

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

**Efeito da inoculação de bactérias no microbioma da rizosfera
de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e na promoção de
crescimento**

Izadora de Cássia Mesquita da Cunha

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

**Piracicaba
2023**

**Izadora de Cássia Mesquita da Cunha
Engenheira Agrônoma**

**Efeito da inoculação de bactérias no microbioma da rizosfera de feijão comum
(*Phaseolus vulgaris* L.) e na promoção de crescimento**

Orientador:
Prof. Dr. **LUCAS WILLIAM MENDES**

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

**Piracicaba
2023**

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

Cunha, Izadora de Cássia Mesquita da

Efeito da inoculação de bactérias no microbioma da rizosfera de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e na promoção de crescimento / Izadora de Cássia Mesquita da Cunha. - - Piracicaba, 2023.

100 p.

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

1. Sequenciamento de amplicon 2. Promoção de crescimento em plantas 3. Ecologia microbiana 4. Estrutura da comunidade I. Título

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha mãe Francisca Zilmar de Mesquita Ribeiro, e aos meus pais Izidro Ferreira da Cunha – *in memoriam* e José de Souza Ribeiro – *in memoriam*, e à minha irmã Rita Cunha.

Izadora Cunha

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela sua infinita bondade e misericórdia, por toda capacitação, força, coragem e ânimo durante toda essa caminhada. A Ele toda honra, glória e louvor.

Aos meus pais, Francisca Zilmar pelo amor, apoio e por não medir esforços para que eu pudesse ter a oportunidade de estudar e Izidro F. da Cunha – *in memoriam*, pelo exemplo honestidade e determinação e ao meu padrasto José de S. Ribeiro “Tio José” – *in memoriam*, por todo apoio, carinho e respeito, e esperança de dias melhores. À minha querida irmã, Rita Cunha, por sua lealdade e cumplicidade, ao meu namorado por todo apoio, companheirismo e provisão nos momentos mais tensos.

Ao meu orientador professor Dr. Lucas W. Mendes, por toda orientação e pela grande oportunidade e confiança dada a mim. À professora Dra. Tsai Siu Mui, por me permitir trabalhar em seu laboratório, pelas oportunidades e por todo apoio nos momentos que precisei.

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular (conhecido como Lab da TSAI) e aos técnicos Wagner (Wagnão), Fábio Duarte e Andréia, que nunca mediram esforços em nos auxiliar em nossas atividades dentro e fora do laboratório.

Aos amigos Luís Felipe, Solange (Sol) e Ana Vitória que desde o início me ajudaram muito em minhas atividades, e pela paciência em ensinar, pela cumplicidade, apoio, palavras de ânimo, conselhos e risadas. Aos colegas Eduardo, Anderson, Gabriel, Guilherme, Jéssica, Gustavo e Júlia que sempre me deram uma palavra de apoio e ajuda nessa jornada.

Ao colega Dr. Thierry Pellegrinetti, pela ajuda na interpretação dos dados e por seu olhar crítico sobre o meu trabalho, me permitindo amadurecer cientificamente. Aos estagiários Letícia, Victor Lara, Vitor, Teresa, Gabriel Valverde e Gabriele, por toda ajuda em nossas atividades.

À CAPES (88887.636994/2021-00), pela bolsa concedida que permitiu a conclusão deste mestrado e ao CNPq (408191/2018-0), pelo pagamento do sequenciamento das minhas amostras. Ao IAC (Instituto Agrônômico de Campinas), pelas sementes que foram fornecidas para minha pesquisa. E ao meu Programa de Microbiologia Agrícola (ESALQ/USP), pela oportunidade de realização do curso.

EPÍGRAFE

“Em condições favoráveis, venceremos.

Em situações desfavoráveis, também venceremos.

E, mesmo em condições muito desfavoráveis,

Ainda estaremos no páreo. ”

Airton Senna

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. HIPÓTESE E OBJETIVO	13
2.1. Hipótese	13
2.2. Objetivo	13
3. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA	15
3.1. Interação planta-micro-organismo	15
3.2. Rizosfera	16
3.3. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas	20
3.4. Efeitos da inoculação de bactérias no microbioma da rizosfera	23
3.5. Planta modelo: feijão comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	24
3.6. Ferramentas para estudo de comunidades microbianas na rizosfera	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Coleta e análise do solo	29
4.2. Origem das cepas bacterianas	30
4.3. Preparo do inoculante	34
4.4. Plantio	34
4.5. Coleta do experimento	36
4.6. Expressão gênica da planta	37
4.7. Análise enzimática do solo	39
4.8. Micorrizas	39
4.9. Análises moleculares do microbioma rizosférico	40
4.10. Análise estatística expressão gênica (qPCR)	41
4.11. Análise das sequencias de amplicon	41
4.12. Análises estatística	41
5. RESULTADOS	43
5.1. Curva de crescimento bacteriano	43
5.2. Teste de antagonismo	44
5.1. Variáveis de planta	44
5.2. Variáveis de solo	46

5.3. Micorrização em raízes.....	49
5.4. Expressão gênica de folhas.....	50
5.5. Análise de microbioma.....	51
6. DISCUSSÃO	69
6.1. Variáveis de planta	69
6.2. Variáveis de solo: química do solo e atividade enzimática	72
6.3. O efeito da inoculação na comunidade de bactérias	73
6.4. O efeito da inoculação na comunidade de fungos	76
6.5. Interações ecológicas de fungos e bactérias e o efeito nas plantas	77
7. CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	81
ANEXOS	95

RESUMO

Efeito da inoculação de bactérias no microbioma da rizosfera de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e na promoção de crescimento

Os atuais avanços agrícolas têm focado em metodologias mais sustentáveis, como a redução do uso de nutrientes minerais e pesticidas, além do desenvolvimento de cultivares e sistemas de cultivo mais produtivos e com baixos custos ambientais. Nesse contexto, os micro-organismos em associação com plantas têm se tornado foco de recentes estudos. O microbioma da rizosfera é fundamental para o funcionamento das plantas, influenciando sua fisiologia e desenvolvimento. Embora sua importância seja amplamente conhecida, ainda não há informações suficientes para a maioria dos micro-organismos da rizosfera. Conhecer os micro-organismos presentes na rizosfera e as funções que desempenham é essencial para a melhor promoção do crescimento e saúde das plantas. Neste contexto, este projeto busca avaliar o efeito da inoculação de bactérias no crescimento de plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e seu impacto na comunidade microbiana da rizosfera. Para tanto, dez estirpes bacterianas isoladas previamente de plantas de feijão foram testadas como inoculantes e as que apresentaram melhores respostas no crescimento da planta foram avaliadas quanto ao seu efeito na comunidade da rizosfera. A avaliação da comunidade da rizosfera foi realizada por meio do sequenciamento dos genes 16S rRNA para bactérias e ITS para fungos, correlacionando assim com os padrões de crescimento da planta. Os resultados obtidos irão contribuir significativamente para o entendimento das interações planta-micro-organismos, buscando identificar grupos microbianos e funções com potencial uso biotecnológico. Considerando a importância dos micro-organismos de solo nos ciclos biogeoquímicos, como também na promoção de saúde e crescimento de plantas, a abordagem de um estudo focado na ecologia microbiana é urgentemente necessária para o desenvolvimento de novos métodos que auxiliem a produtividade agrícola.

Palavras-chave: Sequenciamento amplicon, Promoção de crescimento em plantas, Ecologia microbiana

ABSTRACT

Effect of bacteria inoculation on the rhizosphere microbiome of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and growth promotion

The current agricultural advancements have focused on more sustainable methodologies, such as reducing the use of mineral nutrients and pesticides, as well as developing more productive cultivars and cultivation systems with low environmental costs. In this context, microorganisms in association with plants have become the focus of recent studies. The rhizosphere microbiome is essential for plant functioning, influencing its physiology and development. Although its importance is widely known, there is still not enough information about most rhizosphere microorganisms. Understanding the microorganisms present in the rhizosphere and the functions they perform is essential for promoting plant growth and health. In this context, this project aims to evaluate the effect of bacterial inoculation on the growth of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) and its impact on the rhizosphere microbial community. For this purpose, ten bacterial strains previously isolated from bean plants were tested as inoculants, and those that showed the best plant growth responses were evaluated for their effect on the rhizosphere community. The evaluation of the rhizosphere community was performed by sequencing the 16S rRNA gene for bacteria and ITS for fungi, correlating them with plant growth patterns. The results obtained will significantly contribute to understanding plant-microorganism interactions, seeking to identify microbial groups and functions with potential biotechnological use. Considering the importance of soil microorganisms in biogeochemical cycles, as well as in promoting plant health and growth, an approach focused on microbial ecology is urgently needed for the development of new methods that assist agricultural productivity.

Keywords: Amplicon sequencing, Plant growth promotion, Microbial ecology

1. INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma importante leguminosa em escala global, encontrada em terras altas tropicais em todo o mundo. O Brasil é considerado um dos principais produtores, com uma safra de 2,9 milhões de toneladas em 2021/2022 (CONAB, 2023). O feijão é uma importante fonte de proteínas, carboidratos, vitaminas e micronutrientes para países desenvolvidos e em desenvolvimento.

As bactérias benéficas para plantas, conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP), desempenham um papel crucial no crescimento e desenvolvimento do hospedeiro. As RPCPs atuam na rizosfera das plantas facilitando seu crescimento por meio de múltiplos mecanismos, incluindo o aumento da disponibilidade de nutrientes, modulação de fitormônios e agentes de biocontroles de fitopatógenos, e ainda auxiliando na tolerância ao estresse e prevenção de doenças (KONG; LIU, 2022).

O cultivo do feijão pode ser realizado em diferentes níveis tecnológicos, mas para obter maiores produções é necessária uma considerável quantidade de insumos devido à exigência da planta em fertilidade do solo, disponibilidade hídrica e controle fitossanitário (SILVA; ROMAM, 2021). A utilização de micro-organismos benéficos na agricultura pode ajudar a aumentar a produtividade e obter economias na adubação (MULLER, 2013).

A comunidade microbiana do solo é complexa e dinâmica, variando em composição entre diferentes compartimentos e níveis. Isso representa um desafio na ecologia do solo, já que a sobrevivência, abundância e persistência do inoculante no solo ou nas raízes das plantas podem potencialmente levar à sua evasão. Além disso, os inoculantes podem interferir na saúde do solo e na composição da comunidade microbiana e faunística (KONG; LIU, 2022).

Considerando que as plantas dependem em parte do seu microbioma para promoção de saúde e crescimento, e que a introdução de um inoculante pode afetar a comunidade microbiana associada à planta, o uso de inoculantes é capaz de modular a comunidade microbiana associada às plantas do feijão comum. A adição do inoculante pode estimular o crescimento das plantas, aumentando a complexidade das interações microbianas da comunidade rizosférica.

2. HIPÓTESE E OBJETIVO

2.1. Hipótese

Neste trabalho, hipotetizamos que a aplicação de inoculantes altera a composição do microbioma da rizosfera, gerando impactos positivos ou negativos na comunidade, com consequências para a saúde e crescimento das plantas. Assim, os efeitos observados na planta podem ser diretos (ocasionados pelo organismo inoculado) ou indiretos (pela modulação do microbioma).

2.2. Objetivo

Avaliar o efeito da inoculação de bactérias na promoção do crescimento de plantas de feijão e sua influência na comunidade microbiana da rizosfera.

2.2.1. Objetivos específicos:

- I. Avaliar o efeito da inoculação de bactérias na promoção de crescimento de plantas de feijão;
- II. Investigar o impacto da inoculação de bactérias na comunidade microbiana da rizosfera por meio do sequenciamento do gene 16S rRNA e ITS rRNA;
- III. Identificar potenciais grupos microbianos da comunidade da rizosfera e relacioná-los à promoção de crescimento da planta.

3. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

3.1. Interação planta-micro-organismo

Durante seu ciclo de vida, as plantas estabelecem relações com os organismos no ambiente em que vivem, o que é fundamental para sua sobrevivência em um ecossistema altamente variável e competitivo (CARDOSO *et al.*, 1992; STURZ; CHRISTIE, 2003; IMAN, 2016). Essas interações podem ocorrer em três formas distintas na planta: nas partes aéreas como frutos, folhas e flores (filosfera), nos tecidos internos (endosfera) e na raiz (rizosfera) (PÉREZ-MONTAÑO *et al.* 2014).

A planta e seu microbioma são co-dependentes, e juntos formam um metaorganismo holobionte, contribuindo significativamente para o genoma secundário da planta. Essas interações ecológicas podem ser negativas ou positivas e envolvem comunidades de micro-organismos de vida livre na matriz do solo rizosférico ou micro-organismos simbióticos, mutualistas ou patogênicos associados na superfície ou internamente aos tecidos da raiz (SALAMONE, 2022).

Nas interações benéficas, os micro-organismos promovem o estabelecimento e a defesa da planta no ambiente, imobilizando e disponibilizando nutrientes, mineralizando compostos orgânicos, produzindo fitormônios, inibindo patógenos e atuando como antagonistas. Por outro lado, nas interações negativas os micro-organismos fitopatogênicos podem causar danos e perdas econômicas causadas por diferentes estratégias de ação e ataque e preferências por determinados tecidos-alvo (FERREIRA, 2016; SANTOYO *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2022).

A planta pode ser beneficiada de diversas formas pela ação dos micro-organismos do solo, tais efeitos como a decomposição do material orgânico, imobilização e disponibilidade de nutrientes às plantas, mineralização de compostos orgânicos, produção de fitormônios, inibição de patógenos e antagonistas (FERREIRA, 2016). Essas interações benéficas têm atraído considerável interesse de pesquisas, pois podem levar a um melhor crescimento, desenvolvimento, saúde, sobrevivência e produtividade agrícola (COMPANT *et al.* 2019).

3.2. Rizosfera

A rizosfera é a região do solo que é fortemente influenciada pelas raízes e possui uma alta atividade microbiana (HILTNER, 1904). Essa região entre solo e raiz é caracterizada por possuir propriedades químicas, físicas e biológicas únicas, sendo altamente influenciada pela liberação de exsudatos radiculares. Essa zona é um ambiente onde ocorrem muitas interações entre plantas e micro-organismos, o que a torna distinta de outras regiões do solo (BHATTACHARYA; JHA, 2012).

A planta transfere o carbono para o sistema radicular na forma de carboidratos, aminoácidos e outros metabólitos secundários. Esses, por sua vez, atuam como substratos de carbono e nitrogênio, auxiliando no crescimento do sistema radicular e modulando as interações com os micro-organismos (HARTMANN *et al.*, 2008; HINSINGER *et al.*, 2016). Cerca de 20% do carbono fixado pelas plantas é disponibilizado para a rizosfera, destacando a importância da manutenção dessa comunidade microbiana pela planta (MARSCHNER, 1995; GRAY; SMITH, 2005).

O solo da região radicular regula o crescimento vegetal, que é um ambiente modulado pela própria planta. Ele pode ser construído através da liberação de ácidos orgânicos, pela porosidade do solo, pelos efeitos alelopáticos, pela quimiotaxia e/ou pela liberação de compostos orgânicos voláteis, que atuam na defesa e sinalização da comunicação da planta com o sistema solo (DICKE; BALDWIN, 2010; PAUSCH; KUZYAKOV, 2018).

A exsudação de flavonoides é um exemplo de modulação exercida pela planta na rizosfera. Eles são importantes para o desenvolvimento das plantas, pois possuem diversas atividades biológicas e uma de suas funções-chave na rizosfera é a regulação das interações da raiz com os micro-organismos. Além de inibir patógenos de raízes, eles estimulam a esporulação de micorrizas, agem na proteção contra o estresse oxidativo, e estimulam ou inibem a expressão de genes de simbiose (STEINKELLNER, 2007; HARTMANN; ZEIER, 2018).

Um ambiente com pH, umidade, temperatura e nutrientes ideais seleciona e favorece a atividade microbiana associada. Essas atividades, por sua vez, desempenham diversas funções no solo, atuando nos processos de nutrição, trocas gasosas (O_2 e CO_2), mineralização, amonificação, nitrificação e simbiose no sistema planta-solo (MELO, 2006).

O efeito rizosférico difere de acordo com a espécie vegetal, genótipos e seu estágio de desenvolvimento, bem como as propriedades físicas e químicas do solo (ARAUJO *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2020; MOROENYANE *et al.*, 2021). Essas características geram variações na composição de seus exsudatos e influenciam diretamente o comportamento da comunidade microbiana na rizosfera, recrutando principalmente micro-organismos benéficos (BERG; SMALLA, 2009; CANARINI *et al.*, 2019; WILLIAMS *et al.*, 2022).

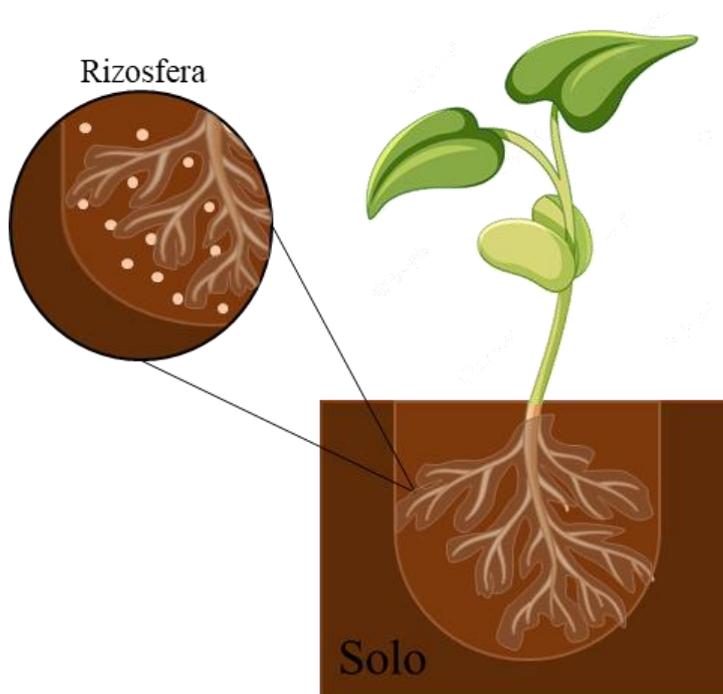


Figura 1. Dinâmica de interação solo – rizosfera – planta (feijoeiro).

Fonte: Adaptado (GMics, 2020).

Na rizosfera ocorre o enriquecimento das funções microbianas de maior interesse, como a supressão de patógenos e antagonismo, decomposição da matéria orgânica, promoção de crescimento e biodegradação de xenobióticos. Essas funções oferecem proteção à planta contra estresses bióticos e abióticos (BOTTON; FREDRIKSON; ELLIOT, 1992; WALKER *et al.*, 2003), sendo que a resistência das plantas para a patogênese é dependente da composição do microbioma da sua rizosfera (HARTMANN *et al.*, 2008).

A rizosfera compõe um habitat propício para micro-organismos multifuncionais, devido a ampla gama de compostos disponíveis para o seu

metabolismo e crescimento (ROUT, 2014). Esta região do solo é considerada um hotspot para interações solo-micro-organismo-planta, possibilitando o manejo do microbioma da rizosfera para aumentar o rendimento das culturas e reduzir o uso de insumos agrícolas, como pesticidas e fertilizantes químicos (KAVAMURA *et al.*, 2021). Por esse motivo, os processos que ocorrem no microbioma da rizosfera são cruciais para o crescimento, desenvolvimento e sanidade das plantas, bem como para a imobilização, mineralização e ciclagem de nutrientes no solo, com consequências diretas no ecossistema e na agricultura (BROECKLING *et al.* 2008; DAZZO; GANTER, 2009; RIBEIRO; CARDOSO, 2012).

3.2.1. Microbioma da rizosfera

O microbioma da rizosfera é composto por uma variedade de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos, vírus e protozoários, que interagem entre si e com as raízes. A composição e a dinâmica do microbioma são influenciados por diversos fatores, como espécies de plantas, alocação de carbono, propriedades físicas e químicas do solo, e diversidade da população microbiana. Um intenso fator de diferenciação da comunidade microbiana apta a colonizar esse ambiente é a exsudação (PUGLISI *et al.*, 2009; LUNDBERG *et al.*, 2012; PHILIPPOT *et al.*, 2013).

O microbioma desempenha várias funções importantes para as plantas, tais como nutrição, proteção contra patógenos, tolerância a estresses e promoção de crescimento (RYAN *et al.*, 2008; LUGTENBERG; KAMILOVA, 2009; BERENDSEN; PIETERSE; BAKKER, 2012). Algumas espécies bacterianas e fúngicas produzem metabólitos secundários de importância biológica e ecológica para a dinâmica da rizosfera-planta. Esses micro-organismos são capazes de produzir metabólitos que mimetizam hormônios vegetais, como auxina e giberelinas, afetando diretamente o crescimento das plantas (STEINKELLNER *et al.*, 2007).

A interação dos micro-organismos com as plantas na rizosfera pode ocorrer de diversas formas, como através de micro-organismos endofíticos encontrados nas sementes, de vida livre na matriz do solo rizosférico, associados à superfície da raiz da planta e pelos que se encontram dentro dos tecidos rizosférico (PHILIPPOT *et al.*, 2013; SANTOYO *et al.*, 2016).

Essas interações formam uma complexa rede de relações ecológicas, incluindo interações patogênicas, competição por nutrientes, comensalismo, efeitos

alelopáticos, influência do ambiente e interações mutualísticas (MENDES; GARBEVA; RAAIJMAKERS, 2013). Algumas bactérias e fungos presentes na rizosfera estabelecem relações mutualísticas benéficas com as plantas, e a manipulação desse microbioma tem potencial para aumentar o rendimento das culturas e reduzir a dependência de insumos químicos (BROECKLING *et al.*, 2008; LI; LIANG; CHEN, 2017).

3.2.1.1. Fungos micorrízicos arbusculares

O termo micorriza, derivado das palavras gregas para 'fungo' e 'raiz', descreve uma relação simbiótica entre um fungo do solo e a raiz de uma planta (WILCOX, 1991; SMITH; READ, 2008). Os Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMAs) constituem uma classe de fungos simbióticos que formam associações mutualísticas com mais de 80% das espécies vegetais, incluindo muitas cultivadas. Essas associações são relativamente não seletivas e representam uma das simbioses mais importante entre micro-organismos e plantas (BONFANTE; GENRE, 2010).

A capacidade das plantas de formar associações simbióticas com micorrizas surgiu no início da evolução das plantas, com os fungos desempenhando papel importante no estabelecimento da vida no ambiente terrestre (REDECKER, 2000; BONFANTE; GENRE, 2008). Apesar de existirem relações parasitárias e neutras, a maioria das associações micorrízicas é benéfica tanto para a planta hospedeira quanto para os fungos colonizadores. As micorrizas auxiliam as plantas na obtenção de água e nutrientes, principalmente os poucos móveis no solo como: P, Cu e Zn (SMITH; READ, 2008; NOVAIS *et al.*, 2017).

A absorção de nutrientes também é aumentada devido à maior exploração do solo pelas hifas, que se estendem além da área de depleção de nutrientes que é formada em torno das raízes. Desse modo, os FMAs podem auxiliar na absorção dos nutrientes além da zona de absorção, explorando maior volume de solo (NOVAIS *et al.*, 2017).

A colonização de FMAs também aumenta a agregação do solo, melhorando sua capacidade de retenção de água e, conseqüentemente, elevando a qualidade do solo. Além disso, os FMAs desempenham um papel importante na dinâmica do carbono e nutrientes nos ecossistemas, e têm sido estudados como uma ferramenta para promover a sustentabilidade agrícola (SMITH *et al.*, 2015).

