do experimento (Figura 22a). Além disso, no tempo 2 e 4 também houve um aumento de *Bacilli*, que diminuiu nas demais amostragens (Significância da ordenação F=1,2096 p=0,001) (Figura 22b).

Figura 22 - Estrutura da comunidade bacteriana do tratamento inoculado com isolado do gênero *Azospirillum* (*Alphaproteobacteria*) (Tratamento 9) **a)** Análise de coordenadas principais restritas da estrutura da comunidade de bactérias da rizosfera do genótipo BRS Parrudo ao longo do tempo **b)** Abundância das principais classes presentes nas amostras ao longo do tempo.



De uma forma geral, foi possível observar que há um impacto na comunidade bacteriana após a inoculação de microrganismos, principalmente durante o tempo 2, quecorresponde a um tempo de desenvolvimento da planta de 15 dias após a semeadura. No tratamento 1 (Figura 12) – sem inoculação de microrganismos - as comunidades evoluem no tempo de uma forma mais uniforme e organizada, separando-se visivelmente com o passar do tempo, enquanto que após a adição do inoculante, principalmente de forma isolada ocorre uma alteração nos agrupamentos das comunidades bacterianas ao longo do tempo.

Em relação a diversidade da comunidade rizosférica, a Figura 23 demonstra a Alpha diversidade de cada inoculante em todos os tempos juntos, e o bulk soil de cada tempo separado. É possível observar que há uma um grande número de OTU's diferentes constatadas nas amostras de Bulk soil, principalmente no tempo 1, demonstrando uma riqueza maior de espécies nessas amostras. Esse efeito também é observado em outros trabalhos (Praeg et al., 2019), e corrobora com aqueles que demonstram que a estrutura da comunidade microbiana do solo é distinta da encontrada na rizosfera. Visto que a rizosfera comumente é composta por uma abundância maior de organismos, devido a presença das raízes e exsudação de compostos, entretanto possui menor diversidade biológica, por recrutar os microrganismos e possibilitar o desenvolvimento apenas dos mais adaptados as condições neste local (Barret et al., 2011).

Além disso, foi realizada a avaliação da Alpha diversidade para cada tempo e cada tratamento de forma separada, buscando a abundância correspondente a cada gênero utilizado neste estudo. Houve uma tendência nos tratamentos inoculados com microrganismos em apresentarem uma diversidade menor quando comparado ao controle, o que é esperado devido a inoculação microbiana e dominância das bactérias inseridas. A Figura 24 corresponde ao tratamento 1, sem a inoculação de microrganismos, ao longo de todos os tempos analisados.

Figura 23- Índices de diversidade alfa entre os tratamentos considerando todos os tempos juntos e Bulk Soil para cada tempo de observação**a)** número de OTUs observadas **b)** índice de diversidade de Shannon **c)** índice de diversidade de Simpson. BS1 = Bulk soil tempo (coleta) 1; BS2 = Bulk soil tempo (coleta) 2; BS3 = Bulk soil tempo (coleta) 3; BS4 = Bulk soil tempo (coleta) 4; BS5 = Bulk soil tempo (coleta) 5; BS6 = Bulk soil tempo (coleta) 6; BS7 = Bulk soil tempo (coleta) 7; T1 = controle; T2 = CMAA 1742 (*Lysinibacillus*); T3= CMAA 1741 (*Pseudomonas*); T4 = CMAA 1739 (*Paenibacillus*); T5 = CMAA 1740 (*Paenarthrobacter*); T6 = CMAA 1743 (*Bacillus*); T7 = CMAA 1738 (*Streptomyces*); T8= CMAA 1742 + CMAA 1741 + CMAA 1739; T9= CMAA 1740 + CMAA 1743 + CMAA 1738 ; T10 = Todos os isolados; T11 = *Azospirillum brasilense*.

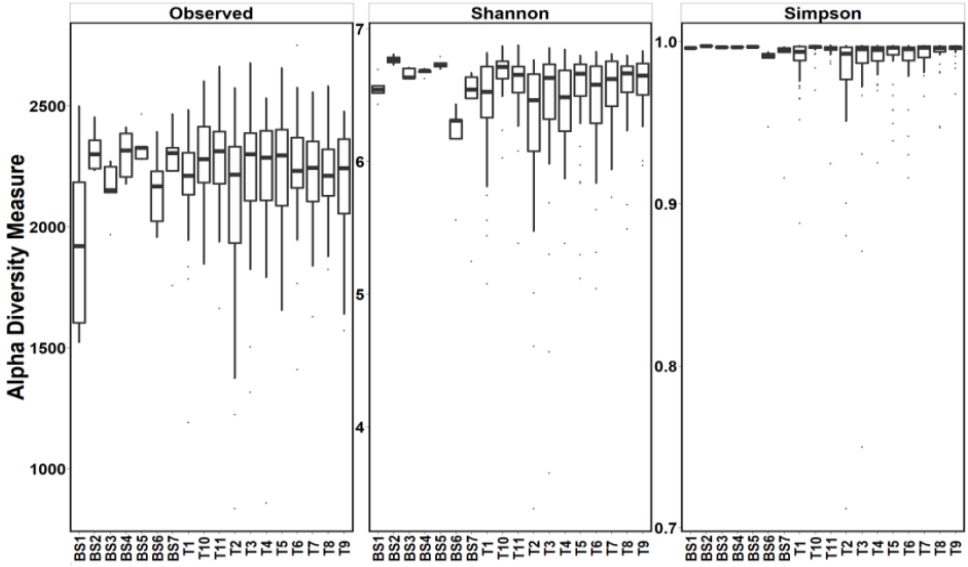
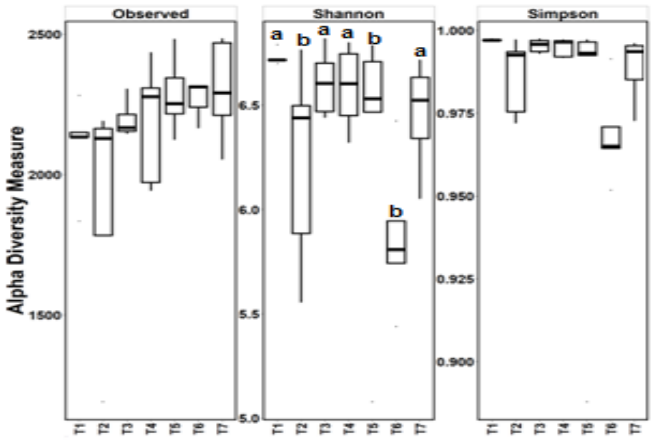


Figura 24 - Índices de diversidade alfa observado na rizosferadas plantas de trigo no tratamento controle (Tratamento 1) sem inoculação de microrganismos**a)** número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson. Letras mostram significância pelo teste de Scott-Knott, considerando que p <0,05.**T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).



É possível observar que todos os tratamentos apresentaram um aumento na abundância dos gêneros inoculados em cada tratamento, enquanto a diversidade diminui com a

inoculação. Além disso, barplots ilustram a somatória das OTUs afiliadas ao gênero do qual o inoculante pertence. No tratamento 2, com *Lyinibacillus*, (Figura 25), há um aumento deste gênero no tempo 2, e o mesmo se repete em todas as outras amostragens após a inoculação (tempo 4 e 6), apresentando diferença estatística para os índices de Shannon e Simpson. Este inóculo apresenta abundância relativamente alta e constante durante todo o desenvolvimento da cultura, com picos após adição do inoculante (Figura 25b). Vale ressaltar que a Figura 25b ilustra uma aproximação, e não uma medição da abudância do inoculante propriamente dita, visto que para isso qPCR com primers específicos devem ser realizados.

Ao observar a abundância do gênero de *Pseudomonas*, que corresponde ao inóculo do tratamento 3 (Figura 26b), há um aumento muito expressivo durante o tempo 2, após a primeira inoculação, e o mesmo se repete nos tempos 4 e 6. Entretanto, é visível a diminuição da abundância nas amostragens antes da inoculação, demonstrando que o a abundância desta bactéria diminui com o passar do tempo apesar do aumento após o tratamento. A diversidade foi estatisticamente diferente apenas no tempo 2, em todos os índices analisados, como ilustrado na Figura 26a.

Figura 25 - Índices de diversidade alfa e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Lysinibacillu s*(Tratamento 2) **a)** Número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson **b)** Abundância do gênero *Lysinibacillus* (representada por duas OTUs). As letras mostram significância pelo teste de Scott-Knott, considerando que p <0,05. **T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).