Os fungos micorrízicos interagem também com bactérias do solo, seja por efeitos sinérgicos ou antagônicos, e essa interação na rizosfera promove um aumento significativo no crescimento e na fisiologia da planta (GLICK, 2012). Ainda, interações complexas entre os micro-organismos na rizosfera induzem a seleção de diferentes grupos com distintas respostas funcionais na microbiota da rizosfera (FLORES-GALLEGOS; NAVA-REYNA, 2019).

3.2.1.2. Rizobactérias benéficas

As rizobactérias são um grupo de micro-organismos que colonizam a rizosfera, e estas conferem efeitos benéficos às plantas por uma variedade de mecanismos, incluindo síntese de fitormônios, solubilização de minerais, produção de sideróforos, aumento na absorção de nutrientes, área foliar, etc. Além disso, esses micro-organismos também produzem enzimas antioxidantes a fim de proteger as plantas contra estresses ambientais (FLORES-GALLEGOS; NAVA-REYNA, 2019).

Essas bactérias produzem compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de patógenos, além de os suprimir ao estimular a defesa natural das plantas, aumentando a sua resistência a doenças. Ainda, fornecem nutrientes à planta pela fixação de N_2 (p.ex. *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*) e formação nódulos nas raízes de leguminosas, solubilizam fosfato para facilitar sua disponibilidade às plantas, e auxiliam no desenvolvimento radicular ao regular fitormônios, aumentando assim as taxas de absorção de água e minerais (GLICK, 2012).

Em resumo, as rizobactérias desempenham um papel importante na supressão natural de patógenos e na fertilidade do solo, contribuindo para a saúde e produtividade das plantas. Por essa razão, essas bactérias têm sido amplamente empregadas na agricultura como promotoras de crescimento vegetal, diminuindo a necessidade de aplicação de pesticidas, fungicidas e fertilizantes químicos.

3.3. Rizobactérias promotoras de crescimento em plantas

As rizobactérias promotoras de crescimento em plantas (RPCP) englobam bactérias de vida livre, aquelas que formam relações simbióticas específicas com

plantas, bactérias endófitas que colonizam tecidos internos das plantas e cianobactérias. Apesar das diferenças entre elas, todas empregam mecanismos semelhantes, sejam diretos (fixação biológica de nitrogênio, solubilização do fosfato, produção de fitormônios) ou indiretos (produção de sideróforos e biofilme) (CHAUHAN *et al.*, 2015).

As RPCPs promovem diretamente o crescimento das plantas ao facilitar a disponibilidade de recursos no solo ou modular os níveis de hormônios vegetais. De forma indireta, atenuam os efeitos inibitórios de diversos agentes patogênicos no crescimento e desenvolvimento das plantas, agindo como agentes de biocontrole. A maioria das RPCPs estudadas na literatura promove o crescimento através do fornecimento de fitormônios de crescimento, como auxinas, giberelinas e citocininas, contribuindo para o desenvolvimento da raiz e da parte aérea das plantas e, assim, ampliando a área de captação de nutrientes pelo vegetal (GLICK, 2012; SINGH; SHIGH; PAL, 2017).

Diante dos mecanismos que favorecem o desenvolvimento das plantas, não é claro se uma característica ou um conjunto delas poderia ser preditivo da promoção de crescimento. Além disso, alguns estudos sugerem que um consórcio de bactérias pode ser mais eficaz na promoção de crescimento vegetal do que uma única bactéria. É importante considerar a especificidade da planta hospedeira, adaptação ao tipo de solo, condições climáticas ou patógenos para que ocorra influência dessas bactérias sobre a planta (SUNDARAMOORTHY *et al.*, 2012; AKIRINLOLA *et al.*, 2018).

Diversos gêneros de bactérias (*Azospirillum*, *Acetobacter*, *Azotobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Paenibacillus*, *Klebsiella* e *Serratia*) têm sido relatados como promotores do crescimento das plantas, resultando em incrementos na produtividade de grãos, aumento na emergência de sementes, biomassa vegetal, rendimento da colheita e resistência às doenças (HUNGRIA *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2019).

3.3.1. Os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*

Os membros dos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus*, pertencentes ao filo Firmicutes, são componentes importantes dos microbiomas vegetais. Estudos de metagenômica estimam que o microbioma vegetal é composto pelos mais diversos

gêneros bacterianos, em termos relativos, o filo Firmicutes é um dos filos dominantes do solo de rizosfera (LUNDBERG *et al.*, 2012). Isso aponta sua importância para o microbioma vegetal e indica que a seleção de micróbios é conduzida pela planta hospedeira (LUNDBERG *et al.*, 2012).

Os gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* são compostos por bactérias aeróbicas ou anaeróbicas facultativas, capazes de formar esporos. Esses gêneros são amplamente encontrados em sistemas agrícolas e possuem características fisiológicas importantes, como: a produção de parede celular com estrutura multicamada, capacidade de formar endósporos resistentes ao estresse e secreção de diversos compostos, tais como antibióticos, moléculas sinalizadoras e enzimas extracelulares (GARDENER, 2004).

O gênero *Paenibacillus* possui espécies que promovem o crescimento de plantas por meio de vários mecanismos, incluindo a produção de ácido indol-3-acético (AIA) e outras auxinas, a solubilização do fósforo inacessível para formas mais lábeis, e algumas espécies podem realizar a fixação do nitrogênio atmosférico (SINGH, 2018). Além disso, *Paenibacillus* auxilia no controle de fitopatógenos, desencadeando Resistência Sistêmica Induzida (RSI) e/ou produzindo uma variedade de substâncias biocidas (WESELOWSKI *et al.*, 2016; PATOWARY; DEKA, 2020).

O gênero *Bacillus* auxilia na manutenção da saúde, desenvolvimento e crescimento das plantas ao atuar na indução de vias de resistência, pela produção de hormônios como auxinas, giberelinas e citocininas. As bactérias desse gênero também podem estimular a simbiose com outros micro-organismos benéficos, aumentando, por exemplo, a infecção por endo e ectomicorrizas (MEDINA *et al.*, 2003). Muitas espécies do gênero atuam na fixação de nitrogênio e na solubilização de P, K e Fe, aumentando a disponibilidade desses nutrientes na solução do solo e tornando-os prontamente assimiláveis às plantas (GLICK, 2012). Ainda, os *Bacillus* agem na supressão de patógenos e estimulam a resistência sistêmica em plantas contra estresses bióticos e abióticos pela produção de metabólitos voláteis e antibióticos (BORRIS, 2020).

O crescente interesse na comunidade científica e agrícola em RPCPs está no potencial de utilização desses organismos no aumento da produtividade das lavouras ao serem usados como inoculantes (SANTOS *et al.*, 2019). Entre as linhagens de bactérias com potencial biotecnológico para uso como RPCPs estão o

gênero *Bacillus* e *Paenibacillus*. Essas bactérias podem ser inoculadas isoladamente ou em consórcio com outras estirpes bacterianas ou fúngicas para promover o crescimento vegetal (GARDENER, 2004). Por esses motivos, a pesquisa sobre RPCPs continua a crescer e é uma área promissora na biotecnologia agrícola.

3.4. Efeitos da inoculação de bactérias no microbioma da rizosfera

Inoculantes são produtos compostos por micro-organismos vivos capazes de beneficiar o desenvolvimento de diferentes espécies vegetais por meio de uma variedade de processos individuais ou combinados (BRASIL, 2004, art. 2º, inciso V; BHATTACHARYYA; JHA, 2012). A seleção e aplicação de micro-organismos benéficos específicos é uma estratégia que visa estimular a eficiência na fertilidade do solo e a indução de resistência da planta a doenças e estresses ambientais, além de ajudar a reduzir a contaminação do solo e da água por agroquímicos (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAÚJO, 2016; SANTOS *et al.*, 2019).

Interações sinérgicas entre cepas microbianas compatíveis, mas funcionalmente diversas, podem levar a uma melhor adaptação a novos ambientes e, simultaneamente, oferecer uma amplitude de características funcionais promotoras de crescimento para melhorar os fenótipos das plantas e, finalmente, aumentar a produtividade das culturas (KAUR *et al.*, 2022). A eficácia dos inoculantes a base de RPCPs está associada à sua capacidade de colonizar, sobreviver e persistir na rizosfera, bem como à complexa rede de interações ocorrentes entre a bactéria inoculada e a comunidade microbiana nativa residente (KONG; LIU, 2022).

As comunidades microbianas da rizosfera são altamente protegidas contra a inoculação de bactérias não nativas (BJÖRKLÖF; SEM; JØRGENSEN, 2003), devido à grande variabilidade em relação a diversidade estrutural da comunidade microbiana, às interações pareadas entre invasores e táxons residentes e à sua interação com rizosfera da planta, bem como a forma como esse microbioma se comporta diante de uma perturbação (EISENHUER *et al.*, 2013; SANTOS; NOGUEIRA; HUNGRIA, 2019).

Para alcançar eficiência, uma alta concentração de inoculante deve ser introduzida no ambiente, o que pode induzir alterações na estrutura biológica local (LUPWAYI *et al.*, 2000; LITCHMAN, 2010). Como se espera que plantas e

inoculantes cooperem ativamente na zona radicular, essas interações podem estabelecer relações para permitir uma melhor adaptação ao ambiente e, assim, alterar de alguma forma o entorno (AMBROSINI; SOUZA; PASSAGLIA, 2016).

Independentemente dos efeitos ou causas ecológicas, uma perturbação surge em resposta a inoculação, que desencadeia mudanças nos componentes estruturais e funcionais de diferentes aspectos do sistema, inclusive nos níveis do indivíduo, população, comunidade, ecossistema e paisagem (BERGA; SZÉKELY; LANGENHEDER, 2012). A resistência (ou seja, a capacidade de retornar a um estado de equilíbrio após uma perturbação ou resistir a uma mudança) e a resiliência (ou seja, a taxa de retorno a um estado de equilíbrio após uma perturbação) estão relacionadas à estabilidade da comunidade microbiana em resposta à perturbação sofrida (ROBINSON; BOHANNAN; YOUNG, 2010; AMBROSINI; SOUZA; PASSAGLIA, 2016).

A interação dos fatores inoculação e fertilização pode influenciar significativamente a abundância de algumas famílias microbianas, através da modificação da comunidade microbiana da rizosfera e da funcionalidade do solo, influenciando diretamente a ecologia microbiana da rizosfera (BERG *et al.*, 2017). Apesar dos resultados promissores de promoção do crescimento vegetal comumente relatados, as informações são incipientes sobre os efeitos da modificação exercida pela inoculação de RPCPs no microbioma da rizosfera e seu papel subsequente no funcionamento da rizosfera (KONG; LIU, 2022).

3.5. Planta modelo: feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa, pertencente à família Fabaceae, originária do continente americano, especificamente no México e Sul dos Andes (TORO; TOHME; DEBOUCK, 1990). Possui grande importância agrícola e econômica por ser uma das fontes alimentares mais completas em termos nutricionais (ANTUNES *et al.*, 1995). É considerada a leguminosa mais importante para o consumo direto no mundo, cultivada em 113 países e de grande relevância para segurança alimentar e agricultura sustentável (FAO, 2020).

No cenário mundial, a produção de feijão no Brasil tem se destacado. Em 2021 o país ocupou a segunda posição entre os maiores produtores mundiais (FAOSTAT, 2021). Em 2022, a área ocupada com plantio de feijão no Brasil chegou

a 2,8 milhões de hectares, abastecendo o mercado interno com uma produção de 2,9 milhões de toneladas na safra de 2021/2022, mesmo diante de adversidades climáticas (CONAB, 2023).

A espécie apresenta uma notável variabilidade morfológica, fisiológica e genética em comparação com outras leguminosas (CELMELI *et al.*, 2018), e é amplamente difundida em todo o mundo devido à sua capacidade de adaptação a diferentes ambientes (BITOCCHI *et al.*, 2017; RIBEIRO, 2020).

O cultivo do feijoeiro é realizado de várias formas, com níveis de tecnologia variados. Por ser uma planta exigente em fertilidade do solo, disponibilidade hídrica e controle fitossanitário, as maiores produções são alcançadas com um considerável aporte de insumos (SILVA; ROMAM, 2021). Esse fator aumenta o custo de produção, reduzindo a rentabilidade do produtor rural (PAULA; CHELOTTI, 2018; CONAB, 2021).

O feijoeiro apresenta alta exigência em qualidade física e química do solo. Nesse contexto, a utilização de micro-organismos vem ganhando espaço, sendo empregada de forma combinada, em pequena escala, ao uso de produtos sintéticos (BONATERRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Além disso, tem-se evidenciado a inoculação combinada ou co-inoculação do feijoeiro por meio da utilização de mais de uma espécie de rizobactérias benéficas, visando melhorar a produtividade e reduzir custos em comparação com o uso exclusivo de fertilizantes químicos (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAÚJO, 2013).

3.6. Ferramentas para estudo de comunidades microbianas na rizosfera

Embora várias revisões tenham discutido diferentes aspectos do crescimento promovido por RPCPs, os possíveis efeitos ambientais relacionados à inoculação são motivo de preocupação devido ao seu potencial impacto na biodiversidade e no funcionamento dos ecossistemas (MAWARDA *et al.*, 2020). A inoculação, que consiste em fornecer uma alta densidade de micro-organismos viáveis e eficientes para colonização da rizosfera, pode causar ao menos uma perturbação transitória no equilíbrio das comunidades microbianas do solo (TRABELSI; MHAMDI 2013).

Inicialmente, os estudos de micro-organismos no solo eram baseados em técnicas de isolamento e crescimento em meios de cultura, limitando-se a uma

pequena parcela de organismos que podiam ser cultivados em condições laboratoriais (AMANN; LUDWING; SCHLEIFER, 1995). Nas últimas décadas, ferramentas moleculares se aliaram aos métodos clássicos de microbiologia, proporcionando novas percepções sobre a ecologia microbiana dos solos. O rápido crescimento nas questões de ecologia molecular emergiu como resultado do avanço da biologia molecular (TABERLET *et al.*, 2012).

Com técnicas de sequenciamento em larga escala, comunidades microbianas do solo e sua importância no ecossistema estão sendo elucidadas (TRABELSI; MHAMDI 2013). Análises moleculares de sequências de DNA permitem uma nova compreensão da diversidade taxonômica e funcional microbiana em uma ampla variedade de ambientes. Além das técnicas de cultivo e isolamento de micro-organismos, várias ferramentas podem ser usadas para estudar comunidades microbianas na rizosfera (DUMONT *et al.*, 2011).

As principais ferramentas usadas para estudo de comunidades microbianas da rizosfera incluem o: sequenciamento de *amplicon* (gene 16S rRNA para bactérias e gene ITS para fungos), metagenômica, FISH (Fluorescent in situ hybridization) que utiliza sondas de DNA fluorescentes específicas para identificar e quantificar espécies presentes na comunidade microbiana diretamente em amostras da rizosfera, e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizada para visualizar a microarquitetura da rizosfera e a interação entre as raízes e a comunidade microbiana.

Os estudos da diversidade microbiana têm avançado com o desenvolvimento de novas tecnologias que abordam questões importantes sobre “quem, o quê, quando, onde, porquê e como” de comunidades microbianas (KNIGHT *et al.* 2012). A escolha da técnica mais adequada dependerá dos objetivos específicos do estudo.

A análise da diversidade funcional também pode fornecer informações sobre como micro-organismos adaptativos podem influenciar a fertilidade do solo e o crescimento das plantas. O rápido avanço dessas tecnologias, juntamente com ferramentas de bioinformática, estão ampliando as possibilidades de estudos abrangentes em ecologia microbiana, permitindo uma compreensão mais profunda da composição e função dos micro-organismos no solo e na sua interação com plantas.

3.6.1. Expressão gênica: resposta de defesa da planta

A análise do transcriptoma envolve a identificação de todos os RNAs expressos em um organismo, possibilitando a comparação do perfil de expressão gênica em diferentes condições ambientais, estados patológicos, fisiológicos ou de desenvolvimento (SILVA, 2019). A expressão gênica refere-se ao processo em que a informação contida em um gene é traduzida em estruturas presentes em um tipo celular específico, como o RNA mensageiro ou proteínas.

Micro-organismos benéficos, como RPCPs e FMAs, ao interagirem com as plantas, induzem mudanças fisiológicas e metabólicas, alterando a expressão gênica em diferentes órgãos das plantas (FIGUEIREDO *et al.*, 2013; MONTEIRO *et al.*, 2013). Essa interação estimula a expressão de genes envolvidos nas respostas de defesa, aumentando a resistência das plantas (TING *et al.*, 2010; SUNDARAMOORTHY *et al.*, 2012).

A regulação gênica está presente em vários processos de desenvolvimento das plantas, afetando a plasticidade fenotípica e influenciando as respostas adaptativas a condições e instabilidades ambientais, melhorando a adaptação das plantas a longo prazo aos desafios ambientais (GALLUSCI *et al.*, 2017). Genes relacionados a resistência codificam proteínas de reconhecimento que ativam vias de sinalização complexas, resultando em diversos mecanismos de defesa que reprogramam a transcrição gênica e atuam em benefícios das plantas (NEJAT *et al.*, 2017; ANDERSEN *et al.*, 2018).

Medindo a quantidade de RNA celular, é possível determinar a extensão e expressão de um gene específico. A reação de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (RT-qPCR) é uma ferramenta poderosa para quantificar a expressão de genes, sejam eles constitutivos ou induzidos (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

Estudos de expressão gênica têm fornecido informações valiosas para melhorar o entendimento dos processos celulares e fisiológicos em plantas (MORGANTE; BLAWID, 2016). Essa análise é uma ferramenta importante para quantificar o papel de diferentes genes na resposta vegetal das plantas à estresses bióticos e abióticos (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM), pertencente ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), Universidade de São Paulo, no município de Piracicaba-SP.

4.1. Coleta e análise do solo

O solo utilizado durante o experimento em casa de vegetação foi coletado em área experimental, nas camadas de 0-20 cm, sob cultivo de soja, localizada nas dependências da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (Fazenda Sertãozinho), Piracicaba-SP (Figura 2). Foram retiradas, também, subamostras do solo para caracterização de seus atributos químicos e físicos, na mesma profundidade, e encaminhadas para análise, cujo os resultados obtidos estão descritos na Tabela 1. O solo amostrado foi peneirado em malha 4mm e corrigido (3g de CaCO_3) elevando sua saturação por bases a 70%, mantendo-o em repouso por 15 dias, e em seguida acondicionado em vasos de polietileno de seis litros.

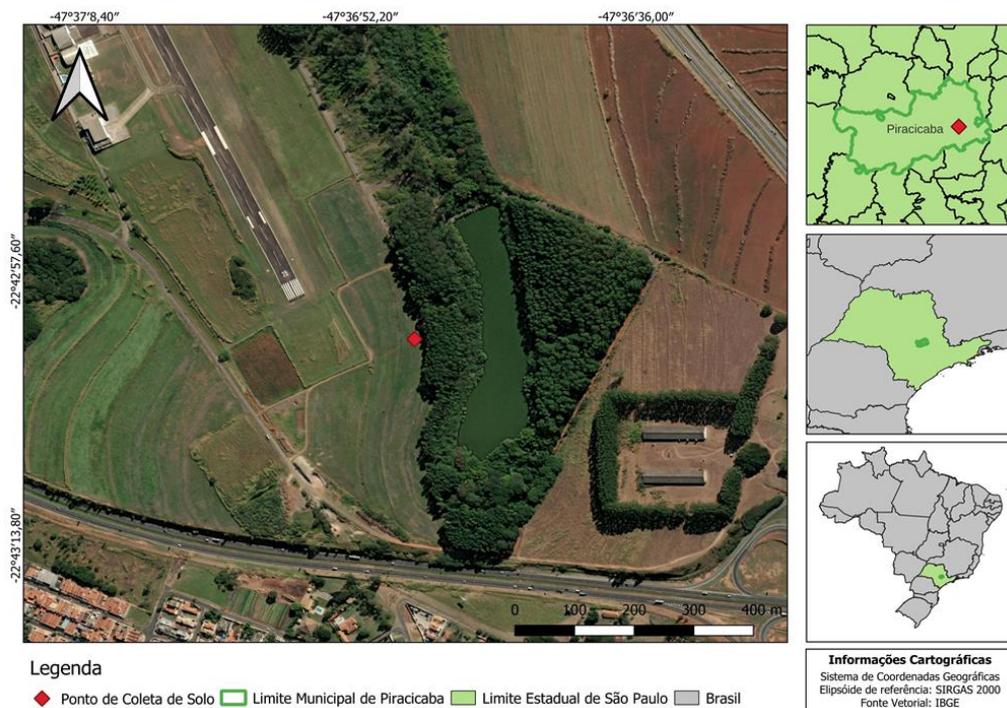


Figura 2. Mapa de localização da área de coleta - Fazenda Sertãozinho (ESALQ/USP).

Fonte: ROCHA JÚNIOR, 2022.

Tabela 1. Atributos químicos e físicos da camada de 0–20 cm do solo.

pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	Al	SB	CTC	V%	m%
CaCl ₂	g.dm ⁻³	mg.dm ⁻³	-----mmolc.dm ⁻³ -----								
4,3	14	18	0,8	9	4	16	3	14	30	46	18
S	Cu	Fe	Zn	Mn	B	Argila	Silte	Areia Total	Areia Grossa	Areia Fina	
mg.dm ⁻³	-----mg.dm ⁻³ -----					-----g/Kg-----					
5	12	46	2,2	20	0,4	117	73	810	260	550	

Afim de corrigir a fertilidade do solo, a adubação de base procedeu seguindo a recomendação para a cultura do feijão do Estado de São Paulo e para cultivo em vasos (MENDES; NOVAIS, 1991; RAIJ *et al.*, 1997) seguindo os atributos químicos do solo. O solo foi adubado na quantidade de 10g/vaso na formulação 04-14-08 de NPK, como fonte de macronutrientes.

4.2. Origem das cepas bacterianas

Dez estirpes bacterianas pertencentes ao LBCM foram utilizadas neste trabalho. As estirpes foram isoladas da rizosfera de cultivares de feijão com diferentes níveis de resistência ao *Fusarium oxysporum* cultivados em solo terra preta da Amazônia (MENDES *et al.*, 2019), classificadas taxonomicamente como pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Paenibacillus* (Tabela 2). Testes anteriores a este trabalho mostraram que quatro desses isolados (6KRs, KSc32, KSc46, K15Rs) apresentaram melhores potenciais para promoção de crescimento, sendo então selecionados para avaliação em casa de vegetação.

Tabela 2. Identificação das dez estirpes bacterianas com resistência ao *Fusarium oxysporum* isolados da região da rizosfera de feijão e sua respectiva classificação taxonômica baseada no gene 16S rRNA.

ID	Código do Isolado	Classificação 16S
LM1	KSc41	<i>Paenibacillus vini</i>
LM2	KSc25	<i>Paenibacillus sp.</i>
LM3	K2Rs	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
LM4	KSc44	<i>Bacillus barbaricus</i>
LM5*	6KRs	<i>Bacillus barbaricus</i>
LM6	K9Rs	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
LM7*	KSc32	<i>Bacillus paramycoides</i>
LM8	KSc23	<i>Paenibacillus jamilae</i>
LM9*	KSc46	<i>Paenibacillus jamilae</i>
LM10*	K15Rs	<i>Paenibacillus polymyxa</i>

*Estirpes selecionadas para compor os tratamentos individuais

4.2.1. Recuperação e manutenção das estirpes bacterianas.

Testes de antagonismo entre as estirpes foram realizados para verificação de possíveis interações entre elas. Nesta etapa, primeiramente realizou-se o reavivamento das cepas, uma vez que estas estavam criopreservadas em glicerol a -80 °C. O procedimento de reavivamento constituiu-se de descongelamento das cepas e transferência com alça de repicagem para placas de petri em meio ágar KING (20 g de peptona bacteriológica, 15 g ágar bacteriológico, 10 g de glicerol, 1,5 g K₂HPO₄, 1,5 g MgSO₄ para 1L de água destilada, acertando o pH à 7,2) e incubadas em estufa microbiológica por 48 horas a 27°C. Uma vez reavivada, as estirpes foram repicadas semanalmente em meio sólido KING e mantidas em estufa a 27°C para manutenção.