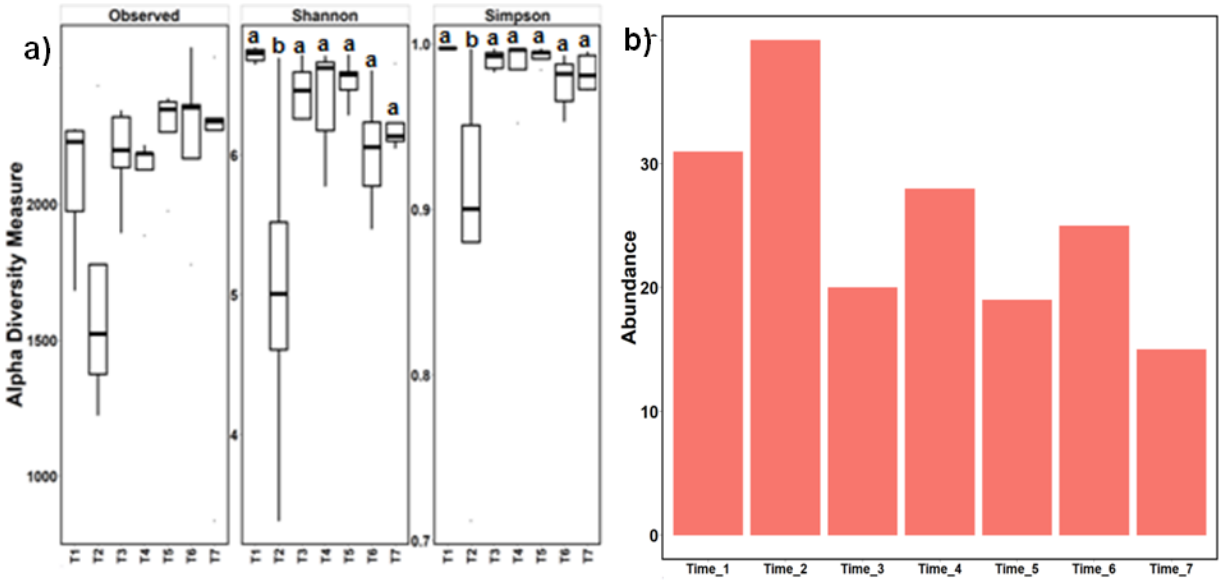
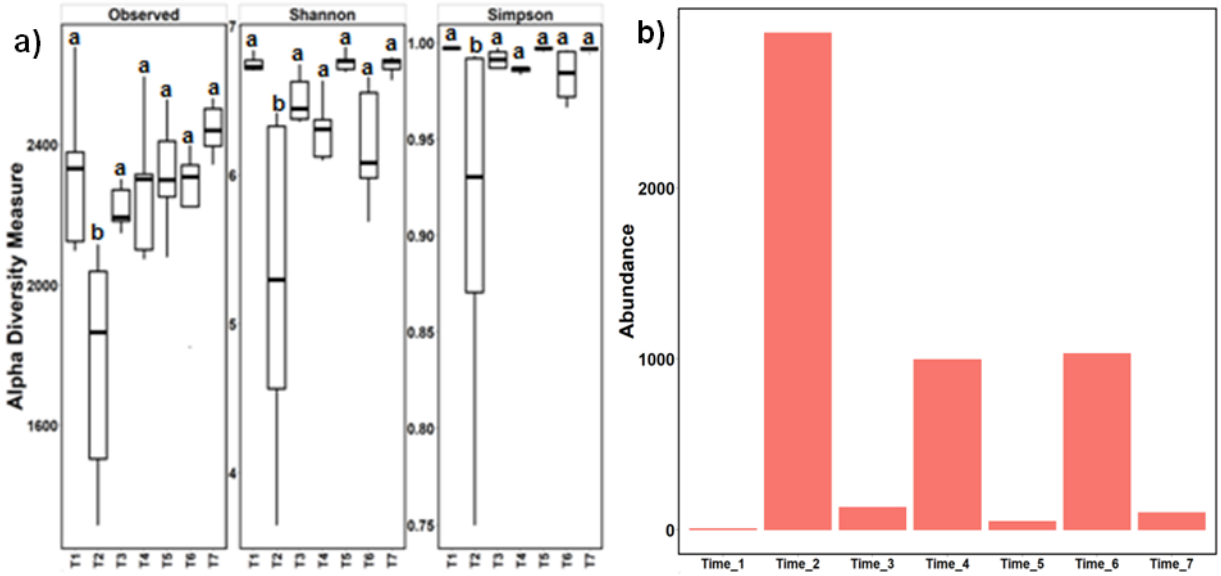


Figura 26 - Índices de diversidade alfa e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Pseudomonas* (Tratamento 3) **a)** número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson **b)** Abundância do gênero *Pseudomonas* (representada por vinte e cinco OTUs). As letras mostram significância pelo teste de Scott-Knott, considerando que p <0,05.**T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).



O tratamento 4, que corresponde ao gênero *Paenibacillus* (Figura 27), apresentou grande aumento da abundância do inóculo de forma semelhante para o tempo 2 e 4, em quanto que nos demais períodos o inóculo se manteve constante e sem muita alteração com a última inoculação (tempo 6). A diversidade não apresentou diferença estatística apesar da diminuição visível (principalmente no índice de Shannon) nos últimos dois tempos analisados.

Em relação ao tratamento com bactérias do gênero *Paenarthrobacter*, as análises de abundância foram realizadas buscando-se pela Família *Micrococcaceae*, a qual o inóculo do tratamento 5 pertence (Figura 28). Foi possível observar um aumento sempre após as inoculações, mas de forma mais expressiva para este tratamento durante a última inoculação (tempo 6).

Figura 27 – Índices de diversidade alfa e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Paenibacillus* (Tratamento 4) **a)** número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson **b)** Abundância do gênero a e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Paenibacillus* (representada por sessenta e oito OTUs). **T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).

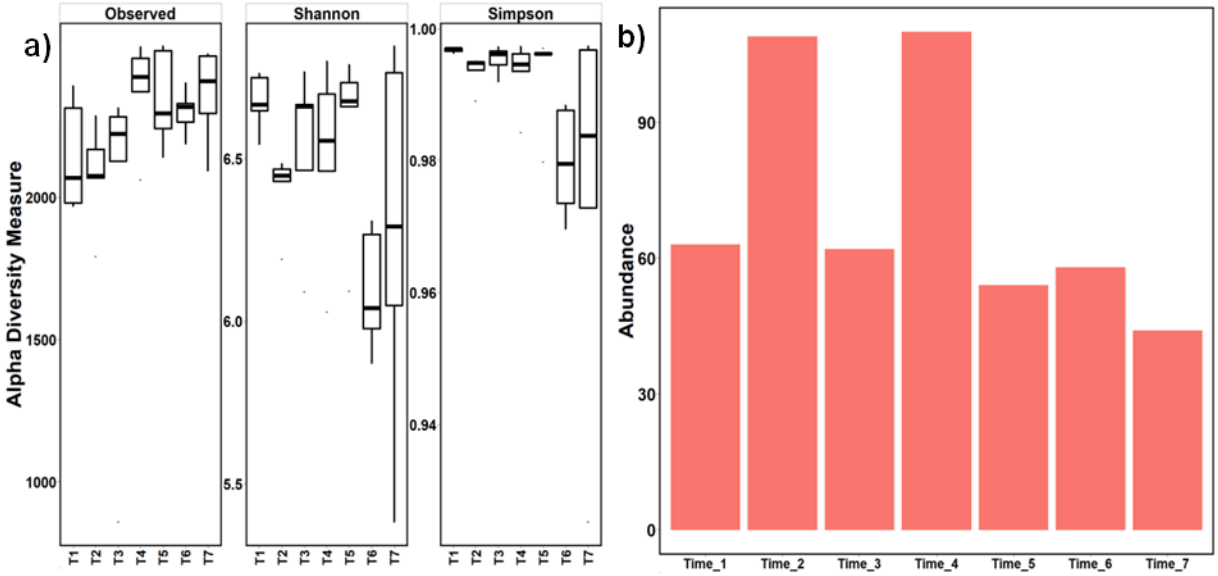
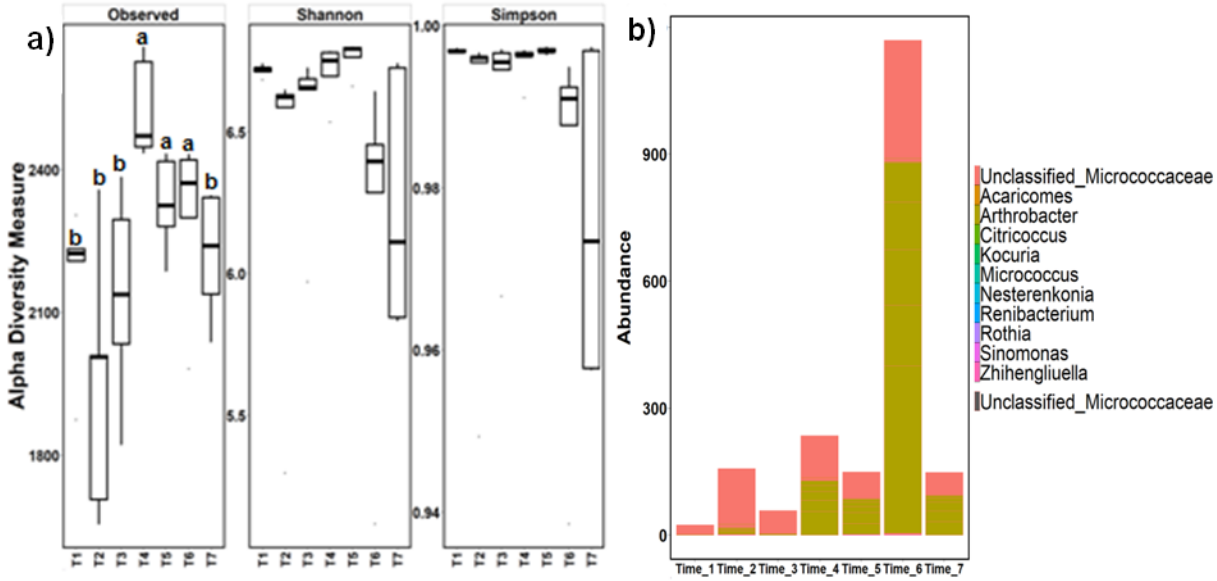
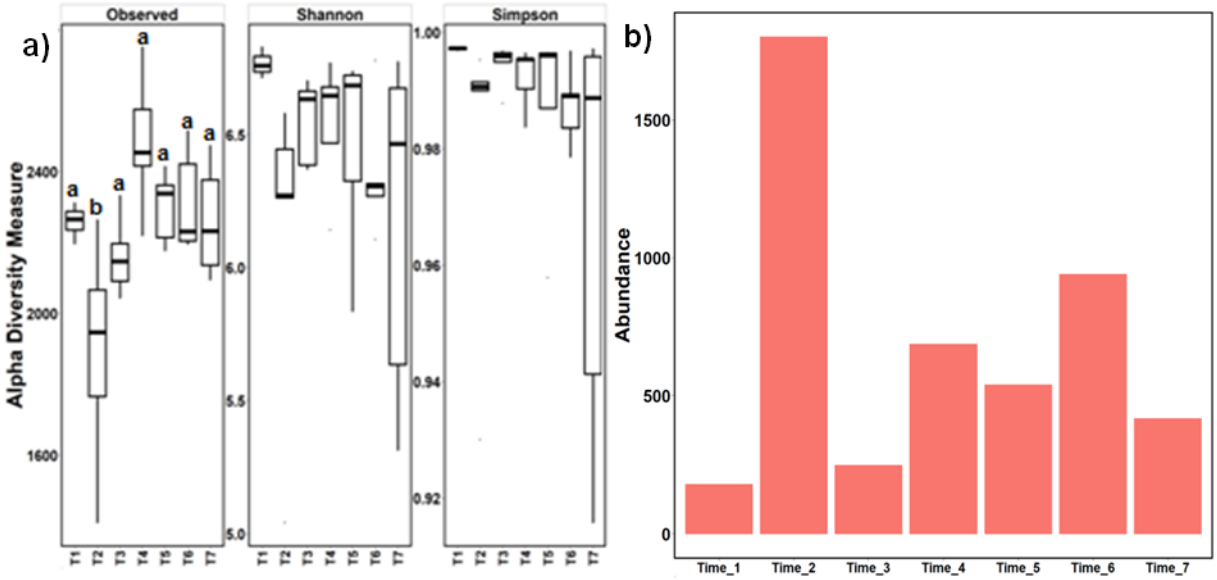


Figura 28. Índices de diversidade alfa e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Paenarthrobacter* (Tratamento 5) **a)** número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson **b)** Abundância do da Família *Micrococcaceae* (representada por 50 OTUs). As letras mostram significância pelo teste de Scott-Knott, considerando que p <0,05. **T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).



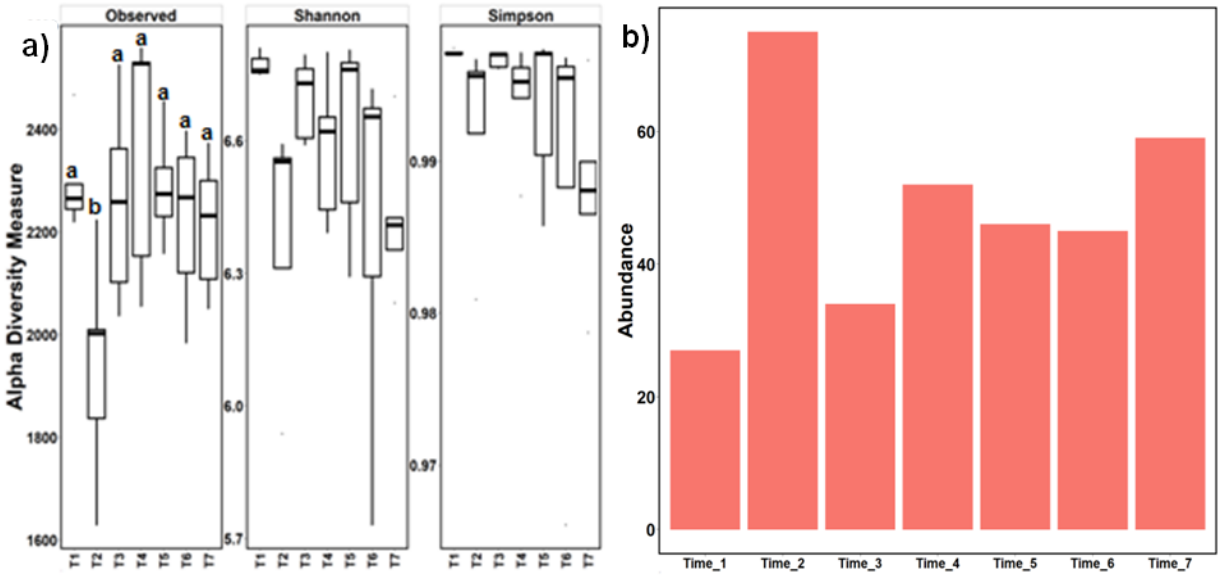
O tratamento 6, composto pelo gênero *Bacillus*, comportou-se de forma semelhante aos demais, aumentando de forma expressiva no tempo 2 (Figura 29) e sempre após as inoculações. Com o passar do tempo a abundância dos microrganismos deste gênero foram aumentando no solo.

Figura 29 - Índices de diversidade alfa e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Bacillus* (Tratamento 6) **a)** número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson **b)** Abundância do gênero *Bacillus*(representada pornoventa e três OTUs). As letras mostram significância pelo teste de Scott-Knott, considerando que p <0,05.**T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).



Na Figura 30 é possível observar a diversidade e abundância do tratamento 7, que refere-se ao gênero *Streptomyces*, onde com a aplicação deste inóculo, a abundância das bactérias deste gênero foi aumentando com o passar do tempo, se mantendo altos níveis após as primeiras inoculações e sem diminuir no tempo 7, o que não foi observado nos demais tratamentos. Sugerindo que a bactéria se estabeleceu no solo e conseguiu manter constante a abundância após adição de inóculo.

Figura 30 – Índices de diversidade alfa e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Streptomyces* (Tratamento 7) **a)** número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson **b)** Abundância do gênero Streptomyces (representada por vinte e nove OTUs). As letras mostram significância pelo teste de Scott-Knott, considerando que p <0,05.**T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).



Os tratamentos 8 (Figura 31) e 9 (Figura 32), que correspondem a misturas de três microrganismos, sendo T8 selecionados como solubilizadores de fosfato e T9 como produtores de AIA, se comportaram de forma muito semelhante. Havendo um microrganismo que se cresceu de forma bem expressiva (*Pseudomonas* no tratamento 8 e *Bacillus* no tratamento 9) e os demais com abundâncias maiores após a inoculação. As *Pseudomonas* (T8) demonstraram crescimento parecido com o observado de forma isolada para este gênero (T3). O gênero *Micrococcaceae*, no tratamento 9, teve um crescimento expressivo a partir do tempo 4, ou seja, após a segunda inoculação.

Figura 31– Índices de diversidade alfa e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Lysinibacillus, Pseudomonas* e *Paenibacillus* (Tratamento 8) **a)** número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson **b)** Abundância dosgêneros *Lysinibacillus, Pseudomonas* e *Paenibacillus* (representado por cento e setenta e seteOTUs). **T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).

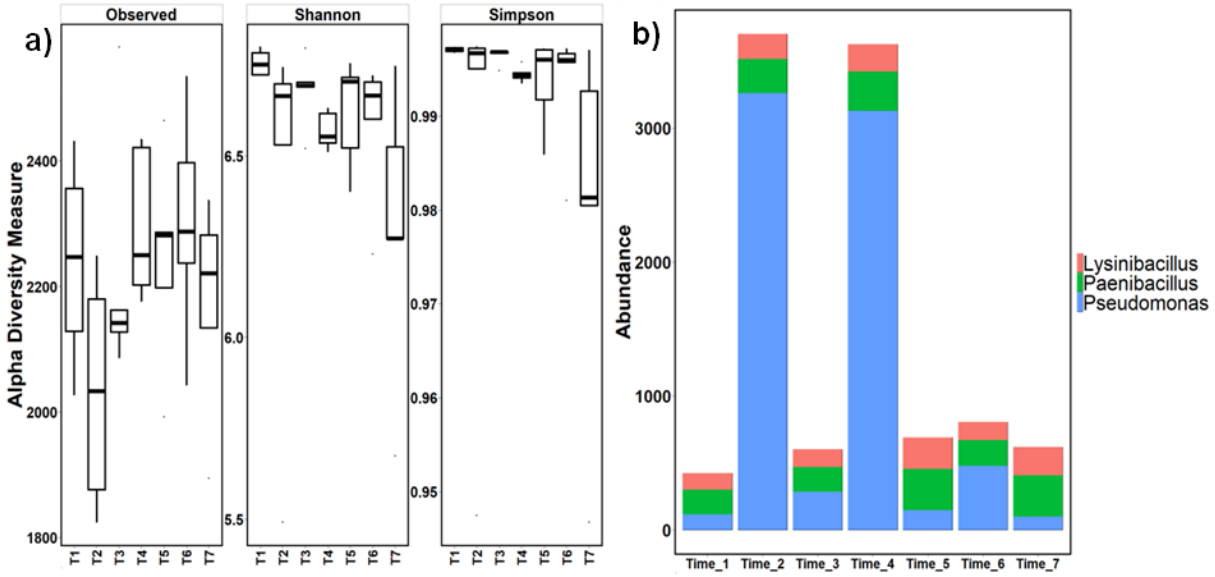
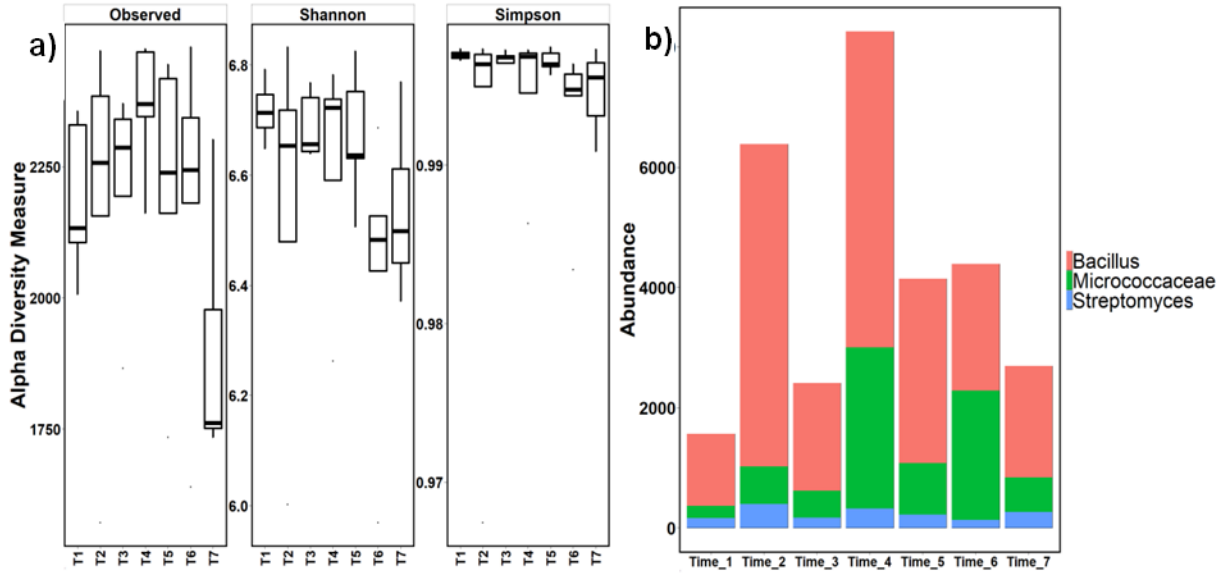
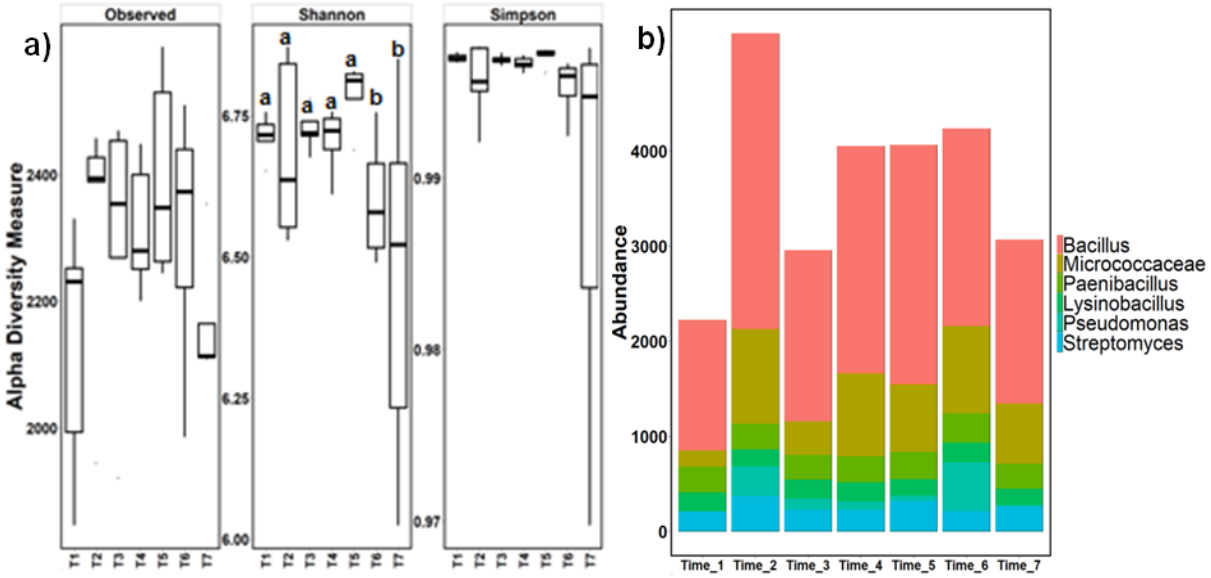