4.2.2. Avaliação da curva de crescimento

A curva de crescimento para as estirpes selecionadas foi realizada para definição do tempo de incubação necessário para obtenção de uma concentração de 10⁸ UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia), alcançadas na fase exponencial de

crescimento. A fase de crescimento exponencial é o momento de maior atividade metabólica da célula bacteriana e, portanto, o estágio ideal para aplicação das células nos ensaios bacteriológicos. Inicialmente, o pré-inóculo foi preparado e as colônias de *Bacillus* e *Paenibacillus* foram inoculadas em erlenmeyer contendo 50 mL de meio KING líquido previamente autoclavado. O pré-inóculo foi mantido a 28 °C, à 130 RPM (rotação por minuto) por 24h. Após esse período, uma alíquota de 1 mL do pré-inóculo foi inoculada assepticamente em um segundo erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio KING e outra alíquota de 1 mL foi analisada em espectrofotômetro de absorção para determinação da densidade ótica (OD) em 600 nm. A determinação da unidade formadora de colônias por mL (UFC/mL) foi realizada após diluições sucessivas da alíquota inicial em diferentes tubos (Figura 3). A cada quatro horas de crescimento, uma alíquota de 100 µl das diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} , foi inoculada em placas de petri (KING sólido) pelo método do esfregaço e incubadas em B.O.D por 48 h.

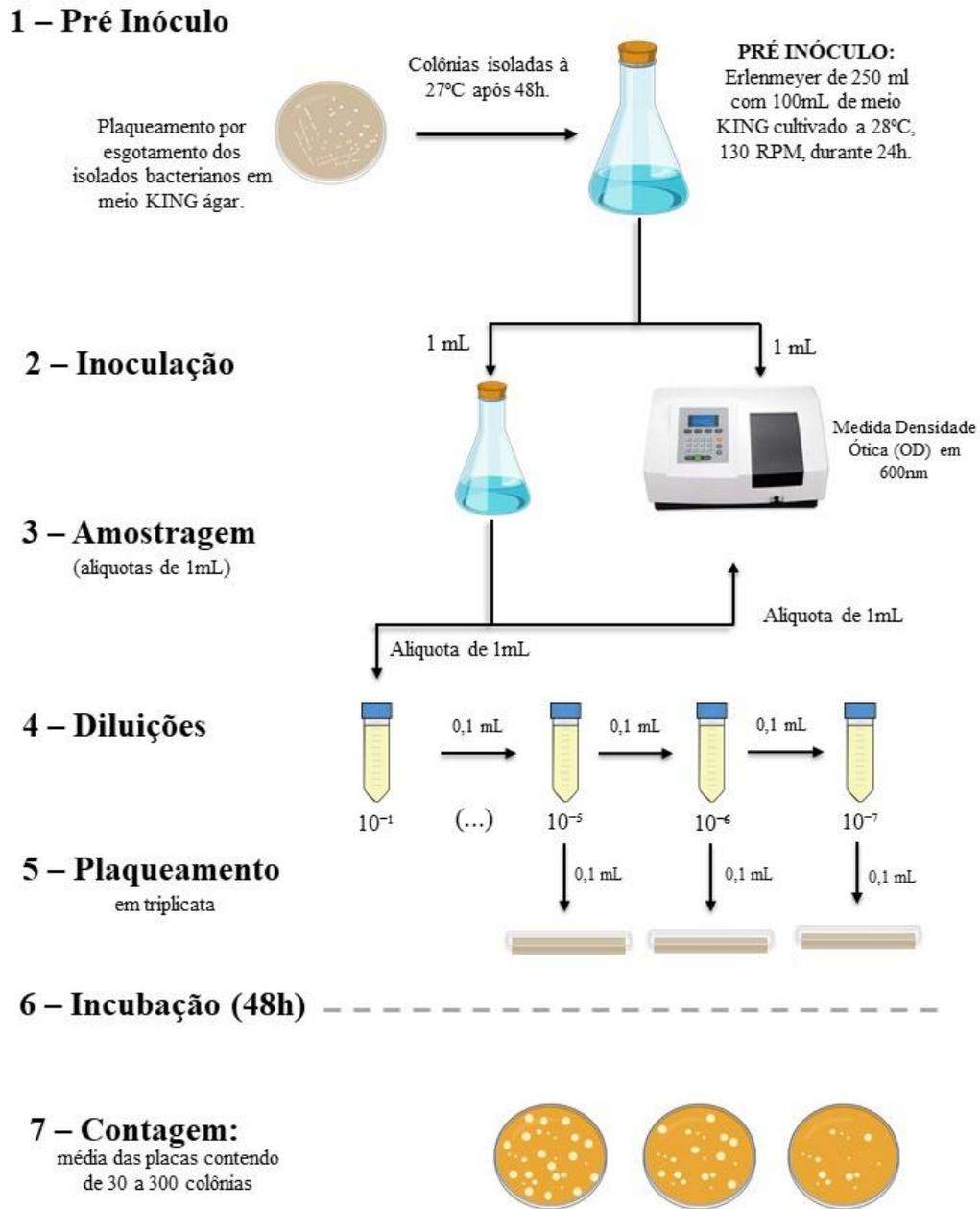


Figura 3. Método de amostragem com diluições sucessivas para obtenção de curva de crescimento bacteriano.

Após o período de incubação em B.O.D, as colônias formadas em cada placa foram contadas pelo cálculo de UFC/mL. Somente placas contendo entre 30 e 300 colônias foram utilizadas para obtenção deste cálculo. Deste modo, o número de bactérias presentes no erlenmeyer no tempo da amostragem foi definido como o número de colônias contadas na placa pela diluição da amostra por densidade ótica (OD).

4.2.3. Teste de antagonismo

Com objetivo de avaliar a interação entre as estirpes, os isolados foram submetidos a testes de antagonismo por meio da repicagem por estrias de esgotamento em meio ágar KING e incubados em B.O.D por 48 h a 29 °C. As colônias bacterianas que ficaram isoladas foram submetidas ao teste de antagonismo na mesma placa, de modo que todas as cepas estivessem em contato (*Bacillus x Bacillus*, *Bacillus x Paenibacillus*, *Paenibacillus x Paenibacillus*), utilizando a técnica de estria cruzada. O teste foi realizado em placa de Petri (Ø 90 mm) contendo KING ágar e posterior incubação a 29 °C por 48 h.

4.3. Preparo do inoculante

Para o início das análises *in vivo*, os isolados escolhidos foram cultivados em meio KING líquido, baseado no tempo estipulado pela curva de crescimento respectivo a cada espécie, mantidas em temperatura de 28 °C, em agitação constante em 130 rpm. As colônias, após o período de desenvolvimento, foram quantificadas em espectrômetro ($OD_{600} = 1,4$ – *Bacillus*; $OD_{600} = 1,5$ – *Paenibacillus*) e transferidas para tubos falcon autoclavados.

O tubo falcon foi centrifugado em rotação máxima por 10 min para formação de pellet. Com cuidado, o meio de cultura foi descartado e em seguida, o falcon foi completo com solução Tampão Fosfato-Salina (PBS) (8,0 g NaCl, 0,20 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 para 1L de água destilada, acertando o pH da solução para 7,2), que além de auxiliar a manter o pH do meio constante, impede a desnaturação ou as mudanças conformacionais das células bacterianas.

4.4. Plantio

O bioensaio foi realizado em casa de vegetação, conduzido em blocos, no delineamento inteiramente causalizados em sete tratamentos com quatro repetições e cada parcela foi representada por uma planta. Na semeadura, foram utilizadas três sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), cultivar IAC Milênio, por vaso. As sementes de feijão foram desinfestadas em solução de NaClO 10% por 2 min, e em

seguida em Alcool 70% por 2 min, a seguir lavadas com água destilada. Nos tratamentos com inoculação individual, foram utilizados inoculantes à base dos isolados, um Controle sem inoculação e o solo Bulk (Tabela 3).

Tabela 3. Tratamentos das sementes de feijão do cultivar IAC Milênio, realizados com isolado bacteriano.

TRATAMENTO	DESCRIÇÃO	ISOLADO
CONTROLE	Sem inoculação de bactérias	-
T1	<i>Bacillus barbaricus</i>	KRs6
T2	<i>Bacillus paramycoides</i>	KSc32
T3	<i>Paenibacillus jamilae</i>	KSc46
T4	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	KRs15
T5	Pool Bacteriano	*
BULK	Bulk Soil	-

*Isolados KSc41, KSc44, K9Rs, KSc32 e KSc23.

A microbiolização das sementes foi realizada utilizando-se a solução com inóculo na dose de 1 mL por semente. Em 6 recipientes separados, 12 sementes de feijão foram imersas em 12 mL do isolado correspondente a cada tratamento. O tratamento Controle recebeu somente a solução salina sem inóculo. A suspensão das sementes com o inoculante foi submetida a agitação manual por um período de 2 minutos antes da semeadura. Em cada vaso/repetição foram semeadas 3 sementes de feijão equidistantes entre si, a dois centímetros de profundidade, aplicando-se a suspensão, que ficou no recipiente, dentro da cova de semeadura igualmente entre as repetições (Figura 4).



Figura 4. Representação da dinâmica de inoculação na semeadura do feijão.

Quinze dias após a semeadura, 1 mL do isolado bacteriano foi re-inoculado, na base do colmo das plantas, com objetivo de realizar reforço da inoculação. Após 20 dias da semeadura foi realizado o desbaste da planta, mantendo apenas um indivíduo por vaso. As plantas invasoras foram removidas manualmente e a umidade do solo dos vasos foi mantida a 80% da capacidade de campo, cessando um dia antes do desmonte para facilitar a coleta do solo.

4.5. Coleta do experimento

As plantas foram conduzidas até estágio V4 (35 dias), que corresponde à fase final do estado vegetativo do feijão. O término desta etapa é marcado pelo início do estágio reprodutivo, evidenciado pelo desenvolvimento dos botões florais. No 34º dia, as plantas foram avaliadas quanto ao diâmetro de caule (mm) utilizando um paquímetro e altura de planta (cm) utilizando uma trena milimetrada. No 35º dia (fim do experimento), no momento da coleta, foi retirada a terceira folha trifoliolada de cada planta para as análises de expressão gênica. As folhas foram retiradas, imediatamente colocadas em papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido. Em seguida, foram armazenadas em ultrafreezer a -80 °C.

As plantas foram retiradas do vaso, colocando-as sobre papel pardo, e destorroando-as até que restasse apenas o solo rizosférico solo aderido às raízes. O solo rizosférico foi então transferido para microtubos de 1,5 mL e armazenado em freezer (-20 °C), até o momento da extração do material genético total. O comprimento de raiz (cm) foi mensurado utilizando uma fita métrica. Em seguida, as raízes e a parte aérea das plantas foram separadas, pesadas e acondicionadas em sacos de papel. Depois de secagem em estufa a 60 °C, até obtenção de massa constante, a massa seca das raízes e da parte aérea das plantas foram quantificadas. Para análise química, aproximadamente 100 g de solo foram coletados dos vasos e armazenados em sacos herméticos. Para a análise enzimática do solo (Arilsulfatase, β – Glicosidade e Fosfatase Ácida), cerca de 30 g de solo foram coletados e acondicionados em tubos Falcon. As raízes mais tenras encontradas nos vasos foram coletadas para análise da taxa de micorrização.

4.6. Expressão gênica da planta

4.6.1. Isolamento de RNA total e síntese de cDNA

Antes da extração do RNA, a bancada e instrumentos foram higienizados com solução detergente SDS 0,1% (Dodecil Sulfato de Sódio). As folhas do feijoeiro foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de pistilo até a formar um pó fino. As amostras foram postas em microtubo (1,5 mL), e imediatamente congelada com o auxílio de nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer a -80 °C. O RNA total do material vegetal foi extraído utilizando-se o kit de isolamento *SV Total RNA Isolation System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

A qualidade e pureza do RNA total isolado foi analisada em espectrofotômetro (NanoDrop 2000c), considerando absorvância $A_{260/280}$ 1,7 a 2,2 e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (Fig. S1). Na sequência, 1 μ g do RNA total foi usado para a síntese de cDNA. A transcrição reversa foi realizada com o kit *Super Script III First-Strand Syntesis SuperMix* (Invitrogen®), utilizando Oligo (dT)20 como *primer*, seguindo o protocolo do fabricante. Após, as amostras foram armazenadas em freezer -20 °C até a fase seguinte da pesquisa.

4.6.2. Avaliação da expressão por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Para avaliar a expressão gênica relativa, o produto da reação de cDNA da primeira fita foi diluído a 5:45 em *nuclease-free water*. Foram avaliadas a expressão gênica em folhas de feijoeiro submetidas aos seis tratamentos (Controle, *B. paramycoides*, *B. barbaricus*, *P. jamilae*, *P. Polymyxa* e Pool). Os *primers* foram selecionados baseados em estudos de expressão gênica em feijão, sendo a actina (*ACT*) o gene de referência e os genes-alvo: *chlorophyll a/b-binding proteins (CAB)*, *2,4-D inducible glutathione S-transferase (GST)* e *WRKY transcription factors (WRKY)* (Tabela 4). As eficiências dos conjuntos de primers foram estimadas para cada conjunto experimental pelo programa LinRegPCR (UNTERGASSER *et al.*, 2021), e os valores obtidos foram usados nas análises subsequentes.

Tabela 4. Genes-alvo usados neste estudo: função, conjuntos de primers.

Gene	Função	Primer Foward	Primer Reverse	Referência
<i>ACT11</i>	Actina	TGCATACGTT GGTGATGAGG	AGCCTTGGGG TTAAGAGGAG	BORGES <i>et al.</i> , 2012
<i>CAB</i>	Clorofila	TTGAATTCCT TGCCATTTCC	CACAAAAGCC AACAGAGCAA	KAVAR <i>et al.</i> , 2008
<i>GSTa</i>	2,4-D glutathione S-transferase induzível	AGGGAGTCAC ACTGGCTATGTT	ATGTGCCATTT GCATTTTAGTG	PORTEUS- ÁLVAREZ, 2020
<i>WRKY</i>	Fatores de transcrição WRKY	TTTCACAGGAC AGGTTCCCAGC	CCTTTGACAGAA ATGACTGAAGGA	

As análises de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foram conduzidas em equipamento StepOnePlus™ Real Time PCR Systems (Applied Biosystems). O mix de reação foi preparado da seguinte forma: 2,8 µl de cDNA diluído (1:50), 5 µl de SYBR Green Master Mix PowerUp, 0,5 µl (5 pmol) de cada *primer* e 0,2 µL BSA em um volume final de 10 µl. As condições de amplificação consistiram: desnaturação inicial 95 °C por 10 min: 40 ciclos de: 15 s de desnaturação a 95 °C, 30 s de anelamento a 60 °C, 30 s de extensão a 72 °C (com coleta de dados). Na curva de *Melting* a desnaturação por 15 s a 95 °C, anelamento a 60 °C por 1 min, com coleta de dados entre anelamento e extensão a cada aumento de 0,7 °C (60 °C à 95 °C).

Em cada placa, além do gene de referência (*ACT*), foram incluídos os genes alvo e controles negativos.

Os resultados das análises foram registrados a cada ciclo de amplificação pelo Software StepOne™ versão 2.2.2. Foram analisadas as curvas de amplificação de cada gene+amostra, mantendo-se as replicatas técnicas com diferenças nos valores de Ct menores que 0,5. Ainda, as curvas de *melting* para cada gene+amostra, foram verificadas, no intuito de observar a especificidade das reações (Fig. S2).

4.7. Análise enzimática do solo

O solo coletado na desmontagem do experimento foi mantido refrigerado a 4°C até o momento das análises das atividades das enzimas β -glucosidase, fosfatase ácida e arilsulfatase. A atividade enzimática foi baseada na colorimetria do *p*-nitrofenol liberado pelas enzimas do solo após incubação com substrato tamponado a 37 °C por 1 hora, com a exclusão do tolueno. A atividade da β -glucosidase foi determinada seguindo o método descrito por Tabatabai (1994). Para isso, 1,0 g de solo foi tratado com *p*-nitrofenil β -glucopiranosídeo e incubado por uma hora a 37 °C. Em seguida, a atividade da β -glucosidase foi medida por espectrofotometria a 410 nm. A atividade da fosfatase ácida foi determinada de acordo com Tabatabai e Bremner (1969). Resumidamente, 1,0 g de solo foi incubado com fosfato dissódico *p*-nitrofenil como substrato e incubado por uma hora a 37 °C. Posteriormente, a atividade foi quantificada por espectrofotometria a 420 nm. A atividade da arilsulfatase foi determinada de acordo com Spencer (1958). Para isso, 1,0 g de solo foi tratado com solução de *p*-nitrofenil sulfato de potássio e incubado a 37 °C por 1 hora.

4.8. Micorrizas

As raízes coletadas foram armazenadas em FAA (Ácido Acético: Álcool: Formaldeído, na proporção 5%:50%:10% + 35% de água) para preservar o tecido vegetal e possíveis estruturas dos FMA's preservados até a análise. As raízes foram tratadas com solução de KOH 10% por 30 minutos a 90 °C e, em seguida, lavadas e incubadas em solução de HCl, 0,3 M por 30 minutos. Depois, adicionou-se tinta

Parker Quink Washable Blue (diluída na proporção 1:10) blue 0,5% por 8 minutos a 90 °C. O corante foi removido e as raízes transferidas para placas com glicerol 50%. As raízes foram dispostas linearmente em lâminas de microscópio, com dez fragmentos de raízes por lâmina. Cada fragmento foi dividido em dez partes para facilitar a visualização da presença ou ausência dos fungos micorrízicos. As raízes foram observadas e fotografadas em lupa estereoscópica Zeiss AXIO Zoom V16.

4.9. Análises moleculares do microbioma rizosférico

4.9.1. Extração e purificação do DNA das amostras de solo

O DNA microbiano das amostras de solo da rizosfera e Bulk foram extraídos com o auxílio do DNeasy PowerSoil® Kit (QIAGEN Mobio, Carlsbad, CA), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do DNA extraído foi analisada por eletroforese corado com GelRed em gel de agarose 1%, e quantidade em espectrofotômetro NanoDrop nd-1000 (Thermo Scientific, USA).

4.9.2. Sequenciamento amplicons - 16S rRNA e ITS

O DNA rizosférico foi enviado para sequenciamento de amplicons do gene 16S rRNA e ITS. O preparo para envio foi realizado de acordo com o volume e concentrações seguindo as especificações recomendadas pela empresa Novogene (Sacramento, CA, EUA), responsável pelo serviço de sequenciamento. Para bactérias, um fragmento de 470 bp do gene 16S rRNA foi amplificado usando os primers 341F (5-CCTAYGGGRBGCASCAG-3) e 806R (5-GGACTACNNGGTATCTAAT-3) flaqueando a região V3-V4. Para a comunidade fúngica, fragmentos de 200-400 bp foram amplificados com os primers ITS5-1737F (5-GGAAGTAAAAGTTCGTAACAAGG-3) e ITS2-2043R (5-GCTGCGTTCTTCATCGA TGC-3).

4.10. Análise estatística expressão gênica (qPCR)

Os dados brutos de amplificação foram exportados para arquivo em formato RDML para serem analisados pelo programa LinRegPCR (UNTERGASSER *et al.*, 2021), realizando as correções da baseline para cada gene+amostra. O programa gerou dados de regressão linear para obtenção dos valores de Ct de cada amostra (valor referente ao número de ciclos necessários para que o sinal fluorescente atinja o limiar de detecção) e cálculo dos valores de Eficiência (E) para cada gene. Os dados de expressão gênica e análises estatísticas foram realizadas pelo programa REST (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL *et al.*, 2002), onde $p \leq 0,05$ * e $p \leq 0,01$ ** foram tratamentos que diferiram significativamente do tratamento Controle.

4.11. Análise das sequências de amplicon

As sequências obtidas após o sequenciamento de amplicons de 16S rRNA de bactérias e ITS de fungos foram pré-processadas utilizando o programa QIIME2 v2020.8.0 (BOYLEN *et al.*, 2019). Os arquivos contendo as sequências forward e reverse foram unidas utilizando o programa PEAR (ZHANG *et al.*, 2019). As sequências em single-end foram então truncadas, em 25 pb à esquerda e 300 pb à direita. A ferramenta DADA2 foi utilizada para correção das sequências e remoção de quimeras. A classificação taxonômica da região 16S rRNA foi conduzida com o QIIME2, utilizando a ferramenta qiime-feature-classifier treinada com banco de dados SILVA versão 132 (97%) (QUAST *et al.*, 2012). Para a região do ITS, a classificação foi realizada usando o banco de dados UNITE 9.0.

4.12. Análises estatística

Os dados referentes aos resultados das análises de biometria, química do solo e da planta, e as enzimas foram verificados quanto à normalidade utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R. A variação desses dados em relação ao Controle e suas respectivas significâncias foram obtidas pelo pacote ExpDes.pt, que realiza o teste de ANOVA com post-hoc utilizando o teste de Tukey. A estrutura das comunidades de bactérias e fungos foi avaliada

usando a análise de redundância (RDA) com distância de Bray-Curtis para variáveis microbiológicas e euclidiana para variáveis ambientais. As variáveis ambientais com maior influência na estrutura da comunidade foram selecionadas usando o pacote Vegan com a função envfit. O gráfico de ordenação da RDA foi gerado com a utilização dos pacotes microeco e ggplot2. Para testar a diferença significativa entre o perfil funcional dos diferentes tratamentos, foi utilizado o teste de PERMANOVA (Anderson, 2001). As análises de riqueza e diversidade alfa (índice de Shannon) foram calculadas com o pacote microeco e testadas quanto à sua diferença entre os tratamentos pelo teste de ANOVA. A abundância diferencial entre os tratamentos com inoculação em relação ao Controle foi obtida pelo teste estatístico two-sided t-test de Welch, usando o software STAMP.

A análise de network foi realizada com as tabelas de abundância de bactérias e fungos (otu_table) no pacote microeco com a função trans_network com os parâmetros: cor_method = "sparcc", sparcc_method = "SpiecEasi", filter_thres = 0.0005. A network foi gerada com a função cal_network com os parâmetros: COR_p_thres = 0.001 e COR_cut = 0.8. Por fim, as networks foram geradas e salvas no formato "gexf" para serem plotadas no software gephi. No gephi o layout selecionado foi o Fruchterman Reingold, o tamanho dos nós representa a quantidade de interações de cada OTU (average_degree) enquanto a cor de cada nó é representada pelos domínios "Bacteria" e "Fungi". A cor de cada aresta é representada em azul para correlações positivas e vermelho para correlações negativas. A estatística das networks foi gerada pelo próprio programa gephi.

5. RESULTADOS

5.1. Curva de crescimento bacteriano

Com base nos dados obtidos, foi possível estabelecer a relação entre a turbidez do inóculo e o número de células microbianas viáveis existentes por mL de meio de cultura. Observou-se que o gênero *Bacillus* iniciou a fase *log* de crescimento aproximadamente 4 horas após a inoculação, atingindo uma concentração 10^8 UFC/mL após 8 horas de cultivo, com uma densidade óptica de aproximadamente 1,4 (Fig. 5 - A). Por outro lado, o gênero *Paenibacillus* apresentou seu melhor crescimento após 12h de cultivo, atingindo uma concentração de 10^8 UFC/mL, e uma densidade ótica de 1,5 (Fig. 5 - B).

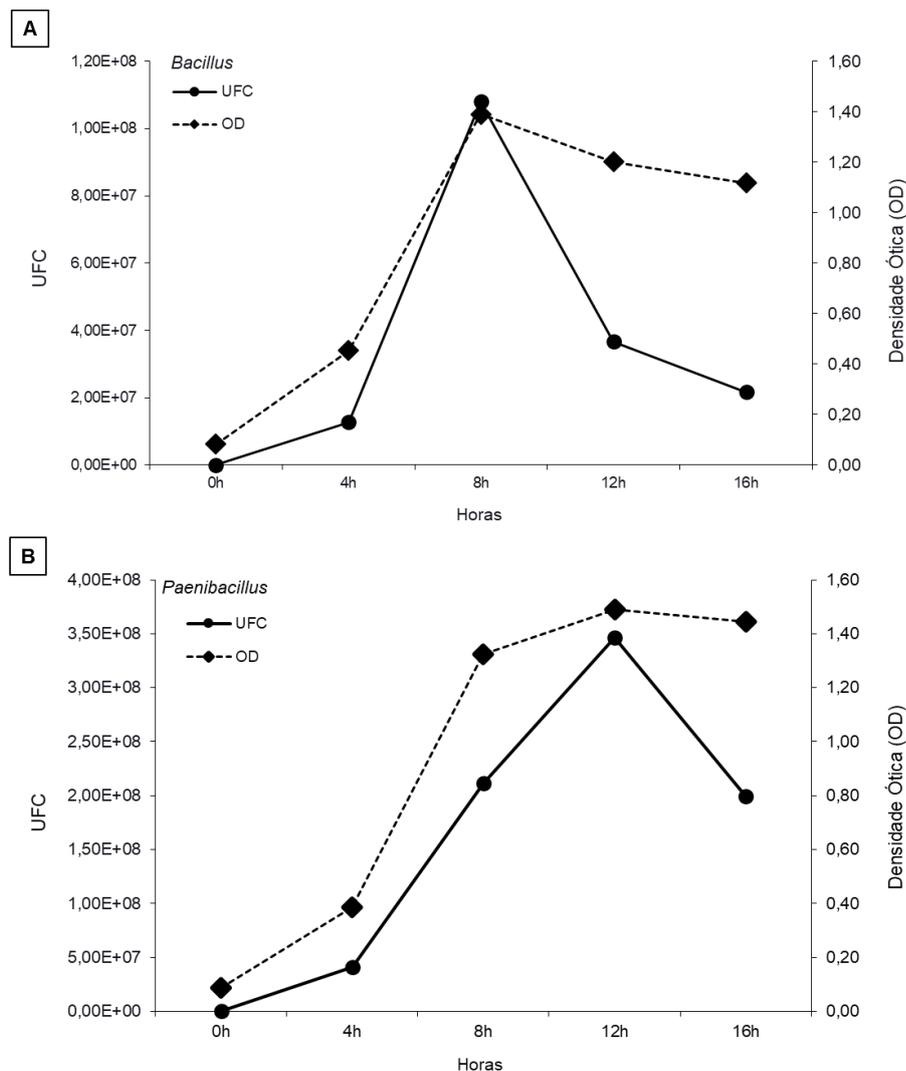


Figura 5. Curva de crescimento bacteriano obtido por densidade ótica sob medição do comprimento de onda (600 nm) por tempo de cultivo. (A) *Bacillus* e (B) – *Paenibacillus* cultivados em meio KING sob agitação constante (130 RPM) a 28 °C.

5.2. Teste de antagonismo

Após o teste de antagonismo, verificou-se a presença de efeito antagônico entre algumas cepas (KSc25, K2Rs, KSc44, 6KRs, KSc46, K15Rs) (Fig. 6 - B). A partir dos resultados obtidos, selecionou-se cinco isolados que não apresentaram antagonismo entre si para compor consórcio bacteriano (Pool Bacteriano), sendo eles: KSC41, KSC44, K9Rs, KSc32 e KSc23.

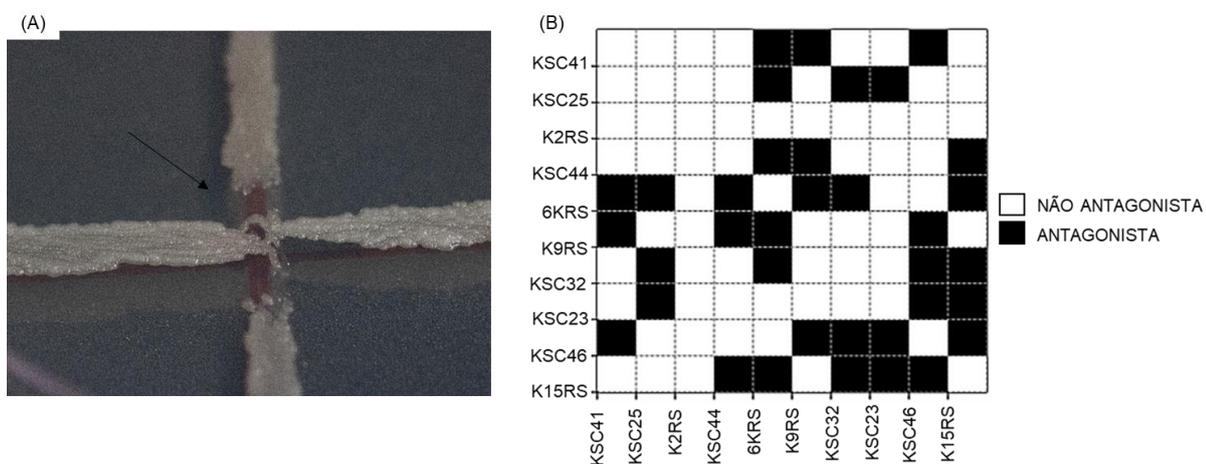


Figura 6. (A) Teste de antagonismo realizado entre as cepas bacterianas demonstrando a formação de halos de inibição entre as colônias. (B) Matriz de presença e ausência de efeito antagonico entre as cepas estudadas.

5.1. Variáveis de planta

5.1.1. Parâmetros de crescimento da planta

Na avaliação dos resultados do experimento com inoculação, os dados obtidos a partir da análise dos parâmetros de crescimento das plantas (altura, diâmetro do caule, área foliar, comprimento de raiz, massa seca de parte aérea, massa seca de raiz e massa seca total) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$). A análise dos resultados sugere que os tratamentos testados não afetaram significativamente o crescimento das plantas, embora a observação fenotípica sugira um efeito positivo (Tab. S1). Apesar de não ter diferença estatística nos parâmetros avaliados entre os tratamentos com isolados bacterianos e Controle, foi possível observar durante a

fase experimental que as plantas inoculadas demonstravam fenotipicamente maior desenvolvimento vegetal da parte aérea.

5.1.2. Química foliar

Na análise da química foliar foram observadas diferenças significativas para os elementos Nitrogênio (N), Magnésio (Mg), Cobre (Cu) e Ferro (Fe) (Tab. S2). As plantas inoculadas com *P. polymyxa* apresentaram maior conteúdo de N, Mg, e Fe foliar. Para o conteúdo de nitrogênio foliar, o tratamento com *P. polymyxa* apresentou as maiores concentrações, enquanto que os valores dos tratamentos com *B. barbaricus*, *B. paramycoides*, Pool e Controle, estiveram mais elevados em comparação ao tratamento com *P. jamilae* (Fig. 7 - A). Em relação ao magnésio foliar, a maior concentração foi observada no tratamento com *P. polymyxa*, os demais tratamentos (*B. barbaricus*, *B. paramycoides*, *P. jamilae* e Pool) e Controle foram superiores ao tratamento com *B. paramycoides* (Fig. 7 - B). O tratamento sob inoculação de *P. jamilae* e Pool apresentaram valores superiores para cobre foliar, seguido pela inoculação com *P. polymyxa* (Fig. 7 - C). Os valores de ferro foliar foram superiores para os tratamentos com *P. jamilae* e *P. polymyxa*, enquanto os demais tratamentos (*B. barbaricus*, *B. paramycoides* e Pool) e Controle foram superiores ao tratamento com *B. paramycoides* (Fig. 7 - D). Para os demais parâmetros avaliados não foi observado significância.

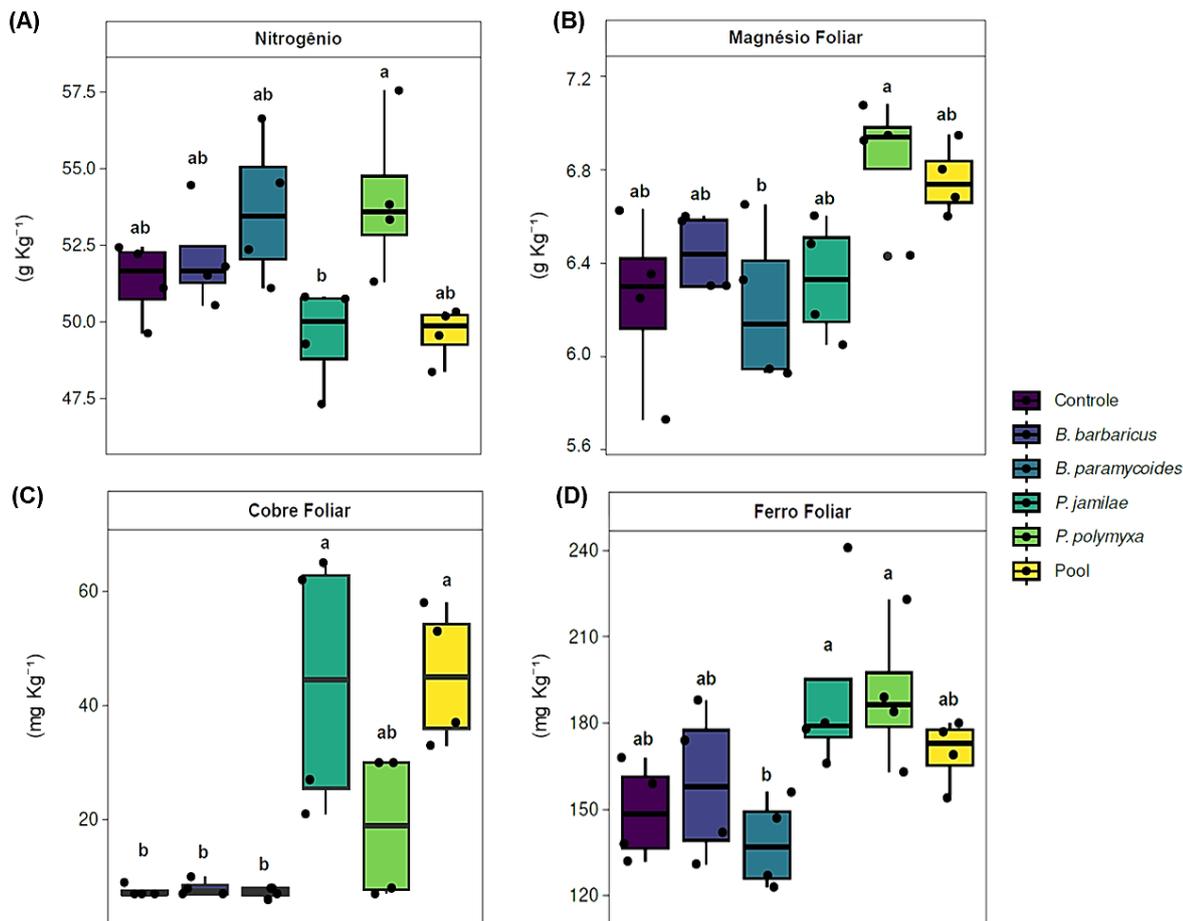


Figura 7. Variação dos teores foliares dos elementos químicos (N, Mg, Cu e Fe) nos tratamentos com diferentes isolados bacterianos e Controle, representados em boxplots. Cada boxplot (A a D) representa a variação dos seis tratamentos testados, apresentando a mediana, quartis, valores mínimo e máximo e possíveis outliers. Letras acima das caixas indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, com base na análise de variância seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.2. Variáveis de solo

5.2.1. Química do solo

Os resultados da análise química do solo demonstraram variação significativa nos teores dos elementos Enxofre (S), Acidez (pH), Matéria Orgânica (M.O.), Acidez potencial (H+Al), Saturação por bases (V%) e saturação por alumínio (m%) (Tab. S3). Foi observado que os valores de S, pH e V% foram maiores no solo *Bulk* e menores nos tratamentos com inóculo. O solo *Bulk* apresentou maiores concentrações de S, enquanto que nos tratamentos com *P. polymyxa* e Pool, os valores foram mais elevados em comparação aos demais tratamentos (*B. barbaricus*, *B. paramycoides* e *P. jamilae*) (Fig. 8 - A). Em relação ao pH do solo, o

Bulk apresentou um maior valor, enquanto as amostras de rizosfera apresentaram uma queda no pH. Também, a inoculação alterou a acidez do solo, uma vez que o tratamento Controle esteve superior aos demais (*B. barbaricus*, *B. paramycoides*, *P. jamaicae*, *P. polymyxa*), sendo o Pool o tratamento que apresentou o menor valor de pH (Fig. 8 - B). O tratamento com inoculação de *P. polymyxa* apresentou maiores níveis de M.O, enquanto que os tratamentos com *P. jamaicae*, Pool e Controle obtiveram resultados acima dos demais (*Bulk*, *B. barbaricus* e *B. paramycoides*) (Fig. 8 - C). Quanto aos níveis de H⁺Al, o tratamento com *P. polymyxa* apresentou resultados superiores, seguido pelo tratamento com *B. paramycoides*, enquanto que os demais tratamentos (*B. barbaricus*, *P. jamaicae* e Pool), Controle e *Bulk* obtiveram resultados menores (Figura 8 - D). Em relação aos valores V%, o solo *Bulk* demonstrou estar acima dos demais tratamentos, e estes apresentaram resultados maiores em relação ao tratamento com *B. paramycoides* (Fig. 8 - E). Verificou-se que todos os tratamentos com inóculo apresentaram resultados superiores ao Controle e ao solo *Bulk* em relação aos valores de m% (Fig. 8 - F). O solo levemente mais ácido nos tratamentos inoculados em relação ao Controle, é evidenciado pelas menores medidas de pH e V% em oposição à uma maior porcentagem de m%. Em termos de nutrientes, apenas a quantificação de S variou entre os tratamentos, com valores acrescidos no *Bulk*, seguido do Pool e *P. polymyxa*.

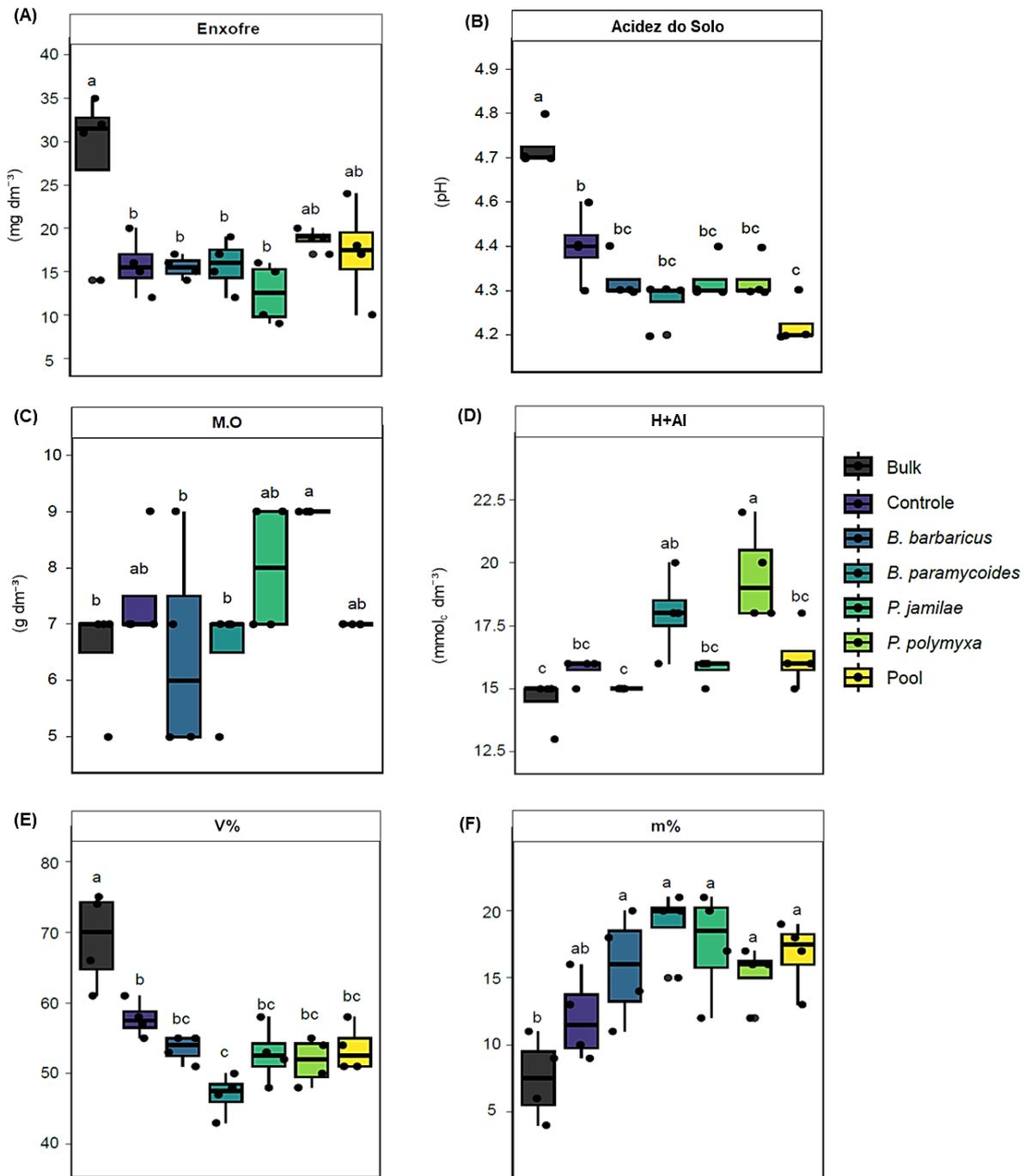


Figura 8. Variação dos teores dos resultados para variáveis do solo nos tratamentos com diferentes isolados bacterianos e Controle, representados em boxplots. Cada boxplot (A a F) representa a variação dos sete tratamentos testados, apresentando a mediana, quartis, valores mínimo e máximo e possíveis outliers. Letras acima das caixas indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, com base na análise de variância seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.2.2. Atividade enzimática do solo

A atividade enzimática do solo é uma importante medida da capacidade biológica do solo em realizar processos de ciclagem de nutrientes. Foi observada diferença estatística apenas para a enzima fosfatase ácida (Fig. 9) na interação

entre os tratamentos inoculados e não inoculados, enquanto que para as enzimas β -glucosidase e Arilsulfatase não foram observadas diferenças significativas (Tab. S4). Entre os tratamentos inoculados com as bactérias *B. paramycoides*, *P. jamilae* e o Controle, foram obtidos os melhores resultados para a fosfatase ácida, seguidos pelos tratamentos com *B. barbaricus*, *P. polymyxa* e Pool, apresentando resultados superiores aos do solo *Bulk*.

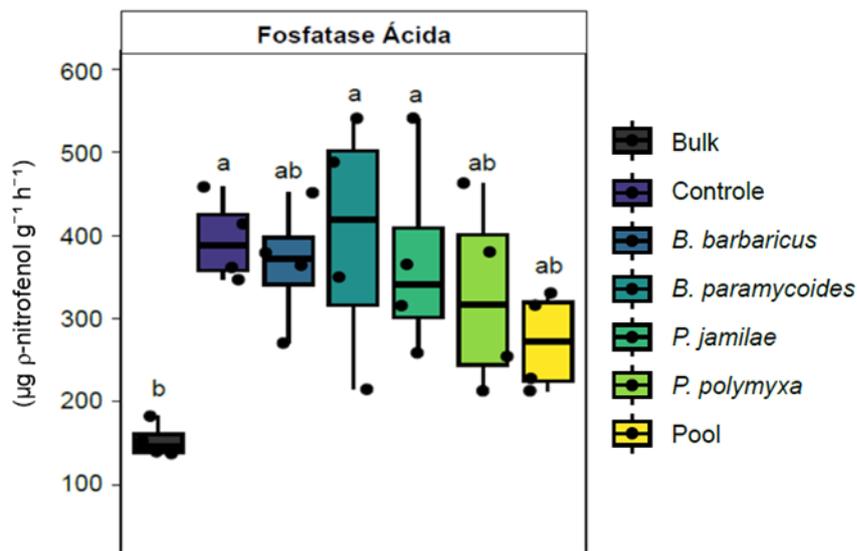


Figura 9. Variação dos valores de fosfatase ácida nos tratamentos com diferentes isolados bacterianos e Controle, representados em boxplots. O boxplot representa a variação dos sete tratamentos testados, apresentando a mediana, quartis, valores mínimo e máximo e possíveis outliers. Letras acima das caixas indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, com base na análise de variância seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.3. Micorrização em raízes

A simbiose entre as raízes das plantas e os fungos micorrízicos é um fenômeno muito importante para a nutrição e desenvolvimento vegetal. A presença de micorrizas nas raízes foi confirmada por meio da observação microscópica das estruturas micorrízicas (hifas) coradas (Fig. 10 - A e 10 - B) em todas as plantas submetidas aos tratamentos e ao Controle. Entre os tratamentos avaliados, o tratamento com a inoculação da bactéria *B. paramycoides* obteve a maior taxa de micorrização, seguido pelo grupo Controle (Fig. 10 - C). Por outro lado, os demais tratamentos, compostos pelas bactérias *B. barbaricus*, *P. jamilae*, *P. polymyxa* e Pool, apresentaram uma taxa de micorrização inferior.