Figura 32 - Índices de diversidade alfa e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Bacillus, Streptomyces* e *Micrococcaceae* (Tratamento 9) **a)** número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson **b)** Abundância dos gêneros *Bacillus, Streptomyces* e *Micrococcaceae* (representado por trezentos e vinte e dois OTUs). [1]**T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).



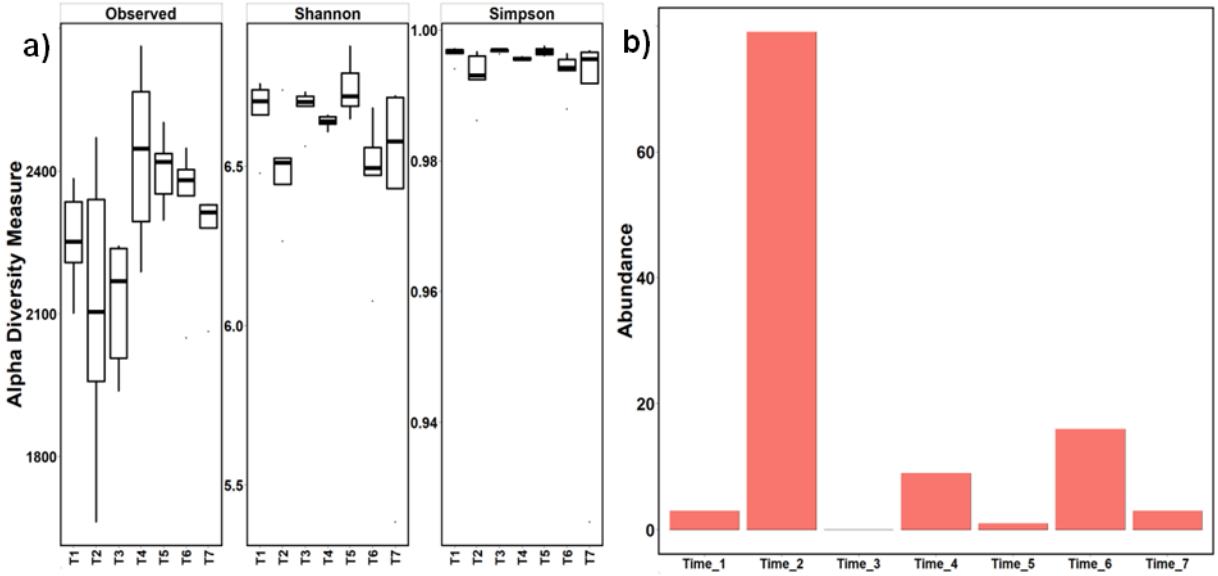
No caso do tratamento 10 (Figura 33), que corresponde a todos os 6 microrganismos juntos, o mesmo perfil na distribuição da abundância pode ser considerado, com um aumento no tempo 2. Entretanto com o passar do tempo houve uma tendência a um equilíbrio das OTUS, sem aumentos nem diminuições expressivas. Diferenças estatísticas foram observadas no índice de Shannon, sendo este menor nos dois últimos períodos avaliados.

Figura 33 –Índices de diversidade alfa e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Bacillus, Paenibacillus, Lysinibacillus, Pseudomonas, Streptomyces* e Família *Micrococcaceae* (Tratamento 10) **a)** número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson **b)** Abundância dos gêneros *Bacillus, Paenibacillus, Lysinibacillus, Pseudomonas, Streptomyces* e Família *Micrococcaceae* (representado por quatrocentos e cinqüenta e trêsOTUs). **T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).



O *Azospirillum* (Tratamento 11), demonstrou um grande aumento na abundância durante o tempo 2, com diminuição drástica nas coletas anteriores a inoculação (tempo 3, 5 e 7). Evidenciando que após a adição do inóculo há um aumento destes microrganismos, mas que não se mantem com o passar do tempo, como é possível observar na Figura 34.

Figura 34. Índices de diversidade alfa e abundância observado na rizosfera das plantas de trigo após a inoculação de *Azospirillum brasilense* (Tratamento 11) **a)** número de OTUs observadas, índice de diversidade de Shannon e índice de diversidade de Simpson **b)** Abundância do gênero *Azospirillum* (representado por três OTUs). **T1** = Tempo 1 (48 h antes da inoculação); **T2** = Tempo 2 (48 h após a inoculação); **T3** = Tempo 3 (48 h antes da inoculação); **T4** = Tempo 4 (48 h após a inoculação); **T5** = Tempo 5 (48 h antes da inoculação); **T6** = Tempo 6 (48 h após a inoculação); **T7** = Tempo 7 (48 h antes da inoculação).



Diante de todas as análises, é possível perceber que alterações mais significativas nas comunidades bacterianas ocorrem principalmente no início do desenvolvimento da cultura, especialmente no período de aproximadamente 15 dias. Esses dados corroboram com trabalhos onde a idade das plantas inoculadas causou uma mudança na estrutura da comunidade microbiana principalmente nas primeiras semanas após o plantio (Piromyou et al., 2011).

No início do desenvolvimento a planta recruta mais microrganismos, a fim de estabelecer a sua microbiota. Sendo assim, espera-se que neste período inicial a exsudação radicular esteja mais ativa e propícia para colonização e desenvolvimento bacteriano. O que ajuda a entender a grande alteração das comunidades quando a inoculação é realizada justamente no primeiro período de avaliação.

Com o passar do tempo e crescimento vegetal, a rede de interações das plantas com os microrganismos presentes na sua rizosfera tende a ficar mais complexa, e por isso é mais difícil ver grandes efeitos da inoculação ao longo do ciclo da cultura. O que sugere que os efeitos das inoculações mais tardias sejam de fato menos expressivos, devido à estruturação do microbioma vegetal já estar mais consolidado.

As informações a respeito do impacto da inoculação de microrganismos no desenvolvimento da planta, abundância e diversidade das comunidades bacterianas da rizosfera agregam na nossa compreensão sobre a relação planta-microrganismo na natureza e ajuda na busca de novas estratégias orientadas pelo microbioma, afim de estabelecer uma agricultura mais eficaz e sustentável.

6. CONCLUSÃO

O uso de inoculantes na agricultura é uma alternativa viável para um manejo mais sustentável e equilibrado sem diminuir os níveis de produção e tecnológicos já alcançados.Entretanto, algumas inconsistências de resultados obtidos quando formulações microbianas são utilizadas principalmente em genótipos diferentes de uma mesma espécie, ainda são grandes limitações desta tecnologia.

Assim, é importante considerar o impacto do microbioma do solo e da rizosfera na eficiência da inoculação, sendo que neste contexto o presente estudo obteve estirpes de diferentes gêneros de bactérias isoladas de plantas de trigo testadas quanto a promoção de crescimento *in vitro* mas que apresentaram respostas distintas quando inoculadas nas plantas. Foi possível observar uma significativa promoção de crescimento com destaque para plantas inoculadas com bactérias do gênero *Lysinibacillus* e *Pseudomonas* na cultivar BRS Parrudo. Porém os resultados evidenciaram que a interação benéfica é cultivar-dependente, visto que se utilizando o mesmo tratamento, cada cultivar de trigo testado apresentou uma resposta.

Esses resultados sugerem que o desenvolvimento de inoculantes deve ser cultivar específico, aprimorando os estudos de bactérias que sejam benéficas de acordo com o genótipo a ser utilizado e não recomendado de maneira genérica.

Adicionalmente, o estudo revelou que a introdução do inoculante diminui a diversidade da comunidade bacteriana presente no solo, com impacto mais acentuado no início do ciclo. Demonstrando a importância de integrar os princípios da ecologia microbiana no desenvolvimento de produtos para aperfeiçoar a eficiência da colonização bacteriana e sobrevivência do inóculo no solo.

REFERÊNCIAS

Achtman, M. (2002).A phylogenetic perspective on molecular epidemiology.In Molecular medical microbiology (pp. 485-509).Academic Press.

AGROFIT. Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 10/12/2019.
Agrolink (2019).

AGROLINK. "Haverá grande expansão de inoculantes no Brasil". Disponível em <https://www.agrolink.com.br/noticias/-havera-grande-expansao-de-inoculantes-no-brasil-_423401.html>. Acesso em: 04/12/2019.

Akinrinlola, R. J., Yuen, G. Y., Drijber, R. A., &Adesemoye, A. O. (2018). Evaluation of Bacillus Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by In Vitro Physiological Traits. International Journal of Microbiology, 2018, 1–11.

Alexander, M. (1978).Introduction to soil microbiology. Soil Science, v. 125, n. 5, p. 331.

Ali, S., Isaacson, J., Kroner, Y., Saldias, S., Kandasamy, S., &Lazarovits, G. (2018). Corn sap bacterial endophytes and their potential in plant growth-promotion. Environmental Sustainability, 1(4), 341-355.

Andreote, F. D., & e Silva, M. D. C. P. (2017). Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture. Current opinion in microbiology, 37, 29-34.

Andreote, F. D., Gumiere, T., &Durrer, A. (2014).Exploring interactions of plant microbiomes. Scientia Agricola, 71(6), 528–539.

Andreote, F., &Raaijmakers, J. M. (2018).Embracing community ecology in plant microbiome research. Trends in plantscience, 23(6), 467-469.

Araujo, S.C (2013). A evolução da produção de inoculantes no Brasil. Disponível em < http://www.anpii.org.br/a-evolucao-da-producao-de-inoculantes-no-brasil/>, Acesso em: 03/12/2019.

Arcoverde, S. N. S. (2013). Qualidade de solos sob diferentes usos agrícolas na região do entorno do lago de Sobradinho–BA--. Juazeiro. 71p. Dissertação/Mestrado. Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Arkhipova T., Galimsyanova N., Kuzmina L., Vysotskaya L., Sidorova L., Gabbasova I., Melentiev A., Kudoyarova G. (2019). Effect of seed bacterization with plant growth-promoting bacteria on wheat productivity and phosphorus mobility in the rhizosphere. Plant Soil Environ., 65: 313-319.

Arora, N. K. (Ed.). (2013). Plant microbe symbiosis: fundamentals and advances (No. 579.5 P5). New Delhi: Springer.

Assainar, S. K., Abbott, L. K., Mickan, B. S., Whiteley, A. S., Siddique, K. H., &Solaiman, Z. M. (2018). Response of wheat to a multiple species microbial inoculant compared to fertiliser application. Frontiers in Plant Science, 9, 1601.

Bach, E., dos Santos Seger, G. D., de Carvalho Fernandes, G., Lisboa, B. B., & Passaglia, L. M. P. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria.Applied soil ecology, 99, 141-149.

Bakker, P. A., Berendsen, R. L., Doornbos, R. F., Wintermans, P. C., & Pieterse, C. M. (2013). The rhizosphere revisited: root microbiomics. Frontiers in plant science, 4, 165.

Baldani, J. I., &Baldani, V. L. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 77(3), 549-579.

Baris, O., Sahin, F., Turan, M., Orhan, F., &Gulluce, M. (2014). Use of plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) seed inoculation as alternative fertilizer inputs in wheat and barley production. Communications in soil science and plant analysis, 45(18), 2457-2467.

Barret, M., Morrissey, J. P., & O'Gara, F. (2011). Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. Biology and Fertility of Soils, 47(7), 729–743.

Bashan, Y., de-Bashan, L. E., Prabhu, S. R., & Hernandez, J. P. (2014). Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). Plant and Soil, 378(1–2), 1–33.

Beleggia, R., Rau, D., Laidò, G., Platani, C., Nigro, F., Fragasso, M., ...& Papa, R. (2016). Evolutionary metabolomics reveals domestication-associated changes in tetraploid wheat kernels. Molecular biology and evolution, 33(7), 1740-1753.

Bell, G. D. H. (1987). The history of wheat cultivation.In Wheat breeding (pp. 31-49).Springer, Dordrecht.

Bellucci, E., Bitocchi, E., Ferrarini, A., Benazzo, A., Biagetti, E., Klie, S., ... &Venturini, L. (2014). Decreased nucleotide and expression diversity and modified coexpression patterns characterize domestication in the common bean. The Plant Cell, 26(5), 1901-1912.

Berendsen, R. L., Pieterse, C. M., & Bakker, P. A. (2012).The rhizosphere microbiome and plant health.Trends in plant science, 17(8), 478-486.

Berg, G. (2009). Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Applied Microbiology and Biotechnology, 84(1), 11–18.

Berg, G., Rybakova, D., Grube, M., &Köberl, M. (2015). The plant microbiome explored: implications for experimental botany. Journal of Experimental Botany, 67(4), 995-1002.

Bertin, C., Yang, X.H., and Weston, L.A. (2003) The role of root exudates and allele chemicals in the rhizosphere. Plant Soil 256: 67–83

Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Touraine, B., Normand, P., &Cleyet-Marel, J. C. (2000).Stimulation of the ionic transport system in Brassica napus by a plant growth-promoting rhizobacterium (Achromobacter sp.). CanadianJournalofMicrobiology, 46(3), 229-236.

Binneck, E. (2004). As ômicas: integrando a bioinformação. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, 32, 28-37.

Board, N. I. I. R. (2004). The complete technology book on bio-fertilizer and organic farming, 2nd edn. NIIR Project Consultancy Services, New Delhi

Bollag, J.-M., Mertz, T., &Otjen, L. (1994). Role of Microorganisms in Soil Bioremediation. ACS Symposium Series, 2–10.
Boon, E., Meehan, C. J., Whidden, C., Wong, D. H. J., Langille, M. G., &Beiko, R. G. (2014). Interactions in the microbiome: communities of organisms and communities of genes. FEMS microbiology reviews, 38(1), 90-118.

Bora, T., Ozaktan, H., Gore, E., & Aslan, E. (2004). Biological Control of Fusarium oxysporum f. sp. melonis by Wettable Powder Formulations of the two Strains of Pseudomonas putida. Journal of Phytopathology, 152(8-9), 471–475.

Braga, R. M., Dourado, M. N., & Araújo, W. L. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. Brazilian Jjournal of Microbiology, 47, 86-98.

BRASIL. Resolução – CNNPA, n. 12, de 1978. Normas técnicas especiais. [S.l.], p. 1-97, jul. 1978.

Bric, J. M., Bostock, R. M., & Silverstone, S. E. (1991).Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane.Applied and Environmental Microbiology, 57(2), 535–538

Brito, T. S. (2019) Métodos de inoculação de Azospirillum brasilense e sua influência na promoção de crescimento do milho. 75 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2019.

Bucher, C. A., & Reis, V. M. (2008). Biofertilizante Contendo Bactérias Diazotróficas. Documento No247, 17.

Bulgarelli, D., Garrido-Oter, R., Münch, P. C., Weiman, A., Dröge, J., Pan, Y., … Schulze-Lefert, P. (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. Cell Host and Microbe, 17(3), 392–403.

Bulgarelli, D., Rott, M., Schlaeppi, K., Ver Loren van Themaat, E., Ahmadinejad, N., Assenza, F., … Schulze-Lefert, P. (2012). Revealing structure and assembly cues for Arabidopsis root-inhabiting bacterial microbiota. Nature, 488(7409), 91–95.

Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. Annual Review of Plant Biology, 64(1), 807–838.

Bünemann, E. K., Bongiorno, G., Bai, Z., Creamer, R. E., De Deyn, G., de Goede, R., … Brussaard, L. (2018). Soil quality – A critical review. Soil Biology and Biochemistry, 120, 105–125.

Campos de, S. B., Beneduzi, A., Carvalho Fernandes de, G., &Passaglia, L. M. (2015). Genetic and Functional Characterization of Paenibacillusriograndensis: A Novel Plant Growth-Promoting Bacterium Isolated from Wheat. BiologicalNitrogenFixation, 941-948.

Cardoso, E.J.B.N.; Andreote, F.D. Microbiologia do solo. 2. ed. Piracicaba, São Paulo. 2016, 221p.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., &Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. Journal of microbiological methods, 69(2), 330-339.

Chang, C., Chen, W., Luo, S., Ma, L., Li, X., & Tian, C. (2018). Rhizosphere microbiota assemblage associated with wild and cultivated soybeans grown in three types of soil suspensions. Archives of Agronomy and Soil Science, 1–14.
Chauhan, H., Bagyaraj, D. J., Selvakumar, G., & Sundaram, S. P. (2015). Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. Applied Soil Ecology, 95, 38-53.

Chung, S., Kong, H., Buyer, J. S., Lakshman, D. K., Lydon, J., Kim, S. D., & Roberts, D. P. (2008). Isolation and partial characterization of Bacillus subtilis ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. Applied microbiology and biotechnology, 80(1), 115-123.

Date, R. A. (1974).Legume inoculant production. Proceed. Ind. Nat. Sci. Acad, 40, 667-686.

da Silveira, A. P. D., Freitas, S. S. (2007). Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: Instituto Agronômico, 2007. 312 p.

de Graaff, M.-A., Six, J., Jastrow, J.D., Schadt, C.W., and Wullschleger, S.D. (2013) Variation in root architecture among switchgrass cultivars impacts root decomposition rates. Soil Biol Biochem 58: 198–206.

del Carmen Orozco-Mosqueda, M., del Carmen Rocha-Granados, M., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms.Microbiological research, 208, 25-31.

Di Salvo, L. P., Ferrando, L., Fernández-Scavino, A., & García de Salamone, I. E. (2018). Microorganisms reveal what plants do not: wheat growth and rhizosphere microbial communities after Azospirillumbrasilense inoculation and nitrogen fertilization under field conditions. PlantandSoil, 424(1-2), 405–417.

Dias, M. F. (2015). Análise da comunidade microbiana em sistema de tratamento de biogás com elevadas concentrações de sulfeto. 86 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos hídricos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2015.

Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Ptacek, D., Vanderleyden, J., Dutto, P., ...&Brener, S. (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with Azospirillum. Functional Plant Biology, 28(9), 871-879.

Döbereiner, J., Baldani, V. L. D., &Baldani, J. I. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. EMBRAPA-SPI; Itaguaí: EMBRAPA-CNPAB, Brasília, DF. 1995.

Donn, S., Kirkegaard, J. A., Perera, G., Richardson, A. E.,& Watt, M. (2015). Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere. Environmental microbiology, 17(3), 610-621.

dos Santos, S. G., Chaves, V. A., da Silva Ribeiro, F., Alves, G. C., & Reis, V. M. (2019). Rooting and growth of pre-germinated sugarcane seedlings inoculated with diazotrophic bacteria. Applied Soil Ecology, 133, 12-23.

Egamberdiyeva, D., &Höflich, G. (2003). Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. SoilBiologyandBiochemistry, 35(7), 973–978.

EMBRAPA (2011). Soluções tecnológicas - Inoculante para gramíneas. Disponível em <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/2650/inoculante-para-gramineas>. Acesso em: 04/12/2019.

Fan, K., Cardona, C., Li, Y., Shi, Y., Xiang, X., Shen, C., ... & Chu, H. (2017). Rhizosphere-associated bacterial network structure and spatial distribution differ significantly from bulk soil in wheat crop fields. Soil Biology and Biochemistry, 113, 275-284.

FAO - FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.Food Outlook - Biannual report on global food markets.Disponívelem: http://www.fao.org/3/a-I5703E.pdf Acessoem: 18, agosto, 2019.

Farias, A. R., Dossa, A. A., Mingoti, R., Acosta, A. da S., Cunha, G. R. da, &Spadotto, C. A. (2017).Dinâmica espacial da cultura do trigo no Brasil no período de 1990 a 2014. Embrapa Gestão Territorial-Documentos (INFOTECA-E).