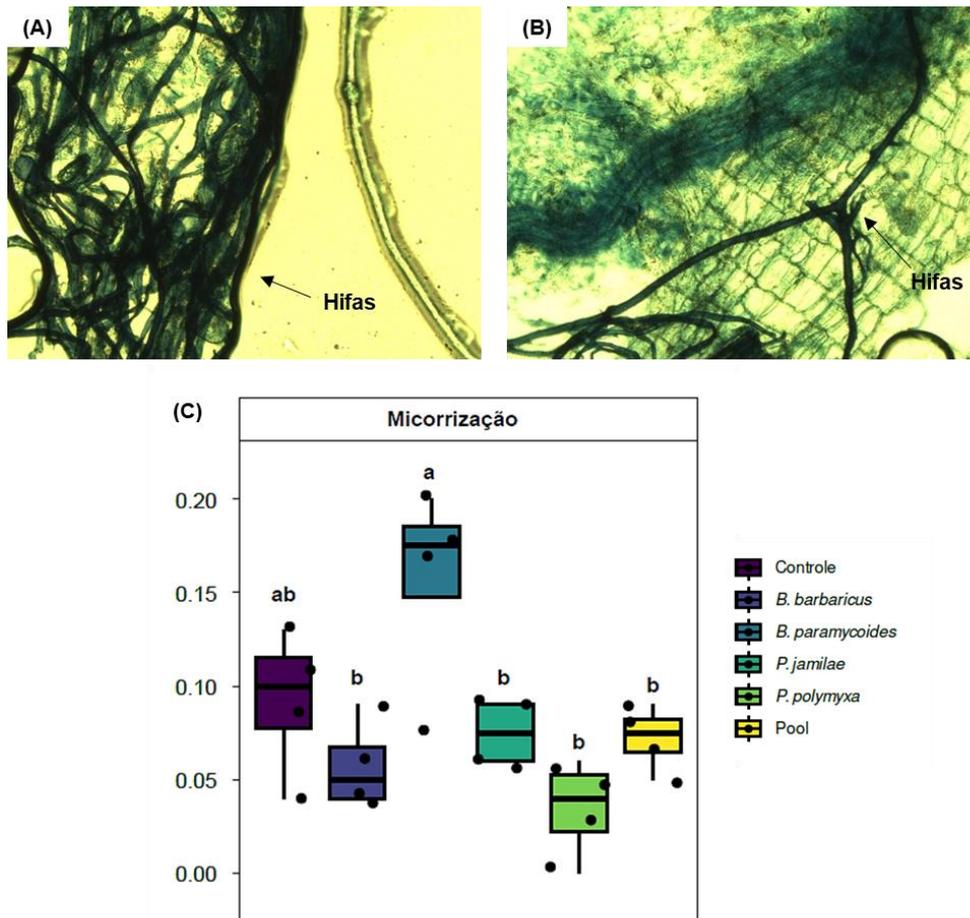


Figura 10. Fotomicrografias de estruturas fúngicas (hifas) presentes em raízes finas de plantas de feijão inoculadas. (A) e (B) Raiz com hifas micorrízicas, (C) Variação das taxas de micorrização nos tratamentos com diferentes isolados bacterianos e Controle, representados em boxplots. O boxplot representa a variação dos sete tratamentos testados, apresentando a mediana, quartis, valores mínimo e máximo e possíveis outliers. Letras acima das caixas indicam diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, com base na análise de variância seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Atividade da enzima fosfatase ácida do solo para tratamentos com inoculação, Controle e *Bulk*.

5.4. Expressão gênica de folhas

Neste estudo, foi avaliada a expressão gênica relativa dos genes CAB, GST e WRKY em folhas das plantas submetidas aos tratamentos de inoculação com diferentes isolados. O resultado obtido revelou repressão (*down regulation*) dos genes CAB e GST em todos os tratamentos, enquanto que para o gene WRKY, houve repressão nos tratamentos Pool, *B. barbaricus* e *P. polymyxa*, e expressão positiva (*up-regulation*) nos tratamentos *B. paramycooides* e *P. jamilae* em relação ao tratamento Controle, sem inoculação de bactérias. No entanto, devido aos maiores desvios nas replicatas biológicas destes dois tratamentos (*B. paramycooides* e *P. jamilae*), não houve diferença estatística significativa.

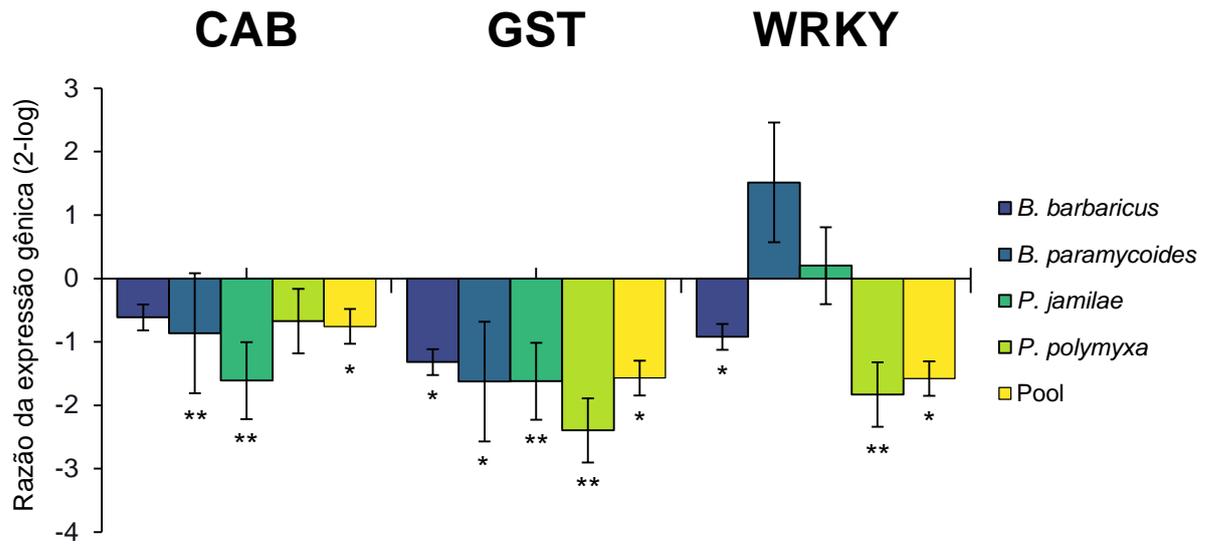


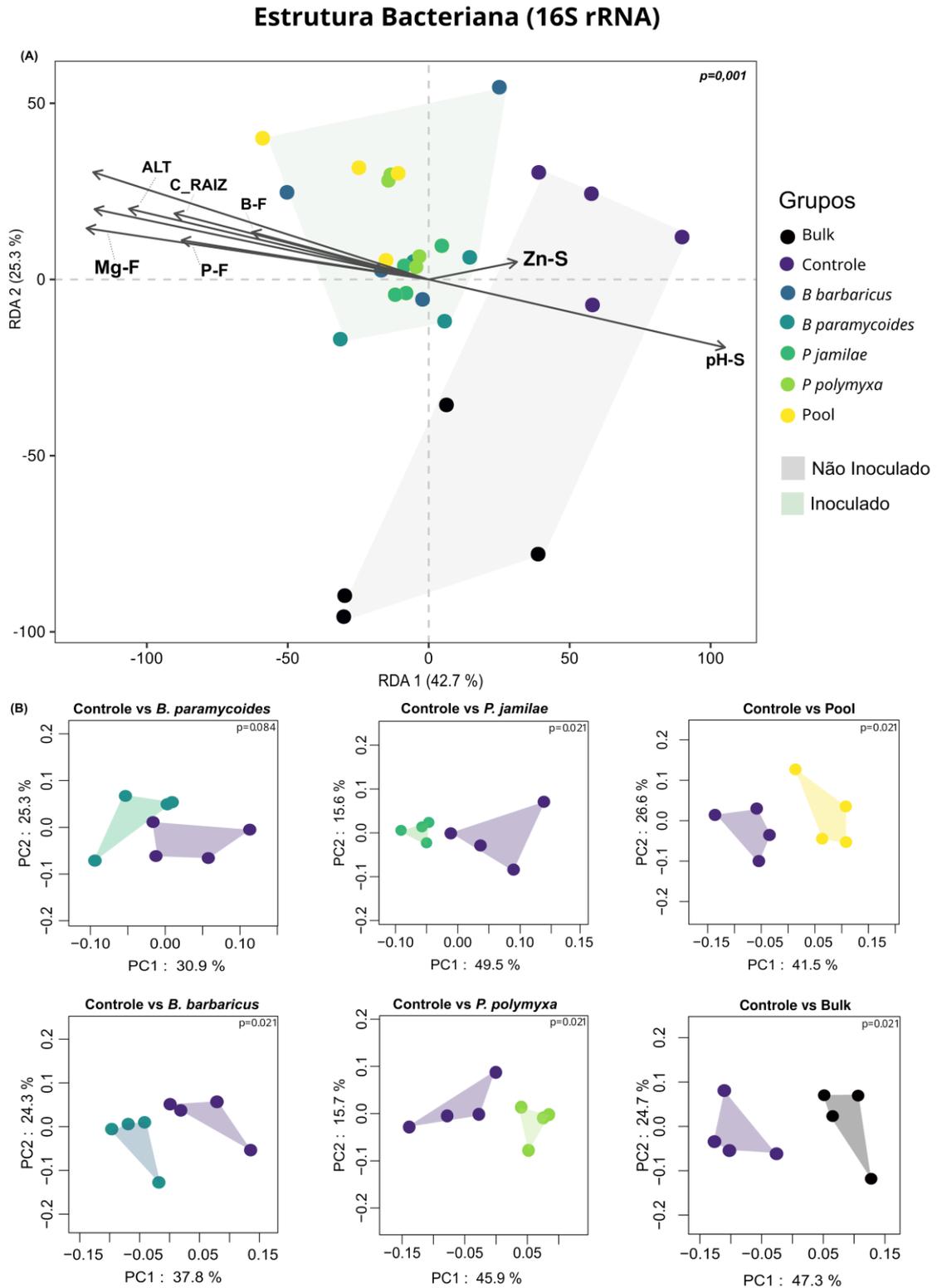
Figura 11. Análise dos níveis de expressão gênica de três genes em tecidos foliares de plantas de feijão tratadas com inoculação de diferentes bactérias em relação às plantas Controle não inoculadas. Valores de expressão foram obtidos usando o programa REST 2002. Cada tratamento consistiu de duas a três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas. O gene de referência utilizado foi a Actina. A linha com valor 1 corresponde ao tratamento Controle. (Genes reprimidos ficam abaixo do eixo e os expressos, acima).

5.5. Análise de microbioma

5.5.1. Estrutura da comunidade microbiana

A análise de redundância (RDA) foi utilizada para avaliar a estrutura taxonômica das comunidades bacterianas (16S rRNA) e sua relação com parâmetros de crescimento das plantas e propriedades do solo (Fig. 12 - A). Os eixos 1 e 2 da RDA (RDA1 e RDA2) explicaram 68% da variação dos dados e foram encontradas diferenças entre os grupos inoculado e não inoculado. Dentro do grupo não inoculado, também foram encontradas diferenças entre o Bulk soil e a rizosfera do tratamento Controle. Além disso, verificou-se que a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera não inoculada correlacionou-se fortemente com o pH do solo e com o Zinco do solo. Por outro lado, a comunidade bacteriana dos tratamentos sob inoculação correlacionou-se positivamente com a altura da planta, comprimento de raiz, magnésio, boro e fósforo foliares. Para uma análise mais criteriosa, comparamos em separado cada tratamento inoculado com o Controle, utilizando a análise de coordenadas principais (PCoA) com distancia Bray – Curtis (Fig. 12 – B), que mostrou uma separação visível entre as amostras inoculadas e não inoculadas

(Controle vs *P. jamaicensis*, Pool, *B. barbaricus*, *P. polymyxa* e Bulk) ($p < 0,05$), indicando um efeito significativo da inoculação sobre a comunidade bacteriana da rizosfera. No entanto, houve uma proximidade entre o Controle e *B. paramycooides* ($p = 0,084$). Esses resultados destacam a importância da inoculação na promoção do crescimento das plantas e na modificação da estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera.



A análise da comunidade fúngica (ITS) do solo é importante para compreender o papel desses micro-organismos na rizosfera. A análise RDA mostrou que a introdução de inoculantes teve menor efeito na composição da comunidade fúngica do solo em comparação com a comunidade bacteriana (16S). O primeiro e segundo eixos da RDA (RDA1 e RDA2) explicaram 76,6% da variação dos dados. A comparação entre o *Bulk* e a rizosfera do Controle mostrou pouca diferença na composição da comunidade fúngica do solo. Além disso, os tratamentos inoculados e não inoculados também apresentaram pouca diferença em relação ao Controle, como mostrado na Fig. 13 - A. No geral, o pH do solo teve uma forte influência na estrutura fúngica dos tratamentos inoculados e não inoculados. Para uma análise mais criteriosa, comparamos em separado cada tratamento inoculado com o Controle, utilizando a análise de coordenadas principais (PCoA) com distancia Bray – Curtis (Fig. 13 – B). Alguns inoculantes, como *B. paramycoides*, *B. barbaricus*, Pool e *Bulk*, não apresentaram diferenças significativas em relação ao Controle ($p > 0,05$). No entanto, *P. jamaicae* e *P. polymyxa* apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na comunidade de fungos em relação ao Controle. Portanto, os resultados sugerem que a introdução destes inoculantes não teve um efeito significativo na composição da comunidade fúngica do solo da rizosfera. Além disso, a PCoA mostrou poucas diferenças entre os tratamentos inoculados e não inoculados, exceto para *P. jamaicae* e *P. polymyxa*, que apresentaram diferenças significativas na comunidade de fungos em relação ao controle.

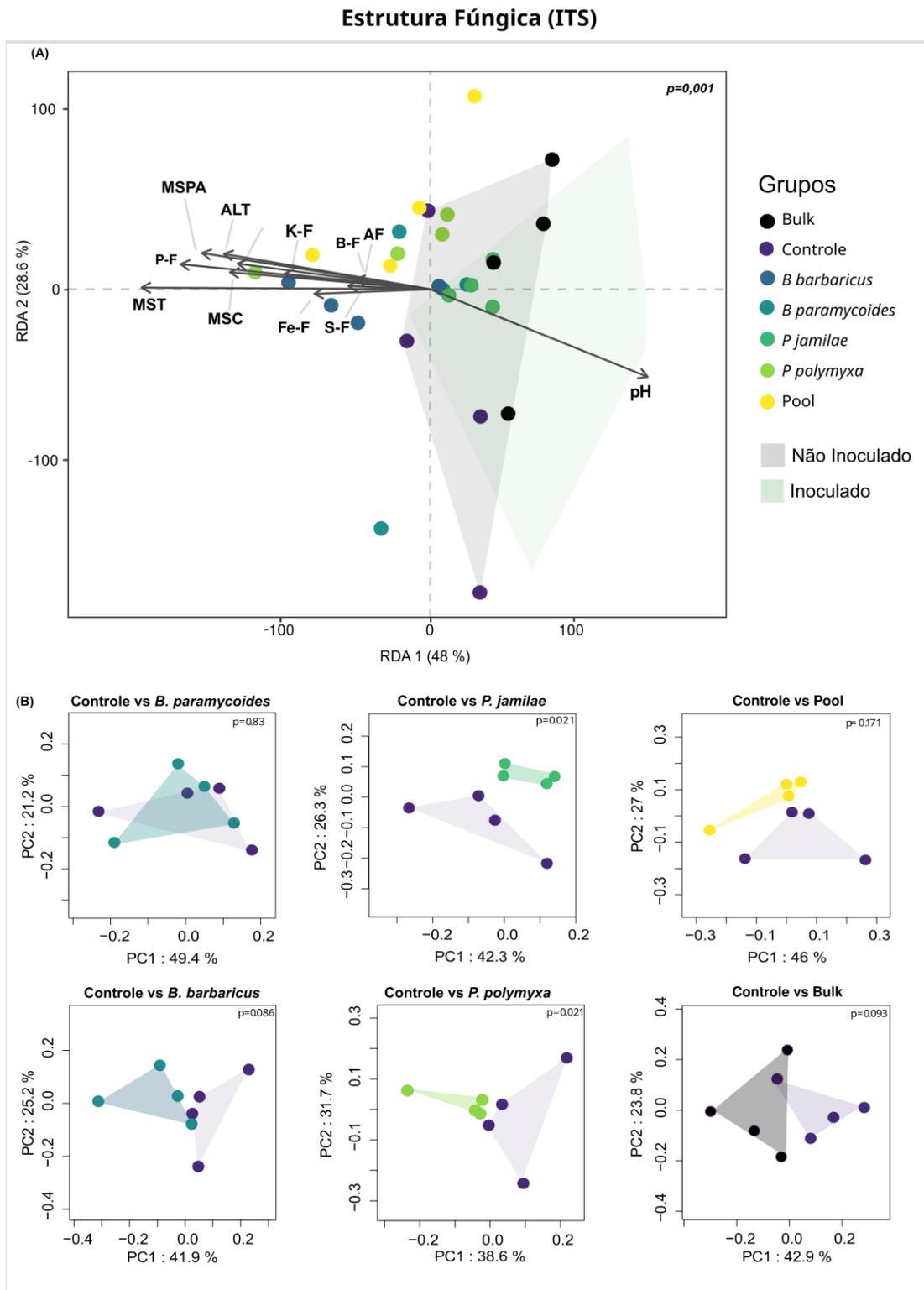


Figura 13. Representação gráfica da análise de redundância (RDA) em biplot, com os círculos representando as amostras e as setas indicando as variáveis relacionadas à estrutura da comunidade microbiana (A). Análise de coordenadas principais (PCoA) para cada interseção entre os tratamentos, mostrando a separação das amostras inoculadas e não inoculadas. ALT: altura; MST: massa seca total; MSPA: massa seca de parte aérea; AF: área foliar; MSC: massa seca de caule; K-F: potássio foliar; Fe-F: ferro foliar; P-F: fósforo foliar; S-F: enxofre foliar; B-F: boro foliar; pH-S: acidez do solo.

5.5.2. Composição da comunidade microbiana

A composição da comunidade bacteriana é um fator importante a ser considerado no estudo da interação entre as plantas e os micro-organismos do solo. Nesse contexto, a análise da diversidade e riqueza dos filos bacterianos pode fornecer informações valiosas sobre os efeitos da inoculação de bactérias na rizosfera das plantas. Em nível de filo, a composição da comunidade bacteriana foi muito semelhante entre os tratamentos que receberam a aplicação de inóculo bacteriano quando comparadas ao Controle e *Bulk* (Fig.14 - A). Os Filos Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Acidobacteria foram os mais abundantes, representando juntos mais de 80% da comunidade. Com relação ao filo Actinobacteria, observou-se um padrão distinto nos tratamentos, com maior abundância na rizosfera inoculada com *B. barbaricus*, Pool e *P. polymyxa*. Por outro lado, o filo Proteobacteria foi mais abundante na rizosfera do Controle. Em relação a riqueza (número de OTUs), constatou-se que o solo *Bulk* apresentou uma maior riqueza, seguido pela rizosfera do Controle, *B. barbaricus*, *P. jamaicae*, *P. polymyxa* e Pool, quando comparados ao tratamento sob inoculação de *B. paramycooides* (Fig. 14 - B). O índice de diversidade *Shannon* foi maior no solo *Bulk* e nas rizosferas com inoculação, quando comparado à rizosfera não inoculada (Fig. 14 - C).

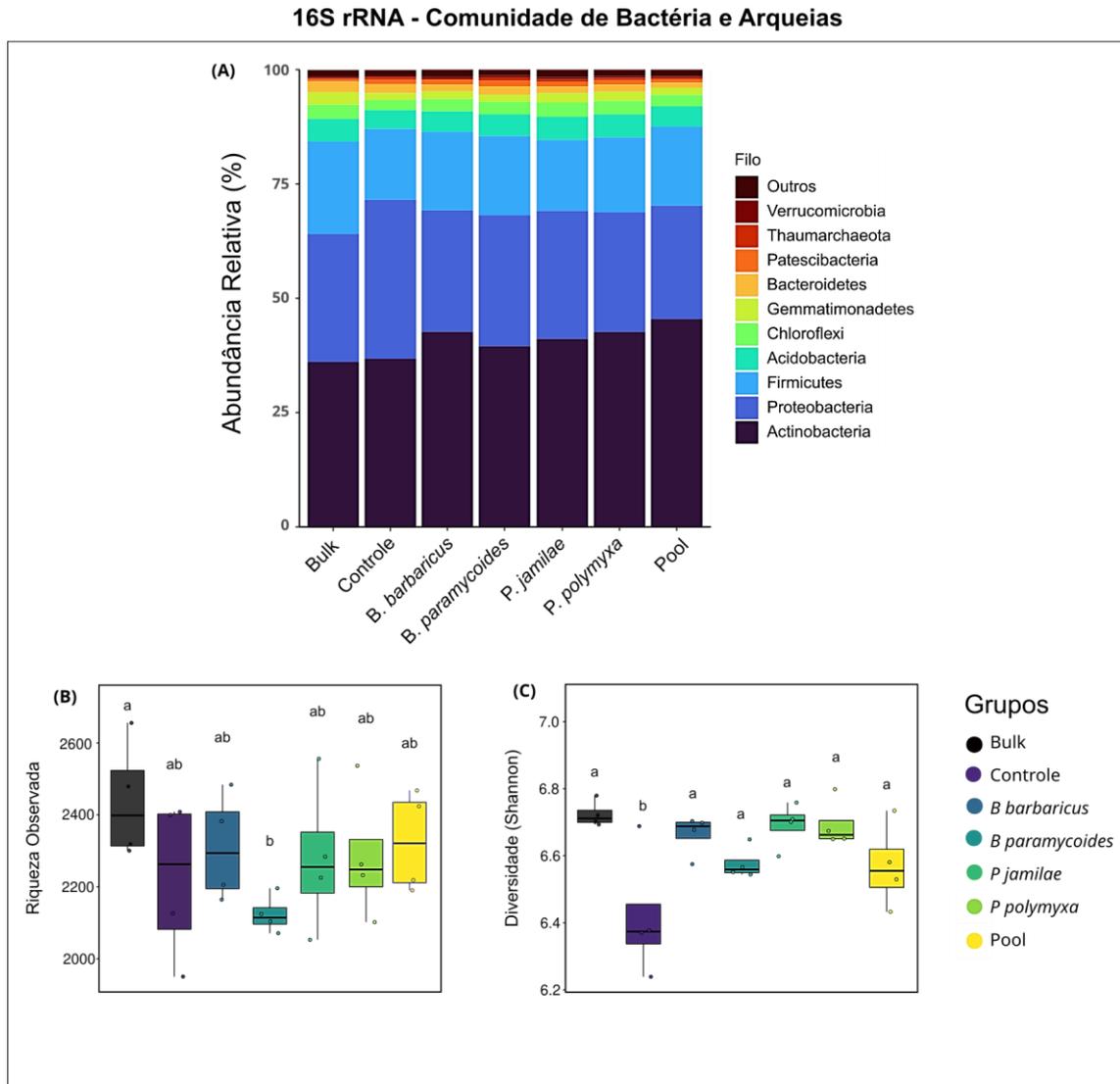


Figura 14. (A) Composição taxonômica microbiana baseada no sequenciamento do 16S rRNA no nível do filo em solo de rizosfera de feijão inoculado e não inoculado. Métricas de diversidade alfa expressas por (B) riqueza microbiana (OTUs) observadas e (C) índice de diversidade de Shannon sob solo de rizosfera de feijão. Os tratamentos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (5%).

A comunidade fúngica do solo é um importante componente da rizosfera e pode afetar o desenvolvimento das plantas. A composição da comunidade fúngica apresentou diferenças entre os tratamentos e o *Bulk* (Fig. 15 – A). Os Filos Ascomycota, Basidiomycota e Chytridiomycota foram os mais abundantes, representando juntos mais de 90% da composição fúngica. Com relação ao filo Ascomycota, observou-se maior abundância no solo *Bulk*, Controle, *P. jamilae* e *B. paramycooides*. Por outro lado, o filo Basidiomycota foi mais abundante na rizosfera sob inoculação de *B. barbaricus*, *P. polymyxa* e Pool. Já o filo Chytridiomycota teve maior representatividade na rizosfera sob inoculação de *B. barbaricus*. Os demais

filos (Rozellomycota, Mucoromycota e outros) foram menos abundantes em todos os tratamentos com ou sem inoculação. Em relação a riqueza (OTUs), verificou-se que a rizosfera do tratamento com *P. polymyxa* apresentou o maior número de OTUs, seguido pela rizosfera do *P. jamaicae*, quando comparadas aos demais tratamentos (Fig. 15 - B). Além disso, o Bulk, o Controle e os tratamentos com *B. barbaricus* e *B. paramycoides* foram superiores ao Pool, sendo este detentor do menor resultado. No que se refere ao índice de diversidade *Shannon*, observou-se que solo inoculado com *P. polymyxa* apresentou a maior diversidade, enquanto os solos inoculados com *B. paramycoides*, *P. jamaicae* e o solo do Controle foram maiores que o Bulk e *B. barbaricus* e Pool (Fig. 15 - C).