Fernandez, G., Pitelli, R. A., &Cadenazzi, M. (2009). CO2 evolution and enzymatic activites in herbicide-treated soil samples. Planta Daninha, 27(3), 601-608.

Fernández, M. E. R. C. È. (2008). Fertilizantes y contaminantes, un círculo vicioso. Universidad de Oregón, Revista Consumer, 2008.

Ferreira, C. M., Soares, H. M., & Soares, E. V. (2019). Promising bacterial genera for agricultural practices: an insight on plant growth-promoting properties and microbial safety aspects. Science of The Total Environment. 682, 779–799.

Ferreira, E. B.; Cavalcanti, P.P.; and Nogueira, D.A. (2018). ExpDes: Experimental Designs. R package version 1.2.0. https://CRAN.R-project.org/package=ExpDes

Finkel, O. M., Castrillo, G., Paredes, S. H., González, I. S., &Dangl, J. L. (2017).Understanding and exploiting plant beneficial microbes. Current opinion in plant biology, 38, 155-163.

Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., Guttman, D. S., Kotanen, P. M., & Johnson, M. T. (2018). Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(6), E1157-E1165.

Foo, J. L., Ling, H., Lee, Y. S., & Chang, M. W. (2017). Microbiome engineering: Current applications and its future. Biotechnology Journal, 12(3), 1–11.

Fox, J. E., Gulledge, J., Engelhaupt, E., Burow, M. E., & McLachlan, J. A. (2007). Pesticides reduce symbiotic efficiency of nitrogen-fixing rhizobia and host plants. ProceedingsoftheNationalAcademyofSciences, 104(24), 10282–10287.

Freitas, M. P.(2007) Flutuação populacional de Oligochaeta edáficos em hortas cultivadas em sistemas organico e convencional no município de Canoinhas-SC. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: Geomicrobiology and bioremediation. Microbiology, 156(3), 609–643.

García-Fraile, P., Menéndez, E., & Rivas, R. (2015).Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry.AIMS Bioengineering, 2015, 2(3): 183-205.

Goel, R., Suyal, D. C., Dash, B., &Soni, R. (2017). Soil Metagenomics: A Tool for Sustainable Agriculture. In Mining of Microbial Wealth and MetaGenomics (pp. 217-225).Springer, Singapore.

Grobelak, A., Kokot, P., Hutchison, D., Grosser, A., &Kacprzak, M. (2018).Plant growth-promoting rhizobacteria as an alternative to mineral fertilizers in assisted bioremediation-Sustainable land and waste management. Journal of environmental management, 227, 1-9.

Hammer, K., 1984. Das Domestikationssyndrom. Kulturpflanze 32: 11–34

Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., Clardy, J., & Goodman, R. M. (1998). Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chemistry & biology, 5(10), R245-R249.

Harlan, J. R. (1992). Crops and man (No. Ed. 2).American Society of Agronomy. Madison, WI (EUA)

Hiltner L (1904) ÜberneuereErfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der BodenbakteriologieunterbesondererBerücksichtigung der Gründüngung und Brache. Arb DLG 98:59–78

Hoffmann, G. G., &Dedeken, M. (1965).EineMethodezurcolorimetrischenBestimmung der β-Glucosidase-Aktivität in Böden. ZeitschriftfürPflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde, 108(3), 193-198.

Hu, L., Robert, C. A., Cadot, S., Zhang, X., Ye, M., Li, B., ...&Schlaeppi, K. (2018). Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. Nature communications, 9(1), 2738.

Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR (1998) Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity.Journal of bacteriology, 180(18), 4765-4774.

Hungria, M. (2011). Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja. Embrapa Soja-Documentos (INFOTECA-E).

Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., ...&Giglio, M. G. (2012).Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature, 486(7402), 207.

IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). Disponível em <https://ww2.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/> , Acesso em: 20/12/2018.

Jacoby, R., Peukert, M., Succurro, A., Koprivova, A., & Kopriva, S. (2017). The Role of Soil Microorganisms in Plant Mineral Nutrition—Current Knowledge and Future Directions. Frontiers in Plant Science, 8(September), 1–19.

Jansson, J. K., &Hofmockel, K. S. (2018).The soil microbiome — from metagenomics to metaphenomics. Current Opinion in Microbiology, 43, 162–168.

Kafrawi, B., Sengin, E. L., &Rosmana, A. (2014). Screening Of Free-Living Indole Acetic Acid Producing Rhixobaceria From Shallot Rhizosheres In The Island of Sulawesi. International Journal of Scentific and Technoly Research, 3, 118-121.

Kaminsky, L. M., Trexler, R. V., Malik, R. J., Hockett, K. L., & Bell, T. H. (2018). The Inherent Conflicts in Developing Soil Microbial Inoculants.Trends in Biotechnology, xx, 1–12.

Kashyap, B. K., Solanki, M. K., Pandey, A. K., Prabha, S., Kumar, P., & Kumari, B. (2019). Bacillus as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Promising Green Agriculture Technology. Plant Health Under Biotic Stress, 219–236.

Kavamura, V. N., Santos, S. N., da Silva, J. L., Parma, M. M., Ávila, L. A., Visconti, A., ...& de Melo, I. S. (2013).Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. Microbiological research, 168(4), 183-191.

Kiers ET, Hutton MG, Denison RF (2007) Human selection and the relaxation of legume defences against ineffective rhizobia. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 274(1629), 3119-3126.

Kim, M., & Chun, J. (2014).16S rRNA gene-based identification of bacteria and archaea using the EzTaxon server. In: Methods in Microbiology. Academic Press, 2014. p. 61-74.

Kloepper, J. W., &Schroth, M. N. (1981).Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. Phytopathology, 71(6), 642-644.

Kumar, P., Thakur, S., Dhingra, G. K., Singh, A., Pal, M. K., Harshvardhan, K., … Maheshwari, D. K. (2018). Inoculation of siderophore producing rhizobacteria and their consortium for growth enhancement of wheat plant. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 15, 264–269.

Laino, P., Limonta, M., Gerna, D., &Vaccino, P. (2015).Morpho-physiolological and qualitative traits of a bread wheat collection spanning a century of breeding in Italy. Biodiversity data journal, 3: e4760.

Lambais, M. R., Cury, J. D. C., Maluche-Baretta, C. R., &Büll, R. D. C. (2005). Diversidade microbiana nos solos: definindo novos paradigmas. Tópicos em ciência do solo, 4, 42-84.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Nucleid acid techniques in bacterial systematics. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New Yorkm NY, pp. 115-175.

Lederberg, J., & McCray, A. T. (2001). OmeSweetOmics--A Genealogical Treasury of Words. The Scientist, 15(7), 8-8.

Liu, X., Li, Q., Li, Y., Guan, G., & Chen, S. (2019). Paenibacillus strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. PeerJ, v. 7, p. e7445, 2019.

Ludwig, W. (2008). Reprint of “Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification"[Int. J. Food Microbiol., 120 (2007) 225–236]. International journal of food microbiology, 125(1), I-XII.

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., ...& Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. Electrophoresis, 19(4), 554-568.

Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annual review of microbiology, 63, 541-556.

Mahanty, T., Bhattacharjee, S., Goswami, M., Bhattacharyya, P., Das, B., Ghosh, A., &Tribedi, P. (2017). Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development. Environmental Science and Pollution Research, 24(4), 3315-3335.

Maheux, A. F., Huppé, V., Bissonnette, L., Boissinot, M., Rodrigue, L., Bérubé, È., &Bergeron, M. G. (2012). Comparative analysis of classical and molecular microbiology methods for the detection of Escherichia coli and Enterococcus spp. in well water. Journal of Environmental Monitoring, 14(11), 2983-2989.

Majeed, A., Abbasi, M. K., Hameed, S., Imran, A., & Rahim, N. (2015). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. Frontiers in microbiology, 6, 198.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2019). Balança Comercial do Agronegócio – OUTUBRO/2019.

McGarvey, K. M., Queitsch, K.,&Fields, S. (2012). Wide variation in antibiotic resistance proteins identified by functional metagenomic screening of a soil DNA library. Applied and environmental microbiology, AEM-06759.

Melnichuk, T., Egovtseva, A., Abdurashytov, S., Abdurashytova, E., Kameneva, I., Yakubovskaya, A., ...&Radchenko, L. (2019). BACTERIA AS A SOURCE OF STRAINS FOR BIOTECHNOLOGY OF THE RHIZOSPHERE. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, v. 8, n. 5, p. 1194, 2019.

Mendes, L. W., Raaijmakers, J. M., De Hollander, M., Mendes, R., & Tsai, S. M. (2018). Influence of resistance breeding in common bean on rhizosphere microbiome composition and function. ISME Journal, 12(1), 212–224.

Mendes, R., Garbeva, P., &Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. FEMS microbiology reviews, 37(5), 634-663.

Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., Van Der Voort, M., Schneider, J. H. M., … Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. Science, 332(6033), 1097–1100.

Meyer, R. S., Duval, A. E., & Jensen, H. R. (2012). Patterns and processes in crop domestication: An historical review and quantitative analysis of 203 global food crops. New Phytologist, 196(1), 29–48.

Miller, H. I., & Morandini, P. A. (2018). Plant Domestication, the Brave Old World of Genetic Modification. In: Advances in Botanical Research. Academic Press. p. 1-15. 2018.

Misra, S., Pandey, S., Dixit, V., Mishra, S. K., Khan, M. H., Agarwal, L., & Chauhan, P. S. (2017).Soil Microbiome for Enhanced Crop Productivity.In Mining of Microbial Wealth and MetaGenomics (pp. 227-247).Springer, Singapore.

Mori, C. Aspectos Econômicos da produção e utilização. In.: BORÉM, A.; SCHEEREN P. L. (Eds.) Trigo: do plantio à colheita. Viçosa: UFV, 2015.

Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., ...&Daniel, R. (2011).Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. PloS one, 6(2), e17000.

Naeem, M., Aslam, Z., Khaliq, A., Ahmed, J. N., Nawaz, A., & Hussain, M. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria reduce aphid population and enhance the productivity of bread wheat. Brazilian Journal of Microbiology, v. 49, p. 9-14, 2018.

Naili, F., Neifar, M., Elhidri, D., Cherif, H., Bejaoui, B., &Aroua, M. (2018).Optimization of the effect of PGPR–based biofertlizer on wheat growth and yield. BiomBiostat Int J, 7(3), 226-232.

Nassal, D., Spohn, M., Eltlbany, N., Jacquiod, S., Smalla, K., Marhan, S., &Kandeler, E. (2018). Effects of phosphorus-mobilizing bacteria on tomato growth and soil microbial activity. Plant and Soil, 427(1-2), 17-37.

Naureen, Z., Rehman, N. U., Hussain, H., Hussain, J., Gilani, S. A., Al Housni, S. K., ... &Harrasi, A. A. (2017). Exploring the potentials of Lysinibacillussphaericus ZA9 for plant growth promotion and biocontrol activities against phytopathogenic fungi. Frontiers in Microbiology, 8, 1477.

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 170(1), 265–270.

Neill, C., &Gignoux, J. (2006). Soil organic matter decomposition driven by microbial growth: A simple model for a complex network of interactions. SoilBiologyandBiochemistry, 38(4), 803–811.

Neiverth, Adeline. (2011). Desempenho de genótipos de trigo associados com Herbaspirillumseropedicae em relação à fixação biológica de nitrogênio e promoção do crescimento vegetal. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2011.

Neiverth, A., Delai, S., Garcia, D. M., Saatkamp, K., de Souza, E. M., de Oliveira Pedrosa, F., ...& da Costa, A. C. T. (2014). Performance of different wheat genotypes inoculated with the plant growth promoting bacterium Herbaspirillumseropedicae. European journal of soil biology, 64, 1-5.

Ofaim, S., Ofek-Lalzar, M., Sela, N., Jinag, J., Kashi, Y., Minz, D., &Freilich, S. (2017). Analysis of microbial functions in the rhizosphere using a metabolic-network based framework for metagenomics interpretation. Frontiers in Microbiology, 8(AUG), 1–14.

Okon, Y., &Kapulnik, Y. (1986). Development and function ofAzospirillum-inoculated roots. Plant and Soil, 90(1-3), 3–16.

Ottman, N., Smidt, H., De Vos, W. M., &Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: who is out there and what do they do?. Frontiers in cellular and infection microbiology, 2, 104

Palheta, J. S. D. O. (2017). Análise de sequências de DNA metagenômico de solos da Floresta Atlântica paranaense: implicações ecológicas e biotecnológicas. 73 f. Dissertação (Mestrado Bioinformática) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2017.

Paul, E. A. (2014). Soil microbiology, ecology and biochemistry. Academic press.

Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., ... & Ley, R. E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 110(16), 6548-6553.

Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., Bosse, M., Ferrão, L. F., de Hollander, M., Garcia, A. A., ...&Raaijmakers, J. M. (2017). Linking rhizosphere microbiome composition of wild and domesticated Phaseolus vulgaris to genotypic and root phenotypic traits. The ISME journal, 11(10), 2244.

Pérez-Jaramillo, J. E., Carrión, V. J., de Hollander, M., &Raaijmakers, J. M. (2018).The wild side of plant microbiomes. Microbiome, 6(1), 4–9

Pérez-Jaramillo, J. E., Mendes, R., &Raaijmakers, J. M. (2016).Impact of plant domestication on rhizosphere microbiome assembly and functions. Plant molecular biology, 90(6), 635-644.

Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J. A., ...& Baker, C. C. (2009). The NIH human microbiome project. Genomeresearch, 19(12), 2317-2323.

Pinto, A.R.C. Trigo-alimentação e tecnologia. In.: OLIVEIRA NETO, A. A., & SANTOS, C. (2017). A cultura do Trigo. Brasília-DF: CONAB.

PIRES, João Leonardo Fernandes. A importância do trigo para a sustentabilidade da agricultura brasileira. 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/ /noticia/23416523/artigo---a-importancia-do-trigo-para-a-sustentabilidade-da-agricultura-brasileira>. Acessoem: 05/10/ 2019.

Piromyou, P., Buranabanyat, B., Tantasawat, P., Tittabutr, P., Boonkerd, N., &Teaumroong, N. (2011). Effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on microbial community structure in rhizosphere of forage corn cultivated in Thailand. European Journal of Soil Biology, 47(1), 44-54.

Praeg, N., Pauli, H., &Illmer, P. (2019).Microbial diversity in bulk and rhizosphere soil of Ranunculus glacialis along a high-alpine altitudinal gradient. Frontiers in microbiology, 10, 1429.

Quecine, M. C. (2010). Aspectos biotecnológicos da interação entre bactérias e cana-de-açúcar (Saccharum sp., L.). 196 f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo, Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba. 2010.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.URL https://www.R-project.org/.

Ramesh, A., Sharma, S. K., Sharma, M. P., Yadav, N., & Joshi, O. P. (2014). Plant growth-promoting traits in Enterobacter cloacae subsp. dissolvens MDSR9 isolated from soybean rhizosphere and its impact on growth and nutrition of soybean and wheat upon inoculation. Agricultural Research, 3(1), 53-66.

Rana, A., Saharan, B., Nain, L., Prasanna, R., &Shivay, Y. S. (2012).Enhancing micronutrient uptake and yield of wheat through bacterial PGPR consortia. Soil Science and Plant Nutrition, 58(5), 573-582.

Rengel, Z., Gutteridge, R., Hirsch, P., & Hornby, D. (1996). Plant genotype, micronutrient fertilization and take-all infection influence bacterial populations in the rhizosphere of wheat. Plant and Soil, 183(2), 269–277. doi

Rojas-Solís, D., Hernández-Pacheco, C. E., & Santoyo, G. (2016).Evaluation of Bacillus and Pseudomonas to colonize the rhizosphere and their effect on growth promotion in tomato (Physalis ixocarpaBrot. ex Horm.). RevistaChapingo Serie Horticultura, 22(1).

Römbke, J., Bernard, J., & Martin-Laurent, F. (2018). Standard methods for the assessment of structural and functional diversity of soil organisms: A review. Integrated Environmental Assessmentand Management, 14(4), 463–479.

Sala, V. M. R., Cardoso, E. J. B. N., de Freitas, J. G., & da Silveira, A. P. D. (2007). Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 42(6), 833-842.

Santi, A. L. (2007). Relações entre indicadores de qualidade do solo e a produtividade das culturas em áreas com agricultura de precisão. 150p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2007.

Santos, C.M.R. Sementes de trigo . In.: OLIVEIRA NETO, A. A., & SANTOS, C. (2017). A cultura do Trigo. Brasília-DF: CONAB.

Santos, W. F., Oliveira, M. S. De, Cristina, L., Leói, T., Alisson, M., & Cunha, A. (2013). Sequenciamento De Dna : Métodos E Aplicações, 139–141.

Santoyo, G., Pacheco, C. H., Salmerón, J. H., & León, R. H. (2017). The role of abiotic factors modulating the plant-microbe-soil interactions: toward sustainable agriculture. A review. Spanish journal of agricultural research, 15(1), 13.

Saubidet, M. I., Fatta, N., &Barneix, A. J. (2002). Plant and Soil, 245(2), 215–222.

Savci, S. (2012).Investigation of Effect of Chemical Fertilizers on Environment.APCBEE Procedia, 1(January), 287–292.

SCHEEREN, P. L.; CASTRO, R. L.; CAIERÃO, E. Botânica, Morfologia e Descrição Fenotípica. In.: BORÉM, A.; SCHEEREN, P. L. (Eds.) Trigo: do plantio à colheita. Viçosa: UFV, 2015. p. 36-55.

Schloter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S. J., & van Elsas, J. D. (2018).Microbial indicators for soil quality. Biology and Fertility of Soils, 54(1), 1-10.

Schulz-Bohm, K., Gerards, S., Hundscheid, M., Melenhorst, J., Boer, W., &Garbeva, P. (2018).Calling from distance: Attraction of soil bacteria by plant root volatiles. The ISME journal, 12(5), 1252.

Scott, A. J., & Knott, M. (1974). A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. Biometrics, 507-512.

Silveira, E. (2004). Identificação de comunidades bacterianas de solo Por sequenciamento do gene 16S rRNA. 62 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)–Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2004.

Singh, J. S., Pandey, V. C., & Singh, D. P. (2011). Efficient soil microorganisms: a new dimension for sustainable agriculture and environmental development. Agriculture, ecosystems & environment, 140(3-4), 339-353.

Smýkal, P., Nelson, M., Berger, J., & von Wettberg, E. (2018).The Impact of Genetic Changes during Crop Domestication.Agronomy, 8(7), 119.

Souza, R., Ambrosini, A., &Passaglia, L. M. P. (2015).Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genetics and Molecular Biology, 38(4), 401–419.

Sundaramoorthy, S., Raguchander, T., Ragupathi, N., &Samiyappan, R. (2012). Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of Capsicum annum L. caused by Fusarium solani. Biological Control, 60(1), 59-67.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular biology and evolution, 28(10), 2731-2739.

Tang, J., Zhang, J., Ren, L., Zhou, Y., Gao, J., Luo, L., … Chen, A. (2019). Diagnosis of soil contamination using microbiological indices: A review on heavy metal pollution. Journal of Environmental Management, 242, 121–130.

Torsvik, V., Goksøyr, J., &Daae, F. L. (1990).High diversity in DNA of soil bacteria. Applied and environmental microbiology, 56(3), 782-787.

Toumatia, O., Compant, S., Yekkour, A., Goudjal, Y., Sabaou, N., Mathieu, F., ...&Zitouni, A. (2016). Biocontrol and plant growth promoting properties of Streptomyces mutabilis strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. South African Journal of Botany, 105, 234-239.

Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013).The plant microbiome. Genome biology, 14(6), 209.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA.Disponívelem: <www.soils.usda.gov/technical/handbook/contents/part630.html>.Acesso em 20/12/2019)

Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant and soil, 255(2), 571-586.

Větrovský, T., &Baldrian, P. (2013).The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses.PLoS ONE, 8(2), 1–10.

Vezzani, F. M., &Mielniczuk, J. (2009). Uma visão sobre qualidade do solo. Revista Brasileira de Ciência do Solo, 33(4), 743-755.

Waldor, M. K., Tyson, G., Borenstein, E., Ochman, H., Moeller, A., Finlay, B. B., ...& Smith, H. (2015). Where next for microbiome research?. PLoS Biology, 13(1), e1002050.

Wallenstein, M. D. (2017). Managing and manipulating the rhizosphere microbiome for plant health: a systems approach. Rhizosphere, 3, 230-232.

Wang, X., & Tang, C. (2017).The role of rhizosphere pH in regulating the rhizosphere priming effect and implications for the availability of soil-derived nitrogen to plants. Annals of botany, 121(1), 143-151.