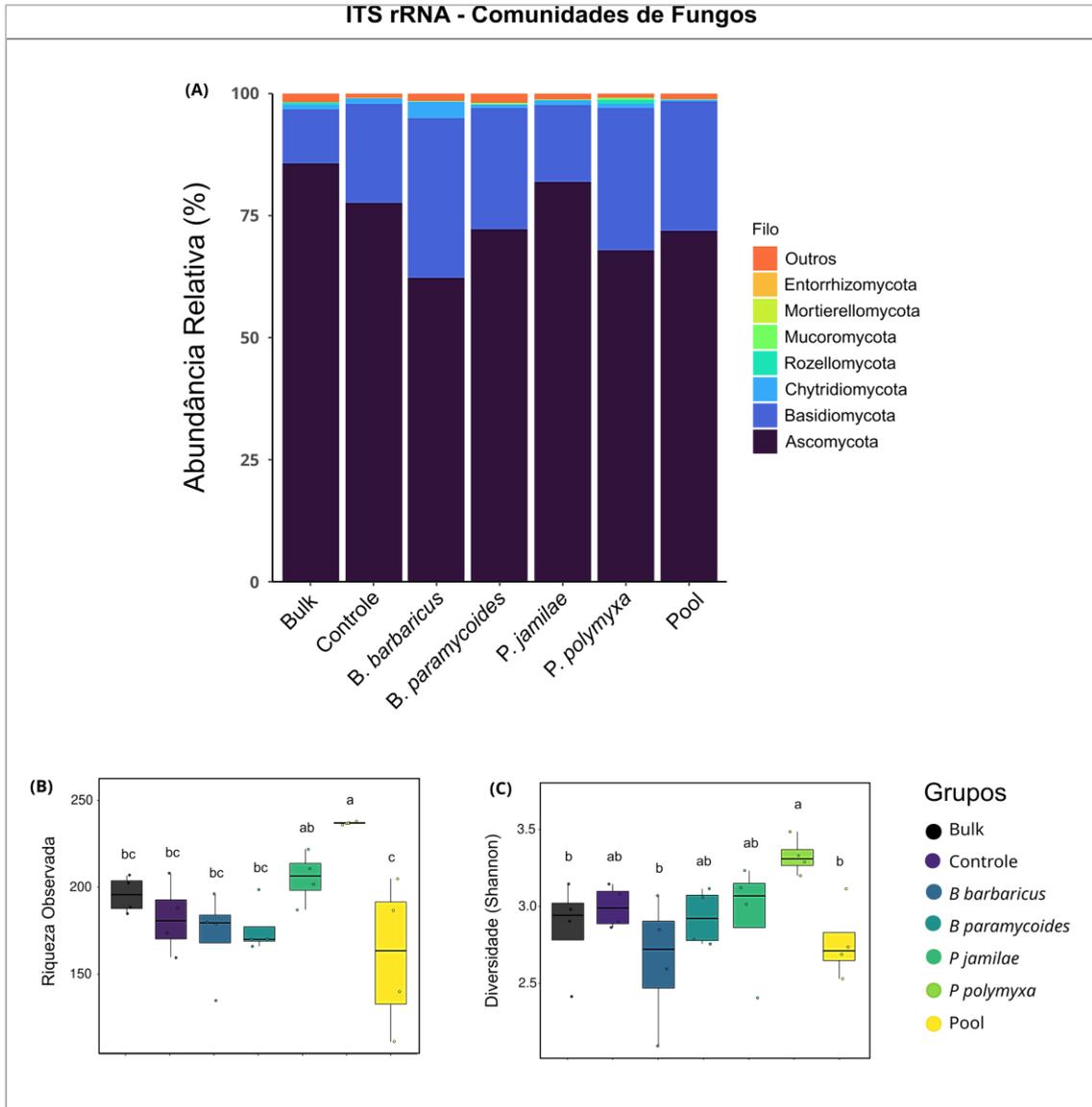


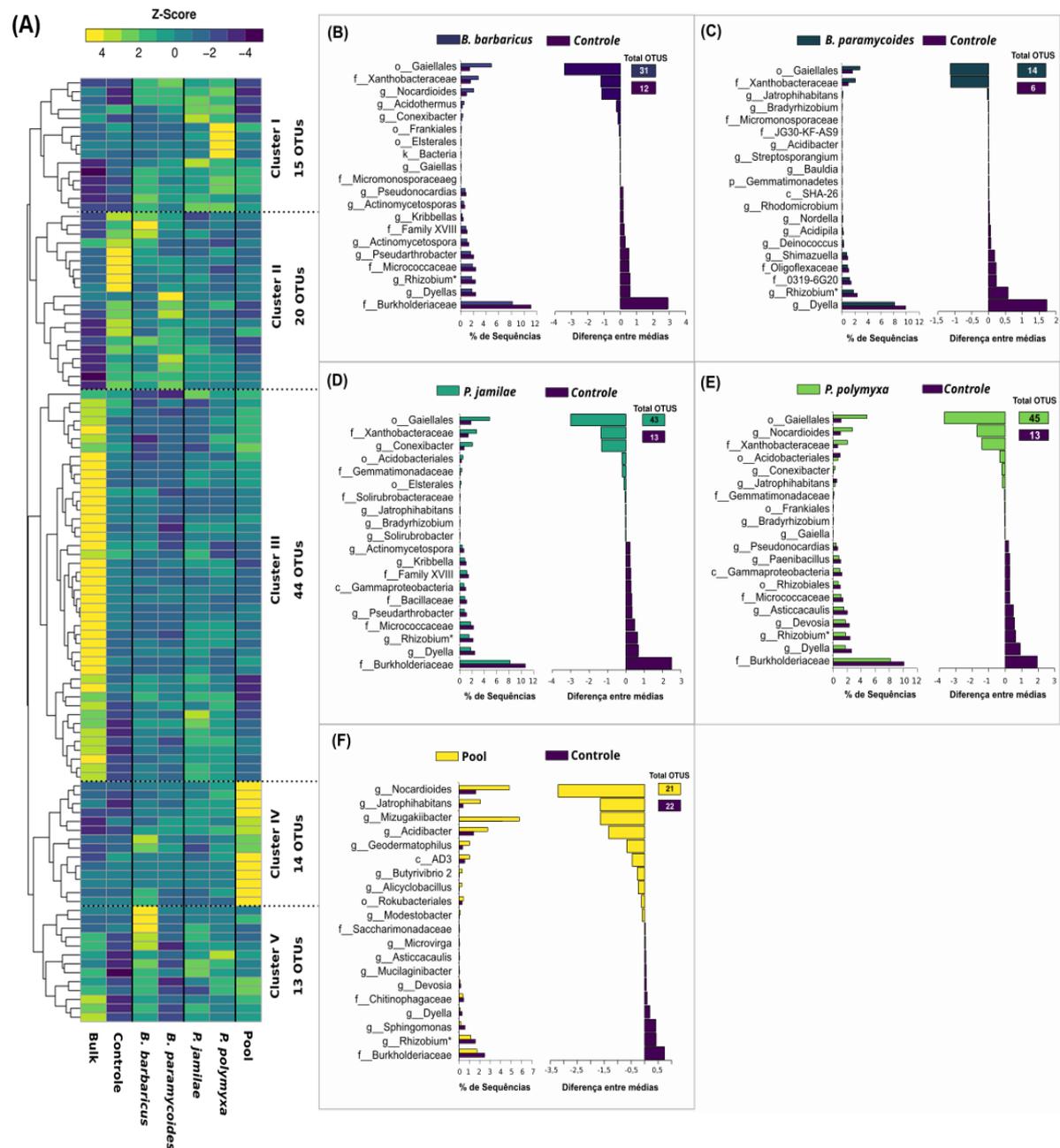
Figura 15. Composição taxonômica fungica baseada no sequenciamento do ITS no nível do filo em solo de rizosfera de feijão inoculado. Métricas de diversidade alfa expressas por (B) riqueza microbiana (OTUs) observadas e (C) índice de diversidade de Shannon do solo de rizosfera de feijão. Os tratamentos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (5%).

Com o objetivo de verificar diferenças significativas nas abundâncias taxonômicas, uma análise de abundância taxonômica diferencial foi realizada a nível de OTU. Os resultados obtidos mostraram diferenças específicas nas abundâncias bacterianas entre o solo Bulk e os tratamentos com e sem inoculação de bactérias na rizosfera (Fig. 16 - A). Os resultados representados graficamente em heatmap revelaram que a inoculação bacteriana teve influência significativa na abundância de diferentes grupos bacterianos, como representado no agrupamento de diferentes *Clusters*. Essa representação inicialmente tem como objetivo apenas avaliar se

existem diferenças entre os tratamentos, mostrando o aumento ou diminuição da abundância de OTUs. Por exemplo, o *Cluster* III é composto por OTUs significativamente mais abundantes no solo *Bulk*. Foi possível observar uma diminuição de alguns grupos microbianos no *Cluster* III e um aumento no *Cluster* II para o Controle (rizosfera não inoculada) em comparação com o *Bulk*. Isso sugere que o efeito rizosférico pode modular as relações microbianas na rizosfera, mudando a composição da comunidade por meio da alteração da abundância de grupos microbianos específicos. Além disso, a inoculação com diferentes espécies bacterianas levou a um aumento na abundância de OTUs em diferentes *Clusters*.

Para uma análise mais detalhada, conduzimos uma comparação pairwise entre o Controle e os tratamentos inoculados, o que permitiu avaliar os grupos taxonômicos que aumentam ou diminuem significativamente com a inoculação. A comparação entre as comunidades bacterianas sob inoculação de *B. barbaricus*, *B. paramycoides*, *P. jambilae* e *P. polymyxa* revelou um aumento na abundância da ordem Gaiellales e da família Xhantobacteraceae. Todos os tratamentos com inoculação reduziram a abundância do gênero *Rhizobium** e do gênero *Dyella* em relação ao Controle. A espécie *B. paramycoides* foi o único tratamento que não apresentou a família Burkholderiaceae em suas sequências em comparação com o Controle (Fig. 17 – B). Destaca-se a presença comum dos grupos *Bradyrhizobium*, Acidobacteriales e Gemmatimonadaceae nas comunidades bacterianas rizosféricas inoculadas com *P. jambilae* e *P. polymyxa*.

A comparação entre os tratamentos com inoculação revelou um perfil diferente entre a aplicação de uma única estirpe e um consórcio bacteriano, com o Pool apresentando abundância de diferentes organismos, sendo o gênero *Nocardioides*, *Jatrophihabitans*, *Mizugakiibacter* e *Acidibacter* os mais abundantes (Fig. 17 – F). Em resumo, os resultados sugerem que a aplicação de bactérias na rizosfera pode modular a abundância de OTUs no microbioma. Além disso, diferentes espécies bacterianas apresentaram um efeito específico na comunidade microbiana rizosférica. Esses resultados são importantes para a compreensão dos processos biológicos envolvidos nas relações entre as plantas e os microorganismos presentes na rizosfera.



*g__Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium

Figura 16. (A) Heatmap da abundância relativa e prevalência do microbioma de acordo com os diferentes tratamentos. A legenda de cores e a escala são fornecidas na figura. Composição bacteriana da rizosfera com base no gene 16S rRNA. A chave de cores relaciona as cores do mapa de calor ao escore padrão (z score), ou seja, a desvio da média da linha em unidades de desvio padrão acima ou abaixo da média. (B, C, D, E e F) Abundância diferencial entre os tratamentos e o Controle, comparados pelo teste two-sided Welch's t-test, utilizando o STAMP ($P < 0,05$).

Ao considerar as diferenças de abundâncias fúngicas entre o solo *Bulk* e os tratamentos com e sem inoculação observou-se que a inoculação das cepas bacterianas gerou um efeito significativo na abundância de diferentes OTUs, como demonstrado na formação dos diferentes *Clusters* na Figura 17 - A. Porém, essa

diferença foi menor em comparação com a comunidade bacteriana. O *Cluster I* mostra a redução de algumas OTUs para o Controle (rizosfera não inoculada) e para os demais tratamentos sob inoculação (*B. barbaricus*, *B. paramycoides*, *P. jamilae*, *P. polymyxa* e Pool) em comparação com o Bulk soil, que era mais abundante. No *Cluster II* observa-se um aumento de algumas OTUs quando aplicado *P. jamilae*, *P. polymyxa* e Pool, o mesmo ocorre no *Cluster III* quando aplicado *P. polymyxa*, ocorrendo aumento de determinadas OTUs, em comparação aos demais tratamentos e Controle. Além do efeito rizosférico da planta, a inoculação com diferentes espécies bacterianas também modulou a abundância de OTUs específicas em diferentes clusters na comunidade de fungos do solo na rizosfera.

A comparação pairwise entre Controle e rizosfera inoculada com *B. barbaricus* revelou uma redução na abundância do gênero *Saitozymas*, enquanto, a inoculação com *B. paramycoides* aumentou a abundância deste gênero (Fig. 18 – B e C), e reduziu a abundância dos gêneros *Lycoperdon*, *Dimorphiseta* e *Phialocephala* (Fig. 18 – C). Foi possível observar a presença comum dos gêneros *Dimorphiseta* e *Penicillium* na comunidade fungica das rizosferas inoculadas com *P. jamilae* e *P. polymyxa*. Ressalta-se que a cepa *P. jamilae* reduziu o gênero *Neocosmospora*, enquanto a *P. polymyxa* aumentou sua abundância. Ao comparar *P. jamilae* e Controle, observa-se que a cepa aumentou a abundância dos gêneros *Exophiala*, *Rhizopus*, *Candida*, *Westerdykella* (Fig. 18 – D). O tratamento com *P. polymyxa* aumentou a abundância dos gêneros *Acremonium*, *Clonostachys*, *Cladosporium* e *Gibberella* (Fig. 18 – E). Por fim, o Pool aumentou a abundância de certos gêneros como *Thichoderma* e *Clonostachys* (Fig. 18 – F). Em síntese, esses resultados indicam que diferentes espécies bacterianas utilizadas como inoculante afetam diferentes grupos microbianos e, conseqüentemente, processos biológicos envolvidos entre as plantas e os micro-organismos presentes na rizosfera.

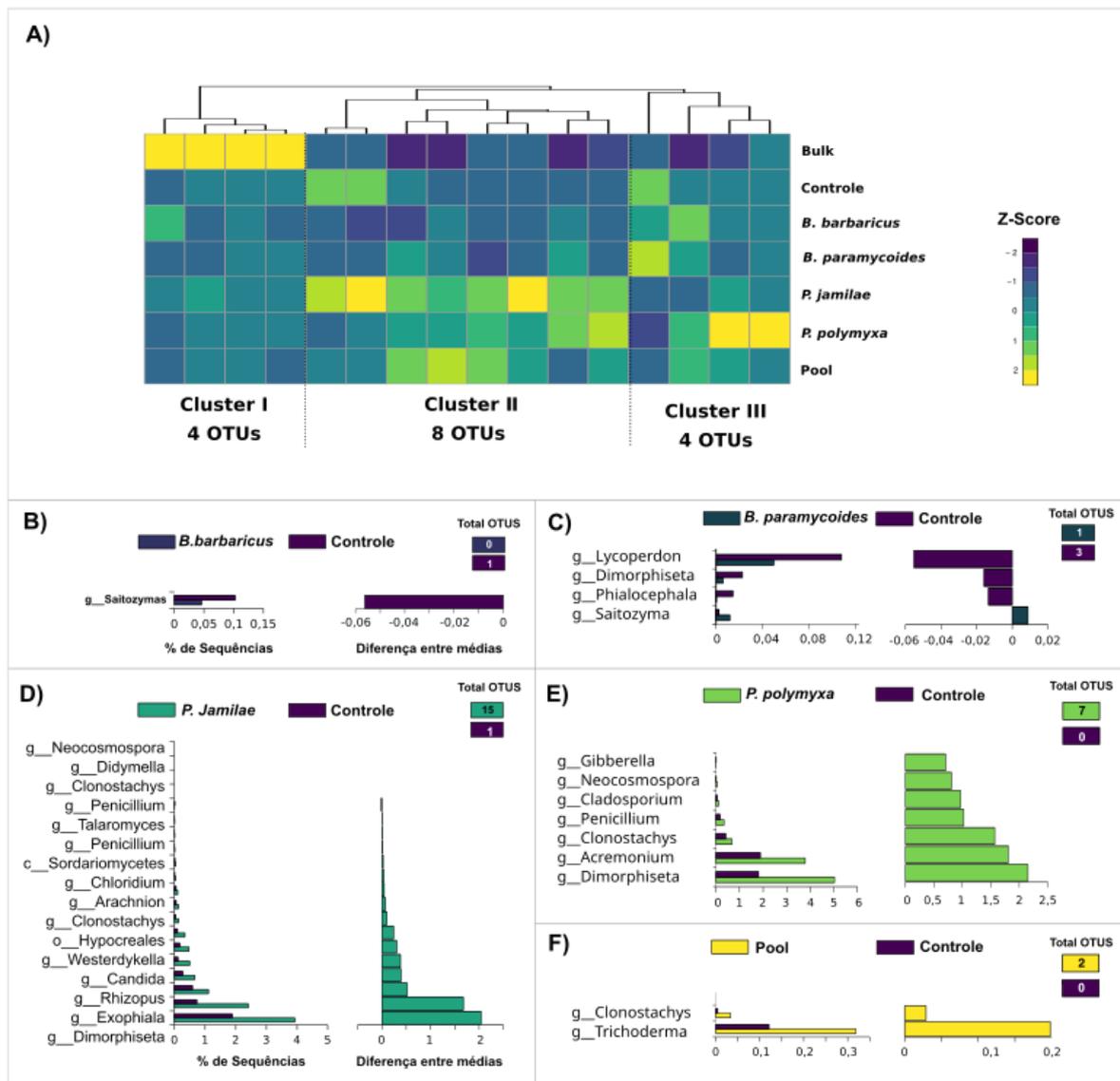


Figura 17. Composição fúngica em solo de rizosfera de feijão com base no gene ITS. (A) Heatmap mostra a abundância diferencial de gêneros e ordem entre os tratamentos. A chave de cores relaciona as cores do mapa de calor ao escore padrão (escore z), ou seja, a desvio da média da linha em unidades de desvio padrão acima ou abaixo da média. Os círculos são proporcionais à abundância relativa de cada filo em todas as amostras. (B, C, D, E e F) Abundância diferencial entre os tratamentos e o Controle, construído no STAMP ($P < 0,05$).

5.5.3. Ocupação do nicho

A ocupação de nicho é um importante aspecto da dinâmica da comunidade microbiana da rizosfera. Nessa análise foi possível observar que a inoculação de bactérias induziu uma variação na proporção de especialistas e generalistas entre os tratamentos, conforme apresentado na Figura 18. Observou-se que as espécies muito raras e generalistas superaram os especialistas. Na comparação entre o Controle e *B. barbaricus*, 29% das espécies bacterianas foram classificadas como

generalistas, enquanto 8% foram identificadas como especialistas no Controle, em contraste com 10% na rizosfera de *B. barbaricus* (Fig. 18 - A). Na comparação entre Controle e *B. paramycoides*, constatou-se que 32,1% das espécies eram generalistas, e 8,7% eram especialistas no Controle, enquanto na rizosfera de *B. paramycoides*, a proporção de especialistas foi de 9,3% (Fig. 18 - B). Em relação a Controle e *P. jambilae*, cerca de 32,7% das espécies foram classificadas como generalistas, com 7,6% sendo especialistas para o Controle, em comparação com 9,1% para *P. jambilae* (Fig. 18 - C). Na comparação entre Controle e *P. polymyxa*, 32,1% foram classificados como generalistas, com 8% sendo especialistas para o Controle e 9,9% para *P. polymyxa* (Fig. 18 - D). Por fim, a comparação entre Controle e Pool apresentou cerca de 28,9% de espécies generalistas, sendo esta a menor proporção entre os tratamentos inoculados, com 8% de espécies especialistas no Controle, em comparação com 10% no Pool (Fig. 18 - E). Em todos os tratamentos, a proporção de espécies muito raras foi superior a 50%. De maneira geral, a análise de ocupação de nicho mostrou que a inoculação aumentou a porcentagem de especialistas na rizosfera, de 0,6% até 2% de aumento, dependendo da espécie inoculada.

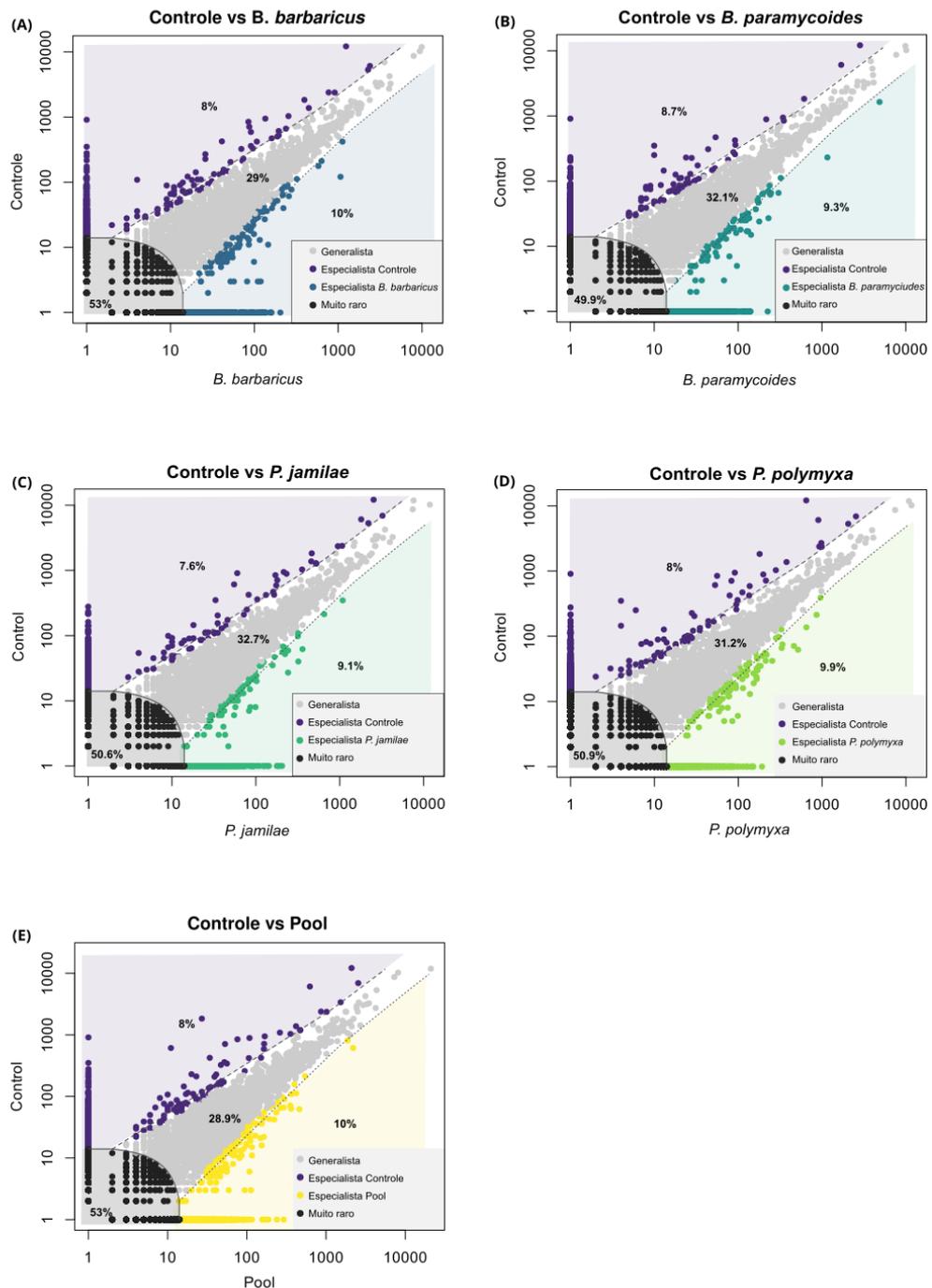


Figura 18. Análise de ocupação de nicho com base no método de classificação multinomial de espécies (CLAM) nicho com base em comparações em pares. Espécies especialistas (roxo, tons de azul, tons de verde e amarelo), generalistas (cinza) e muito raras (círculos pretos) são indicadas por suas porcentagens para cada tratamento.

5.5.4. Análise de network

A análise de rede de co-ocorrência (*networks*) tem sido amplamente utilizada na ecologia microbiana para compreender as interações entre micro-organismos

presentes na rizosfera e suas implicações na dinâmica e funcionamento da comunidade. Neste estudo, dados de abundância de micro-organismos (16S rRNA e ITS) foram utilizados para investigar a influência de diferentes isolados utilizados como inóculos na complexidade das interações microbianas na rizosfera (Figura 19). Os resultados das *networks* permitiram observar que a estrutura de correlações no tratamento *Bulk* foi mais complexa (nodes = 550, edges = 2.539) em relação ao Controle (nodes = 425, edges = 1.438), sugerindo que a rizosfera seleciona seus micro-organismos, resultando em uma diminuição das interações e complexidade. No entanto, observou-se que a inoculação das diferentes cepas bacterianas aumentou a complexidade das interações microbianas em comparação ao Controle, o que sugere uma alteração nas relações microbianas quando é adicionado um inoculante. O tratamento Pool (nodes = 495, edges = 2.358) seguido do tratamento com *P. polymyxa* (nodes = 478, edges = 2.210) foram os tratamentos que obtiveram os maiores valores de nodes e edges, indicando assim uma maior complexidade de interações. Com relação aos tratamentos com *B. barbaricus* (nodes = 522, edges = 2.014), *B. paramycoides* (nodes = 482, edges = 1.875) e *P. jamilae* (nodes = 469, edges = 1.594), foi notado um aumento menos expressivo de relações em comparação ao Pool e *P. polymyxa*. Portanto, os resultados presentes sugerem que a inoculação de uma única cepa bacteriana ou de um consórcio (Pool) podem aumentar significativamente a complexidade das interações microbianas na rizosfera, com possíveis implicações na dinâmica e funcionalidade da comunidade.

Outro fator interessante observado nos resultados de *networks* foi a proporção de interação entre fungos e bactérias, seja dentro do domínio e também a interação entre os dois domínios. Embora não tenha sido observado grandes mudanças na proporção de fungos e bactérias, as relações entre os dois domínios mudaram expressivamente em alguns inoculantes. Por exemplo, a inoculação de *P. jamilae*, *P. polymyxa* e do Pool diminuíram as proporções de relações entre bactéria e bactéria (48.96%, 59.63%, 53.15%). Por outro lado, as relações entre fungos aumentam no tratamento com o isolado *P. jamilae*, e reduziram nos tratamentos *B. paramycoides*, *P. polymyxa* e Pool (4.69%, 4.69%, 4.45%). Por fim, observou-se que a relação entre fungos e bactérias foi modificada substancialmente apenas no tratamento *P. jamilae*. Esses resultados indicam que a inoculação de diferentes espécies de isolados afetam não apenas a estrutura e complexidade das relações, mas também o tipo interações entre diferentes domínios taxonômicos.

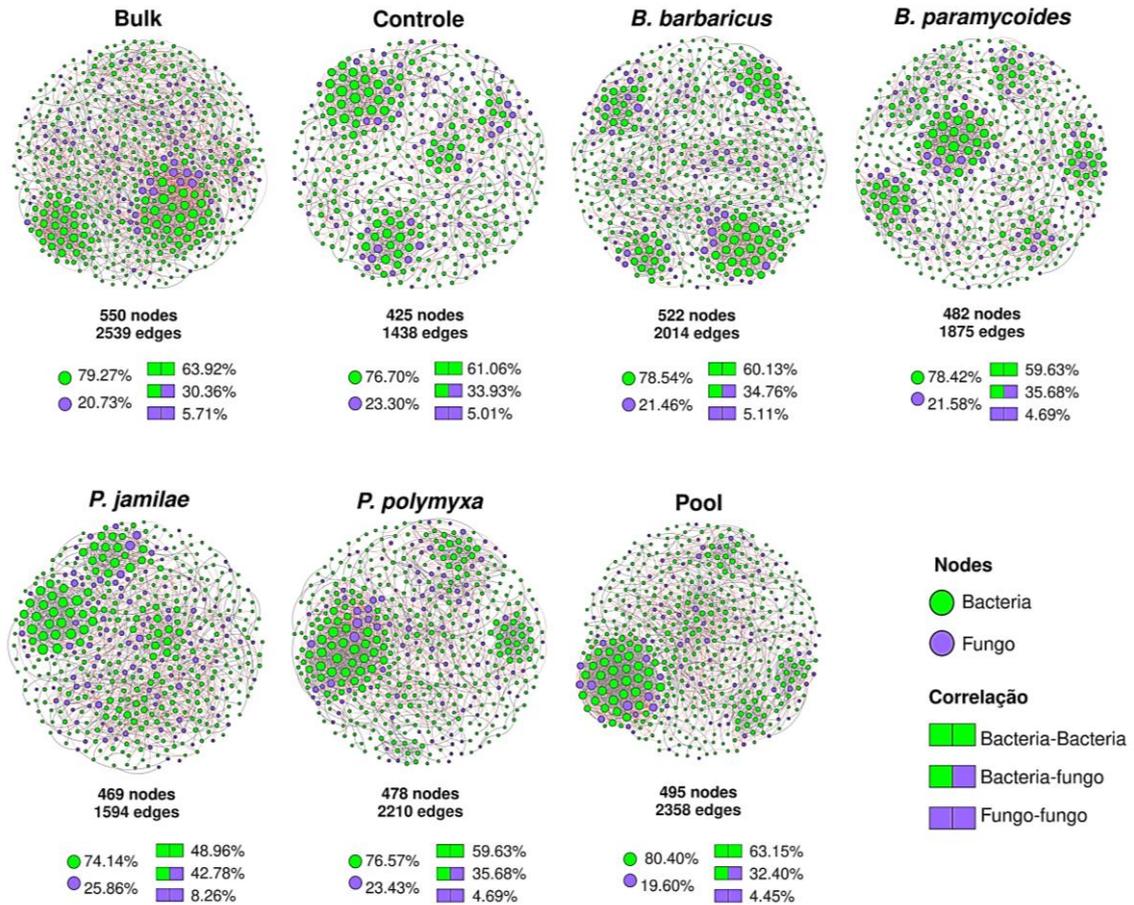


Figura 19. Análise de cocorrência de redes das comunidades bacterianas da rizosfera de feijão inoculado e não inoculado baseado no gene 16S rRNA. Uma conexão representa uma correlação SparCC com magnitude $> 0,9$ (correlação positiva-arestas azuis) ou $< -0,9$ (correlação negativa-arestas vermelhas) e estatisticamente significativa ($P \leq 0,01$). Cada nó representa táxons em nível OTU e o tamanho do nó é proporcional ao número de conexões (ou seja, grau). A cor dos nós é baseada na centralidade de intermediação, onde cores mais escuras indicam valores mais altos. A construção da rede foi feita usando o software Gephi.

6. DISCUSSÃO

6.1. Variáveis de planta

6.1.1. Parâmetros de crescimento

Nos parâmetros de crescimento avaliados, a falta de significância estatística não significa necessariamente que os isolados não tiveram efeito sobre o crescimento das plantas, mas sim que não foi possível detectar essa diferença. É possível que a microflora nativa do solo tenha superado os inoculante introduzidos (PEREG; MCMILLAN, 2015). Deve-se, também, considerar que o experimento foi avaliado somente após 35 dias do plantio e, sendo possível que, embora os inoculantes ainda sejam eficazes, o parâmetro de crescimento das plantas se estabilize durante seu desenvolvimento (BERG *et al.*, 2016; PEREG; MCMILLAN, 2015), necessitando, portanto, de pesquisas ao longo do ciclo de desenvolvimento visando identificar a influência da inoculação microbiana no crescimento da planta. Ainda, a adubação recomendada pode ter relevância sobre os parâmetros de crescimento, principalmente para planta, não necessitando recrutar microorganismos para ajudá-la a se estabelecer no solo (HARTMAN *et al.*, 2018). Vale ressaltar que o solo utilizado no experimento foi corrigido quimicamente, apresentando alta fertilidade, o que diminui a dependência da planta por interações com a comunidade microbiana. Estudos têm mostrado que o uso de bioinoculantes têm diminuído a dependência de fertilizantes químicos (ETESAMI; ALIKHANI, 2016; TELLES *et al.*, 2023). Assim, novos experimentos, com níveis diferentes de fertilidade do solo, são necessários para avaliar o potencial desses isolados na promoção de crescimento das plantas.

6.1.2. Química foliar

A inoculação de diferentes espécies bacterianas é capaz de afetar a absorção de nutrientes pelas plantas, ao promover a solubilização desses compostos. Esse processo ocorre por meio da produção de ácidos orgânicos e enzimas que auxiliam na liberação dos nutrientes das partículas do solo, tornando-os prontamente disponíveis para as plantas (YADAV *et al.*, 2017). Algumas

bactérias diazotróficas, como a *Paenibacillus*, fornecem às plantas uma parte da quantidade do nitrogênio fixado em forma de amônia e nitrato, em adição à fixação de nitrogênio. Estas bactérias também são capazes de fornecer ferro (Fe) às plantas quando este elemento está em limitação no solo, por meio da produção e secreção de sideróforos que, ao se ligar ao ferro presente no solo o torna disponível para as plantas (WANG *et al.*, 1993; GRAY; SMITH, 2005; LIU *et al.*, 2019). Tal fato corrobora com o resultado encontrado no presente estudo, em que o tratamento inoculado com a cepa *P. polymyxa* apontou melhores resultados de N e Fe na planta comparado aos demais tratamentos inoculados e Controle. A disponibilidade de N está diretamente associada à produção de ácidos orgânicos, solubilização de nutrientes complexados e fixação de nitrogênio promovidos pela cepa estudada (LIU *et al.*, 2019). Embora o Fe seja um nutriente pouco móvel, os resultados obtidos para esse nutriente mostram um efeito da cepa *P. polymyxa* que sintetiza sideróforos que quelam o Fe^{3+} e o disponibiliza em forma de Fe^{2+} para absorção das plantas (McROSE *et al.*, 2018). Este achado acentua a importância da inoculação microbiana (biofertilização) para a biodisponibilidade de nutrientes nas culturas.

6.1.3. Micorrização

Os resultados obtidos indicaram que a inoculação com a bactéria *B. paramycoides* contribuiu para a maior taxa de micorrização, provavelmente por meio da promoção da colonização do fungo nas raízes das plantas. Alguns estudos sugerem que o *B. paramycoides* pode auxiliar na ciclagem de nutrientes, solubilização de fósforo inorgânico (Pi), aumentar o crescimento das raízes e melhorar a resistência das plantas a estresses ambientais (APAZA-CASTILLO *et al.*, 2022), tornando propício à interação com as FMAS. O Controle também apresentou uma taxa de micorrização satisfatória, o que sugere que as raízes das plantas foram capazes de estabelecer a simbiose com o fungo em condições naturais. A importância de aplicação dos micro-organismos no solo não está relacionada unicamente ao aumento apenas desses grupos no solo, mas possivelmente, a aplicação de inoculantes também é de extrema importância para o aumento da diversidade microbiológica, pois esses micro-organismos aplicados no solo têm a

capacidade de auxiliar na colonização de outros grupos microbianos, que também podem contribuir para o crescimento vegetal. A inoculação com a bactéria *B. paramycooides* pode ser uma estratégia promissora para aumentar a taxa de micorrização em plantas. No entanto, é importante considerar que diferentes espécies de plantas e micro-organismos podem ter respostas distintas à inoculação, sendo necessário avaliar a eficácia da inoculação em diferentes condições de solo e clima.

6.1.4. Expressão gênica

Nossos resultados evidenciaram que a inoculação de cepas bacterianas afetou a expressão dos genes *CAB*, *GST* e *WRKY* em folhas de feijoeiro, reprimindo sua expressão (*down-regulation*). Em suma, a inoculação de bactérias pode influenciar a expressão gênica na planta por meio da ativação de vias de sinalização, da indução de respostas de defesa e de outros mecanismos (ANDERSEN et al., 2018). Embora a inoculação geralmente resulte em um aumento na expressão gênica em plantas, em alguns casos, pode ocorrer a repressão, ou seja, uma diminuição na expressão de genes (BORGES, 2011; ZAMIOUDIS; PIETERSE, 2012). O gene *GST* está envolvido na detoxificação de compostos tóxicos nas células da planta. Alguns estudos indicam que a inoculação de bactérias pode levar à *down-regulation* do gene *GST* em plantas (DIXON et al., 2010) devido ao fato de algumas bactérias poderem promover a tolerância da planta a compostos tóxicos sem a necessidade de ativar a expressão desse gene. O gene *CAB* está envolvido na fotossíntese, processo fundamental para a produção de energia na planta (PICKERSKY et al., 1989). A repressão do gene *CAB* pode ocorrer porque algumas bactérias podem melhorar a eficiência fotossintética sem a necessidade de aumentar a expressão do gene. Os genes *WRKY* estão envolvidos na regulação de respostas de defesa em plantas (CHI et al., 2013), e sua repressão pode ocorrer porque algumas bactérias podem promover a resistência da planta a estresses bióticos e abióticos sem a necessidade de ativar a expressão do gene *WRKY*.

Em suma, a *down-regulation* dos genes *CAB*, *GST* e *WRKY* pode ser uma resposta adaptativa da planta à inoculação, já que a redução na expressão gênica pode permitir a realocação de recursos para outras funções importantes. Entretanto,

é importante destacar que a repressão desses genes pode ter efeitos negativos na resistência e no crescimento da planta, dependendo das condições experimentais e da interação específica entre as bactérias e a planta. A compreensão desses mecanismos pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para melhorar a resistência e o crescimento das plantas por meio da inoculação de bactérias.

6.2. Variáveis de solo: química do solo e atividade enzimática

6.2.1. Química do solo

A inoculação de espécies bacterianas alterou de forma significativa o pH do solo, onde observou-se uma redução, deixando o solo mais ácido. O consórcio bacteriano (Pool) foi o tratamento que mais aumentou acidez do solo, em comparação com aos demais tratamentos e Controle. As rizosferas dos tratamentos com e sem inoculação provocaram a redução da saturação por bases, bem como, um aumento da saturação por alumínio do solo. Um solo com baixo pH, baixa saturação por bases e alta saturação por alumínio pode indicar um solo ácido e pobre em nutriente. A baixa saturação por bases pode indicar uma baixa disponibilidade de nutrientes importantes como o cálcio, magnésio e potássio, que são considerados macronutrientes essenciais para o crescimento das plantas. A acidificação da rizosfera inibe o crescimento das raízes das plantas, afetando a absorção de nutrientes. A própria rizosfera da planta tende a modular as propriedades dos solos, seja pela liberação de íons H^+ ou pela liberação de ácidos orgânicos, reduzindo o pH, influenciando diretamente as comunidades microbianas nela presentes, bem como a disponibilidade de nutrientes (MELO, 2006). O mesmo ocorre com a inoculação de bactérias que modula os parâmetros químicos e bioquímicos do solo ao promover a acidificação, atuando sobre o tamponamento e a capacidade de troca de cátions (CTC) do solo (ZHANG *et al.*, 2009; MIRANSARI, 2011). Tais fatos corroboram nossos resultados, onde a inoculação levou a um aumento da acidez do solo, podendo gerar efeitos maléficos no crescimento de plantas. Porém, de maneira geral, as maiores diferenças foram encontradas entre o solo *Bulk* e a rizosfera, revelando que as mudanças químicas estejam mais

relacionadas com as alterações ocasionadas pelas raízes das plantas do que a presença de um inoculante.

6.2.2. Atividade enzimática

Observou-se, ainda, que as amostras de rizosfera, seja inoculada ou não, teve maior influência sobre a fosfatase ácida, sendo que a produção desta enzima é aumentada quando o fósforo está ausente no solo, intensificando a solubilização e remobilização do fosfato. Então, os inoculantes pouco atuaram sobre a solubilização, visto que não houve diferença estatística entre o Controle e os tratamentos com inoculação. Em solos com baixo pH, baixa saturação por bases, alta saturação por alumínio e presença de fosfatase ácida, podem ocorrer interações complexas que afetam a disponibilidade de nutrientes e o crescimento das plantas. A fosfatase ácida é uma enzima produzida por micro-organismos do solo e pelas raízes das plantas que tem a capacidade de hidrolisar fosfatos orgânicos em fosfatos inorgânicos, tornando-os disponíveis para as plantas. No entanto, a atividade da fosfatase ácida é mais eficiente em solos ácidos e, portanto, pode ser mais elevada em solos com baixo pH (CAIRES *et al.*, 2015). Por outro lado, a alta saturação por alumínio pode afetar negativamente a atividade da fosfatase ácida, reduzindo a disponibilidade de fósforo para as plantas (ACOSTA-MARTINEZ; TABATABAI, 2000). O alumínio pode inibir a atividade das raízes das plantas, reduzindo a capacidade de absorção de nutrientes, e afetar a atividade de micro-organismos do solo, reduzindo a decomposição de matéria orgânica e a disponibilidade de nutrientes, tais fatos que confirmam os nossos resultados.

6.3. O efeito da inoculação na comunidade de bactérias

Os resultados obtidos na análise da estrutura bacteriana revelaram diferenças significativas entre o solo Bulk e as amostras de rizosfera, como também os tratamentos que envolveram a inoculação de bactérias e aqueles que não receberam a inoculação. Inicialmente, pode-se observar uma diferença significativa entre as comunidades do solo bulk e rizosfera, incluindo a estrutura e a diminuição da diversidade na rizosfera do Controle. Muitos estudos têm demonstrado que o solo

tem uma grande influência na constituição das comunidades de rizosfera, uma vez que eles servem como um reservatório de espécies. RIDDER-DUINE *et al.* (2005) mostraram que a estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera é determinada pela composição da comunidade habitante do solo. Também, as complexas características físico-químicas dos solos afetam a fisiologia da planta e seus exsudatos que, por sua vez, influenciam a composição da microbiota da rizosfera (PHILIPPOT *et al.* 2013). Adicionalmente, a espécie da planta também tem grande influência na composição e atividade das comunidades microbianas da rizosfera. Diferenças na morfologia das raízes, como também na quantidade e tipo de rizodepósitos, contribuem para o efeito de seleção espécie-específica (KOWALCHUK *et al.* 2002; HAICHAR *et al.* 2008). Assim, os resultados encontrados no nosso estudo evidenciam o efeito rizosférico promovido pela planta hospedeira.

Por outro lado, ficou evidente que a presença de uma bactéria inoculada teve um impacto considerável na estrutura e diversidade da comunidade bacteriana da rizosfera, resultando em possíveis alterações na disponibilidade de nutrientes, como boro, magnésio e fósforo, bem como modificações no pH no solo rizosférico em comparação com o Controle. Estudos anteriores mostraram que a inoculação bacteriana pode aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas e também afetar a estrutura da comunidade microbiana presente na rizosfera (ZHANG *et al.*, 2015; HU *et al.*, 2020). Filos como Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes e Acidobacteria foram os mais abundantes em todos os tratamentos, e representaram mais de 80% da comunidade. Esses filios são comumente encontrados em solos rizosféricos, podendo ser considerados como uma comunidade *core* (comunidade essencial) da rizosfera (HALDAR; SENGUPTA, 2015). Esses filios não variaram de forma expressiva entre os tratamentos, embora seja possível observar um leve aumento de Actinobacteria em solos com inoculação.

A diversidade bacteriana foi maior no solo *Bulk* em relação ao Controle, mostrando que a rizosfera seleciona bactérias especialistas para relações mutualistas. É conhecido que a rizosfera é um ambiente altamente seletivo e diversificado, uma vez que as plantas secretam vários compostos na rizosfera que atraem bactérias e fungos específicos que ajudam a disponibilizar nutrientes e suprimir patógenos (PHILIPPOT *et al.*, 2013; MENDES *et al.*, 2018). Os nossos dados indicam que, ao inocular bactérias no solo rizosférico, um aumento na diversidade bacteriana foi observado, sugerindo que a inoculação pode melhorar a

resiliência funcional, e trazer impactos positivos para a planta. Nosso estudo está em linha com os resultados observados por outros trabalhos, que mostram que a inoculação de bactérias pode melhorar o crescimento da planta, e aumentar a diversidade de bactérias na rizosfera, melhorando a saúde do solo e da planta (MENDES *et al.*, 2013; TRABELSI *et al.*, 2013).

A análise da abundância bacteriana diferencial demonstrou uma maior predominância de OTUs no solo não influenciado pela rizosfera (solo *Bulk*), confirmando a hipótese de que a rizosfera seleciona bactérias benéficas para estabelecer simbiose com a planta. Contudo, notamos variações significativas em alguns táxons entre o grupo Controle e o grupo tratado com isolados bacterianos. Apesar dessas diferenças, é interessante observar que a distribuição da abundância entre os táxons mais prevalentes se manteve similar no grupo Controle e nos grupos tratados com isolados. Por exemplo, OTUs pertencentes à família Burkholderiaceae e Micrococcaceae e os gêneros *Dyella* e *Rhizobium* foram os mais abundantes na rizosfera do grupo Controle. Estes micro-organismos possivelmente estão adaptados às condições específicas da rizosfera e podem ter sido influenciados por mudanças nutricionais e químicas, além da competição entre micro-organismos após a inoculação (PHILIPPOT *et al.*, 2013; PII *et al.*, 2015; SASSE *et al.*, 2018).

Em contraste, observamos uma maior abundância de OTUs como membros da ordem Gaiellales, à família Xanthobacteraceae e aos gêneros *Nocardioides* e *Conexibacter* nos grupos tratados com inoculantes bacterianos, e o gênero *Bradyrhizobium* que teve maior abundância em grupos tratados com *Paenibacillus*. Estudos anteriores demonstraram que *Nocardioides* são fixadores de nitrogênio, degradadores de xenobióticos e antibióticos (YOON *et al.*, 1999; KIN, *et al.*, 2017; NAFIS *et al.*, 2019). Os gêneros *Conexibacter* têm papel importante na ciclagem do nitrogênio e carbono, atuam na decomposição da M.O. e na ciclagem de nutrientes, e *Bradyrhizobium* sendo outro gênero relacionado à fixação de nitrogênio (VANINSBERGHE, *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2019; PEDRINHO *et al.*, 2020). Esses micro-organismos têm grande importância em diferentes processos no ciclo do N, incluindo nitrificação e desnitrificação. Nossos achados indicam que a inoculação afetou a abundância de grupos microbianos benéficos para a planta, evidenciando o efeito indireto da inoculação, que atua sobre as condições do solo e a resposta da própria planta (COMPANT *et al.*, 2019; TRIVEDI *et al.*, 2020).