Weese, D.J., Heath, K.D., Dentinger, B.T., Lau, J.A. (2015) Long-term nitrogen addition causes the evolution of less-cooperative mutualists. Evolution 69(3):631–642

Weinmann, M. (2017).Bio-effectors for improved growth, nutrient acquisition and disease resistance of crops.607 p. Tese (DoutoradoemCiênciasAgrícolas). Universität Hohenheim. Stuttgart-Hohenheim.2017.

Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere.Journal of Experimental Botany, 52(suppl_1), 487–511.

Wickham, H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.

Wissuwa, M., Mazzola, M., & Picard, C. (2009). Novel approaches in plant breeding for rhizosphere-related traits. Plant and Soil, 321(1-2), 409.

Woese, C. R., & Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(11), 5088-5090.

Xu, X., Robinson, J., Jeger, M., & Jeffries, P. (2010).Using combinations of biocontrol agents to control Botrytis cinerea on strawberry leaves under fluctuating temperatures. Biocontrol Science and Technology, 20(4), 359-373.

Yuan, Z., Druzhinina, I. S., Labbé, J., Redman, R., Qin, Y., Rodriguez, R., ...& Lin, F. (2016). Specialized microbiome of a halophyte and its role in helping non-host plants to withstand salinity. Scientific reports, 6, 32467.

Zadoks, J. C., Chang, T. T., &Konzak, C. F. (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. Weed research, 14(6), 415-421.

Zhalnina, K., Louie, K. B., Hao, Z., Mansoori, N., da Rocha, U. N., Shi, S., … Brodie, E. L. (2018). Dynamic root exudate chemistry and microbial substrate preferences drive patterns in rhizosphere microbial community assembly. NatureMicrobiology, 1–11.

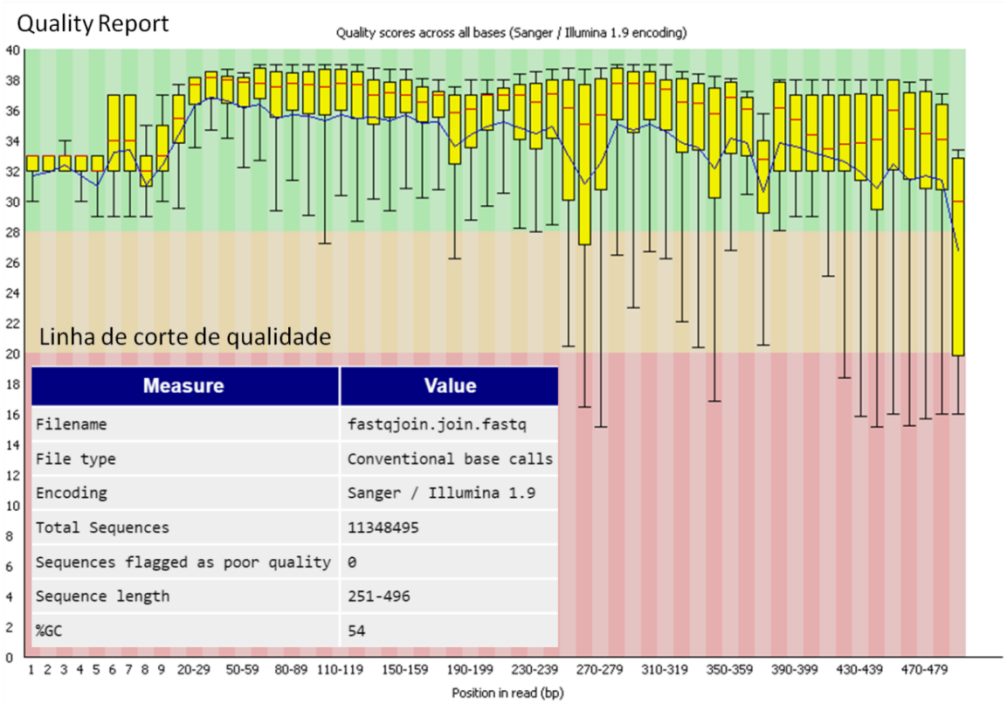
Zilli, J. É., Rumjanek, N. G., Xavier, G. R., da Costa Coutinho, H. L., & Neves, M. C. P. (2003). Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. Cadernos de Ciência & Tecnologia, 20(3), 391-411.

ANEXOS

ANEXO A

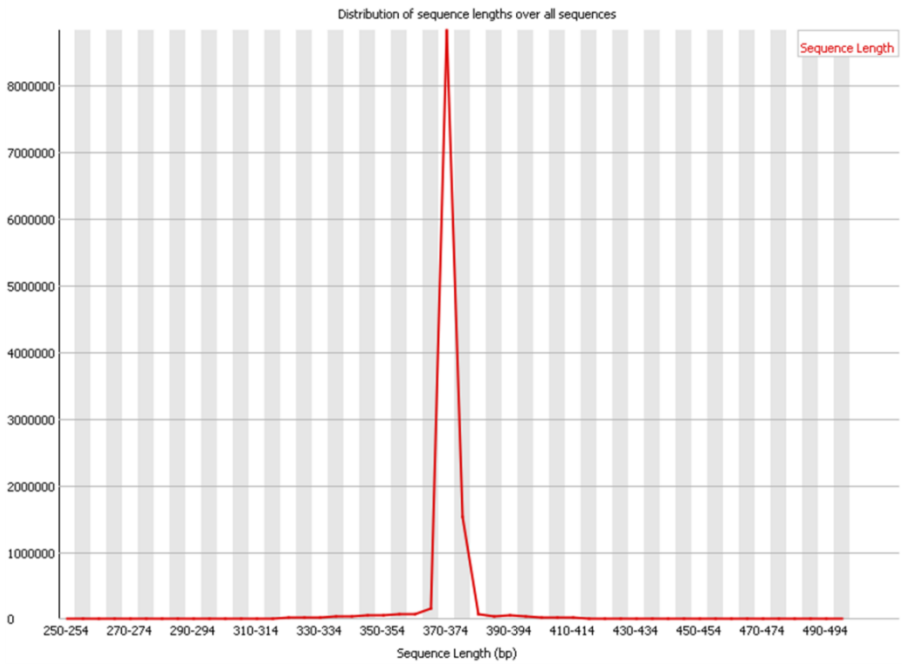
(a) Índice de qualidade e (b) comprimento médio das sequências resultantes do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA geradas através da plataforma Illumina.

a)



Measure	Value
Filename	fastqjoin.join.fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	11348495
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	251-496
%GC	54

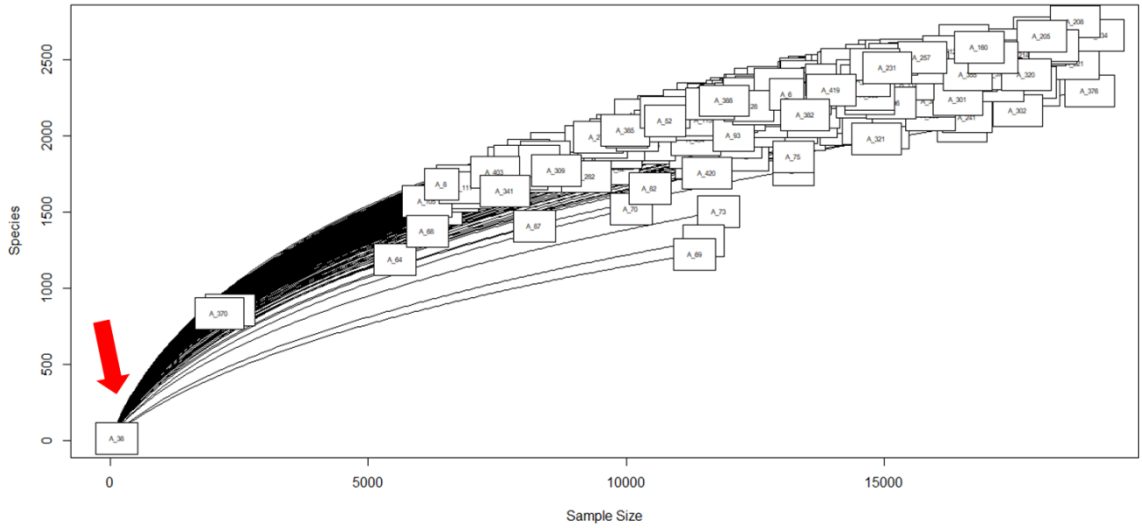
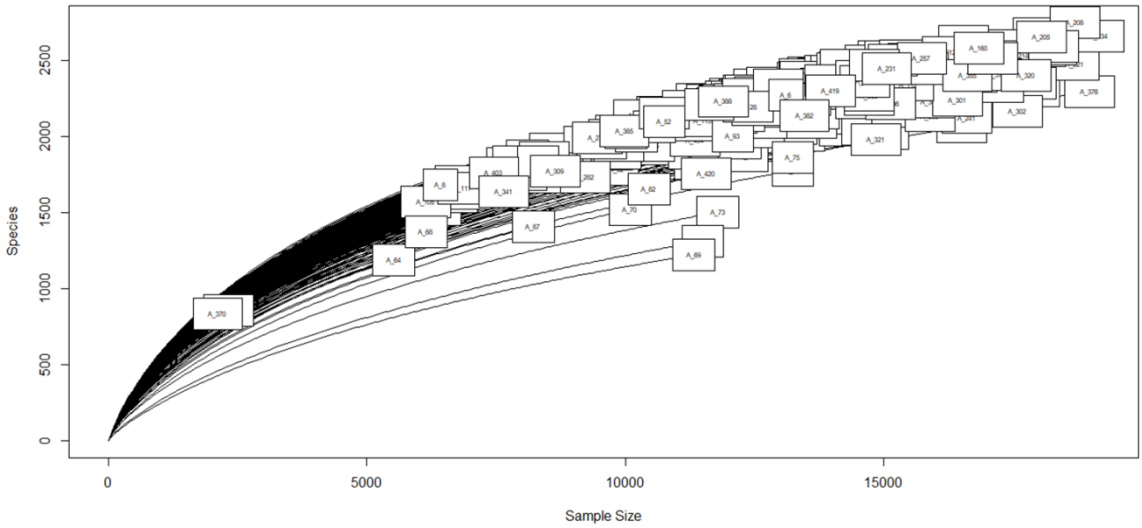
b)



ANEXO B

Curvas de rarefação (a) antes da remoção da amostra T8R3 (indicada pela seta vermelha) (4320 taxa) e (b) após a remoção da amostra T8R3 (9775 taxa).

a)



b)