6.4. O efeito da inoculação na comunidade de fungos

Com relação a estrutura da comunidade fúngica, nem todos os tratamentos demonstraram uma alteração significativa na estrutura, embora tenham sido observadas algumas diferenças em comparação com o solo em geral e o grupo Controle. Notavelmente, a inoculação com bactérias do gênero *Paenibacillus* teve um efeito significativo na estrutura fúngica, enquanto a inoculação com bactérias do gênero *Bacillus* não resultou em variações significativas. Essas mudanças na estrutura, promovidas pelo gênero *Paenibacillus*, podem estar relacionadas à ampla gama de substâncias secundárias produzidas por esse gênero, como antibióticos e antifúngicos, o que sugere a possibilidade de modulação da comunidade microbiana (YANG *et al.*, 2018; PADDA *et al.*, 2017; CARRIÓN *et al.*, 2019).

Ao analisar a diversidade de fungos entre os tratamentos deste estudo observou-se uma menor diversidade no solo *Bulk* como também para os grupos que foram inoculados com *B. barbaricus* e o Pool, enquanto o Controle, e os demais grupos com inoculação aumentaram a diversidade. Foi ainda interessante notar que o tratamento com inoculação de *P. polymyxa* resultou em uma maior diversidade. Em alguns casos, a diversidade de fungos pode aumentar após a inoculação de bactérias, e entre os principais motivos está o aumento da resistência da planta, maior disponibilidade de nutrientes, modificação das propriedades do solo, e pela interação positiva de bactérias e fungos (XU *et al.*, WU *et al.*, 2022; CARRIÓN *et al.*, 2019).

Um contraste com os resultados obtidos para comunidade de bactéria, a comunidade de fungos apresentou uma baixa quantidade de OTUs com abundância diferencial após a inoculação, indicando pouca alteração da comunidade, uma observação que pode ser atribuída ao ciclo de vida prolongado dos fungos e suas interações com as bactérias. Devido a essa característica, possíveis impactos na sua comunidade podem necessitar de um período mais extenso para serem percebidos (BAHRAM *et al.*, 2018). Curiosamente, nossos resultados indicam que diferentes isolados bacterianos podem influenciar de maneira distinta a abundância diferencial de fungos. Especificamente, os grupos inoculados com *B. paramycoides* exibiram um aumento na abundância de alguns táxons, dentre eles, destacam-se os gêneros *Saitozyma*, *Lycoperdon*, *Dimorphiseta* e *Phialocephala*, enquanto houve redução do gênero *Saitozyma* no tratamento com *B. barbaricus*. A presença

diferencial desses grupos de fungos pode estar relacionada a uma maior decomposição de matéria orgânica, produção de esporos e estabelecimento de relações simbióticas (KJØLLER *et al.*, 2012).

Já nos tratamentos com *P. jamaicae* e *P. polymyxa*, notou-se um efeito mais expressivo em comparação à inoculação com espécies do gênero *Bacillus*. A abundância diferencial de fungos apresentou de 2 a 5 vezes mais OTUs diferenciais nos tratamentos com *Paenibacillus*. Esse aumento na diversidade de táxons pode refletir em alterações significativas nas funções ecológicas do solo, como a ciclagem de nutrientes, a resiliência funcional, a produção de compostos secundários, e as interações planta-micro-organismos (JING *et al.*, 2015). De maneira geral, nossos resultados mostraram que a inoculação com bactérias afeta a comunidade de fungos da rizosfera, mas de forma menos intensa que as alterações na comunidade bacteriana.

6.5. Interações ecológicas de fungos e bactérias e o efeito nas plantas

Por fim, realizamos análises de co-ocorrência e de nicho para verificar o efeito da inoculação sob a dinâmica das interações microbianas na rizosfera. Mensurar as características e os efeitos nas relações entre os micro-organismos e a ocupação de nichos ecológicos pode sugerir como a inoculação pode afetar de maneira indireta o crescimento da planta. A análise de ocupação de nichos ecológicos mostrou que todos os tratamentos apresentaram um aumento de especialistas em relação ao Controle. No entanto, o tratamento com *B. barbaricus*, *P. polymyxa* e o Pool foram os que mais aumentaram esses grupos. A inoculação potencialmente aumentou o recrutamento de bactérias específicas da rizosfera, podendo auxiliar em processos como a obtenção de nutrientes, fortalecimento do sistema imune da planta e até mesmo melhorias das condições do solo (COMPANT *et al.*, 2019). Estudos anteriores demonstraram que os organismos especialistas têm um nicho limitado, mas apresentam maior aptidão em seu habitat ideal (KNEITEL; CHASE, 2004; MONARD *et al.*, 2016). Além disso, de acordo com PANDIT *et al.* (2009), os especialistas são altamente responsivos a perturbações ambientais, incluindo mudanças nas propriedades químicas do solo. Portanto, as alterações no pH e na disponibilidade de nutrientes na rizosfera podem ter criado condições muito específicas que favoreceram o crescimento e a diversidade dos especialistas.

A análise de network mostrou que a rizosfera apresenta relações menos complexas do que em comparação ao *Bulk*, sugerindo a especialização de táxons especialistas e possivelmente ocorrência de vias metabólicas específicas. Um estudo da rizosfera de soja em solos amazônicos apresentou resultados semelhantes, mostrando que a rizosfera apresenta seleção de especialistas, ocasionando relações menos complexas (MENDES *et al.*, 2014). No entanto, a inoculação com diferentes cepas bacterianas parece aumentar essa complexidade em relação ao Controle, indicando uma alteração nas relações microbianas após a adição de um inoculante. Os inoculantes bacterianos podem modular de maneira distinta o microbioma da rizosfera, alterando relações positivas e negativas, e a complexidade das interações (COMPANT *et al.*, 2019). Em particular, os tratamentos com Pool, *P. polymyxa* e *B. barbaricus* se destacaram por apresentarem uma complexidade de interações consideravelmente superior, evidenciando uma diversidade e complexidade de relações mais ampla quando comparados ao tratamento Controle. Isso sugere que a inoculação pode estimular uma rede de interações mais complexa na rizosfera, o que pode ter implicações significativas para a saúde e o desempenho das plantas (BANERJEE *et al.*, 2019). Resultados semelhantes são observados ao aplicar resíduos agrícolas em solos, uma vez que uma comunidade mais completa e complexa pode alterar de forma mais significativa as interações da comunidade (BELL *et al.*, 2019). Além disso, o tratamento com *P. jambilae* foi o único que alterou substancialmente as interações entre fungos e bactérias. Esses resultados evidenciam que a inoculação com diferentes cepas afeta não apenas a estrutura e complexidade das redes de interações, mas também o tipo de interações entre diferentes domínios taxonômicos (TIPTON *et al.*, 2018; HARTMAN *et al.*, 2018). Em resumo, a análise de network revelou que a inoculação bacteriana na rizosfera pode influenciar distintamente a complexidade das interações microbianas e o equilíbrio entre diferentes domínios taxonômicos, com implicações significativas para a dinâmica e funcionalidade da comunidade microbiana, e conseqüentemente, para a saúde e o crescimento das plantas.

7. CONCLUSÃO

A inoculação com diferentes bactérias pode efetivamente afetar a estrutura da comunidade microbiana do solo da rizosfera, e as comunidades bacterianas tendem a ser mais sensíveis às mudanças após a inoculação em comparação com as comunidades fúngicas. As inoculações afetam o desempenho da planta indiretamente por meio de mudanças concomitantes nas comunidades residentes, explicando o por que da resposta das plantas aos inoculantes nem sempre ser positiva. Embora o impacto na comunidade microbiana do solo tenha sido avaliado principalmente a partir de uma perspectiva composicional, avaliar o impacto do inoculante e a resiliência da comunidade a partir de uma perspectiva funcional - usando uma ampla gama de abordagens ômicas (metagenômica, metatranscriptômica, metabonômica, metaproteômica) - irá ajudar a determinar se as comunidades invadidas mantêm seu funcionamento apesar das mudanças induzidas por inoculantes em sua composição.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA-MARTINEZ, V.; TABATABAI, M. A. Enzyme activities in a limed agricultural soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 31, p. 85-91, 2000.
- AHEMAD, M. S.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n.1, p. 1-20, 2014.
- AKINRINLOLA, R. J. *et al.* Evaluation of Bacillus Strains for Plant Growth Promotion and Predictability of Efficacy by In Vitro Physiological Traits. **International Journal of Microbiology**, p. 1–11, 2018.
- AMANN, R.I.; LUDWING, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews, Amsterdam**, v. 59, p. 143–169, 1995.
- ANDERSEN, E. J. *et al.* Disease Resistance Mechanisms in Plants. **Genes**, v. 9, p. 339, 2018. <https://doi.org/10.3390/genes9070339>.
- ANTUNES, P. L. *et al.* Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.), cultivares rico 23, carioca, piratã-1 e rosinha-g2. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 1, n. 1, p. 12-18, 1995.
- APAZA-CASTILLO, G. A.; HOSAKA, G. K.; QUECINE, M. C. Genome insights from the Amazonian rhizobacterium *Bacillus paramycoides* RZ3MS14 reveal plant growth-promoting multi-traits and bioprotection against phytopathogens and environmental stresses. **Research Square**. dec. 2022. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2379212/v1>.
- ARAUJO, A. S. F. *et al.* Bacterial community associated with rhizosphere of maize and cowpea in a subsequent cultivation. **Applied Soil Ecology**. v. 143, p. 26–34, 2019.
- ASH, C.; PRIEST, F.G.; COLLINS, M. D. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. Proposal for the creation of a new genus *Paenibacillus*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. v. 64, p. 253-260, 1993. <https://doi.org/10.1007/BF00873085>.
- BAHRAM, M. *et al.* Structure and function of the global topsoil microbiome. **Nature**, v. 560, p. 233–237, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0386-6>.
- BANERJEE, S.; SCHLAEPPI, K.; van der HEIJDEN, M. G. A. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. **Nature reviews. Microbiology**, v.16, n.9, p. 567–576, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0024-1>.
- BELL, T. H. *et al.* Changes in the structure of bacterial and fungal communities in agricultural soil resulting from the application of dairy manure and commercially available microbial products. **Applied Soil Ecology**, v.136, p.125-133, 2019.
- BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M.; BAKKER, P. A. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 8, p. 478-486, 2012.

BERG, G. *et al.* Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends, **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, n. 5, may 2017. <https://doi.org/10.1093/femsec/fix050>.

BERG, G. *et al.* The plant microbiome explored: implications for experimental botany. **Journal of experimental botany**, v. 67, n. 4, p. 995–1002, 2016. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv466>.

BERG, G.; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 68, p. 1–13, 2009.

BERGA, M.; SZÉKELY, A. J.; LANGENHEDER, S. Effects of disturbance intensity and frequency on bacterial community composition and function. **PLoS ONE**. v.7, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036959>.

BHAT, M.; RASOOL, R.; RAMZAN, S. Plant growthpromoter rhizobacteria (PGPR) for sustentável eeco-friendly agricultura. **Acta Sci Agric**. v.3, p.23–25, 2019.

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

BJÖRKLÖF, K.; SEM, R.; JØRGENSEN, K. S. Maintenance and impacts of an inoculated mer/luc-tagged *Pseudomonas Fluorescens* on microbial communities in birch rhizospheres developed on humus and peat. **Microb. Ecol.** v.45, p.39–52, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00248-002-2018-8>.

BOLYEN, E. *et al.* Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature biotechnology**, v.37, p. 852-857, 2019.

BONATERRA, A. *et al.* Prospects and limitations of microbial pesticides for control of bacterial and fungal pomefruit tree diseases. **Trees**, v. 26, n. 1, p. 215-226, 2012.

BONFANTE, P.; GENRE, A. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. **Nature communications**, v.1, n. 1, p. 1-11, 2010. <https://doi.org/10.1038/ncomms1046>.

BONFANTE, P.; GENRE, A. Plants and arbuscular mycorrhizal fungi: an evolutionary-developmental perspective. **Trends Plant Sci**. v. 13, p. 492–498, 2008.

BORGES, A. **Análise da expressão de genes relacionados à interação incompatível *Phaseolus vulgaris/Colletotrichum lindemuthianum***. Orientadora: Danielle Gregório Gomes Caldas. 2011. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BORGES, A. *et al.* Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. **Journal of Plant Physiology**, v.169, n. 12, p. 1216-1220, ISSN 0176-1617, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.04.003>.

BORRIS, R. Chapter 7 – *Bacillus*. In: Amaresan, M. (Ed.). Beneficial Microbes in Agro-Ecology. **Academic Press**, p. 107-132, ISBN 9780128234143, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00007-1>.

BOTTON, H.; FREDRIKSON, J. K.; ELLIOT, L. E. Microbial ecology of the rhizosphere. *In*: MEETING JR., F. B. (Ed.). **Soil microbial ecology**. New York: Marcel Dekker, p. 27–63, 1992.

BRASIL. Decreto nº 4.954, de 14 de janeiro de 2004. Aprova o regulamento da Lei no 6.894, de 16 de dezembro de 1980, que dispõe sobre a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de fertilizantes, corretivos, inoculantes ou biofertilizantes destinados à agricultura, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 15 jan. 2004.

BROECKLING, C. D. *et al.* Rhizosphere Ecology. **Encyclopedia of Ecology**, p. 3030-3035, ISBN 9780080454054, 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-008045405-4.00540-1>.

CAIRES, E. F. *et al.* Surface liming and nitrogen fertilization for crop grain production under no-till management in Brazil. **European Journal of Agronomy**, v. 66, p. 41-53, 2015.

CANARINI, A. *et al.* Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. **Front. Plant Sci.** v. 10, 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00157>.

CARDOSO, E. J.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 360 p. 1992.

CARRIÓN, V. J. *et al.* Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome. **Science**, New York, v. 366, p. 606–612, 2019. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9285>.

CELMELI, T. *et al.* The Nutritional Content of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Landraces in Comparison to Modern Varieties. **Agronomy**, Basel, v. 8, n. 9, p.166, 2018.

CHAUHAN, H. *et al.* Novel plant growth promoting rhizobacteria—Prospects and potential. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 38-53, 2015.

CHI, Y. *et al.* Protein–protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. **Molecular Plant**, v. 6, p. 287-300, 2013.

COMPANT, S. *et al.* A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. **Journal of advanced research**, v. 19, p. 29–37, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.03.004>.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 10, safra 2022/23, n. 5. quinto levantamento, fevereiro 2023. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 04/04/2023.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Custos de Produção. 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/custos-de-producao> . Acesso em: 05/04/2023.

DALPÉ, Y. *et al.* Fungal inoculants in Canadian agriculture: Potential benefits from research to practice. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v. 38, n. 1, p. 1-15, 2016.

DAZZO, F. B.; GANTER, S. Rhizosphere, *In*: Schaechter, M. (Ed.) **Encyclopedia of Microbiology**. 3 ed. Academic Press, p. 335-349, ISBN 9780123739445, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00287-X>.

DIAZ, P. A. E. D542b *Bacillus* spp. como promotores de crescimento na cultura do algodão. Orientador: Everlon Cid Rigobelo. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, 46 p. Jaboticabal, 2018.

DICKE, M.; BALDWIN, I. T. The evolutionary context for herbivore-induced plant volatiles: beyond the 'cry for help'. **Trends in plant science**, v. 15, n. 3, p. 167-175, 2010.

DIXON, D. P.; SKIPSEY, M.; EDWARDS, R. (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, v. 71, n. 4, p. 338–350, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.12.012>.

DUMONT, M. G. *et al.* DNA-, rRNA- and mRNA-based stable isotope probing of aerobic methanotrophs in lake sediment. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 5, p. 1153–1167, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02415.x>.

ETESAMI, H.; ALIKHANI H. A. (2016). Co-inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria allows reduced application rates of N-fertilizer for rice plant. **Rhizosphere**, v. 2, p. 5-12, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2016.09.003>.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics-Novembro, 2020. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em: setembro de 2021.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database** 2021. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> . Acesso em: 04/04/2023.

FERREIRA, D. A. **Interações entre fungos micorrízicos arbusculares e a microbiota de solos**. 2016. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2016.

FIGUEIREDO, A. *et al.* Validation of reference genes for normalization of qPCR gene expression data from *Coffea* spp. hypocotyls inoculated with *Colletotrichum kahawae*. **BMC research notes**, v. 6, p. 388, 2013.

FLORES-GALLEGOS, A. C.; NAVA-REYNA, E. Chapter 30 - Plant Growth-Promoting Microbial Enzymes. *In*: KUDDUS, M. (Ed.) **Enzymes in Food Biotechnology**, Academic Press, p. 521-534, ISBN 9780128132807, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00030-X>.

GALLUSCI, P. *et al.* Epigenetics for Plant Improvement: Current Knowledge and Modeling Avenues. **Trends in plant science**, v. 22, n.7, p. 610–623, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.009>.

GARDENER, M. B. B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. **Phytopathology**, v. 94, n. 11, p. 1252–1258, 2004. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1252>.

GAVILANES, F.Z. *et al.* Interactions Between Edaphoclimatic Conditions and Plant–Microbial Inoculants and Their Impacts on Plant Growth, Nutrient Uptake, and Yields. *In: Maddela, N.R. (Eds.) Advances in the Domain of Environmental Biotechnology*. Environmental and Microbial Biotechnology. Springer, Singapore, 2021. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8999-7_22

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*. 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>.

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

GOLLOTTE, A.; VAN TUINEN, D.; ATKINSON, D. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising roots of the grass species *Agrostis capillaris* and *Lolium perenne* in a field experiment. *Mycorrhiza*, v. 14, p. 111-117, 2004.

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

HAICHAR, F.Z. *et al.* Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *ISME Journal*, v.2, p. 1221-1230, 2008.

HALDAR, S.; SENGUPTA, S. Impact of plant development on the rhizobacterial population of *Arachis hypogaea*: a multifactorial analysis. *Journal of basic microbiology*, v. 55, n. 7, p. 922–928, 2015. <https://doi.org/10.1002/jobm.201400683>.

HARTMAN, K. *et al.* Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. *Microbiome*, v. 6, n. 14, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0389-9>.

HARTMANN, A.; ROTHBALLER, M.; SCHMID, M. Lorenz Hiltner, a pioneer in rhizosphere microbial ecology and soil bacteriology research. *Plant and Soil*, v. 312, n. 1/2, p. 7–14. 2008.

HILTNER, L. Über neue Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb. Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft*, Berlin, v. 98, p. 59–78, 1904.

HINSINGER, P. *et al.* (2016). Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil*, v. 407, p. 1-8, 2016.

HU, D. *et al.* *Streptomyces* sp. strain TOR3209: a rhizosphere bacterium promoting growth of tomato by affecting the rhizosphere microbial community. *Scientific reports*, v. 10, n.1, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76887-5>.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics, *Agriculture, Ecosystems & Environment*, v. 221, p. 125-131, ISSN 0167-8809, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.01.024>.

IMAM, J. Microbial interactions in plants: Perspectives and applications of proteomics, **Current Protein & Peptide Science**, v. 18, 2016.

JING, X. *et al.* The links between ecosystem multifunctionality and above- and belowground biodiversity are mediated by climate. **Nat Commun**, v. 6, 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms9159>.

KANG, S. M. *et al.* Integrated phytohormone production by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus tequilensis* SSB07 induced thermotolerance in soybean. *Journal of Plant Interactions*, v.14, n. 1, p. 416-423, 2019.

KAUR, S. *et al.* Synthetic community improves crop performance and alters rhizosphere microbial communities. **J Sustain Agric Environ**, n. 1, p. 118– 131, 2022. <https://doi.org/10.1002/sae2.12017>.

KAVAMURA, V. N. *et al.* Defining the wheat microbiome: towards microbiome-facilitated crop production. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 19, p. 1200-1213, 2021.

KAVAR, T. *et al.* Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. **Mol Breeding**, v. 21, p. 159–172, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9116-8>.

KIM, H. *et al.* Syntrophic biodegradation of propoxur by *Pseudaminobacter sp.* SP1a and *Nocardioides sp.* SP1b isolated from agricultural soil, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 118, p. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.024>.

KJØLLER, R. Dramatic changes in ectomycorrhizal community composition, root tip abundance and mycelial production along a stand-scale nitrogen deposition gradient. **The New phytologist**, v. 194, n. 1, p. 278–286, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.04041.x>.

KNEITEL, J. M.; CHASE, J. M. Trade-offs in community ecology: Link- ing spatial scales and species coexistence. **Ecol Lett**, v. 7, p. 69-80, 2004.

KNIGHT, R. *et al.* Unlocking the potential of metagenomics through replicated experimental design. **Nature biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 513–520, 2012. <https://doi.org/10.1038/nbt.2235>.

KONG, Z.; LIU, H. Modification of Rhizosphere Microbial Communities: A Possible Mechanism of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Enhancing Plant Growth and Fitness. **Frontiers in plant science**, v. 13, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.920813>.

KOWALCHUK, G. A. *et al.* Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 8, p. 509, 2002.

LEMOS, L. N. *et al.* Rethinking microbial diversity analysis in the high throughput sequencing era, **Journal of Microbiological Methods**, v. 86, n. 1, p. 42-51, ISSN 0167-7012, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.03.014>.

LI, Y.; LIANG, Y.; CHEN, M. Manipulation of rhizosphere microbial community to enhance soil health and plant growth. **Frontiers in microbiology**, v. 8, 2017.

LITCHMAN, E. Invisible invaders: non-pathogenic invasive microbes in aquatic and terrestrial ecosystems. **Ecol Lett**, v. 13, n. 12, p. 1560–1572, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01544.x>

LIU, X. *et al.* *Paenibacillus* strains with nitrogen fixation and multiple beneficial properties for promoting plant growth. **PeerJ**, v. 7, 2019. <https://doi.org/10.7717/peerj.7445>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, **Methods**, v. 25, n. 4, 2001, p. 402-408, ISSN 1046-2023, 2001. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LUGTENBERG, B.; KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.

LUNDBERG, D. S. *et al.* Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, London, v. 488, p. 86-90, aug. 2012.

LUPWAYI, N. Z. *et al.* Inoculant quality and its evaluation, **Field Crops Research**, v. 65, n. 3, p. 259-270, ISSN 0378-4290, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00091-X).

MANMEET, K.; RAVNEET, K.; SODHI, H. S. Chapter 10 - Utilization of omics approaches for underpinning plant-microbe interaction. *In*: Singh, H. B. (Eds.). **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, Elsevier, p. 217-242, 2022. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85577-8.00009-3>.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. London: Academic, 2 ed. 1995. 889 p.

MAWARDA, P. C. *et al.* Deliberate introduction of invisible invaders: A critical appraisal of the impact of microbial inoculants on soil microbial communities, **Soil Biology and Biochemistry**, v. 148, ISSN 0038-0717, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.107874>.

McROSE, D. L.; SEYEDSAYAMDOST, M. R.; MOREL, F. M. M. (2018). Multiple siderophores: bug or feature?. **Journal of biological inorganic chemistry**, v. 23, n. 7, p. 983–993, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00775-018-1617-x>.

MEDINA, A. *et al.* Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). **Applied Soil Ecology**, v. 22, p. 15-28, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(02\)00112-9](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(02)00112-9).

MELO, I. S. **Rizorremediação**. EMBRAPA Documentos. 2006. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia23/AG01/arvore/AG01_22_299200692526.html. Acesso em: setembro 2022.

MENDES, L. W. *et al.* Breeding for soil-borne pathogen resistance impacts active rhizosphere microbiome of common bean. **The ISME journal**, v. 12, n. 12, p. 3038–3042, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0234-6>.

MENDES, L. W. *et al.* Resistance Breeding of Common Bean Shapes the Physiology of the Rhizosphere Microbiome. **Front. Microbiol**, v. 10, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02252>.

MENDES, L. W. *et al.* Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME journal**, v. 8, n. 8, p. 1577–1587, 2014. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.17>.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS microbiology reviews**, v. 37, n. 5, p. 634–663, sep. 2013. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12028>.

MIRANSARI, M. Soil microbes and plant fertilization. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 92, n. 5, p. 875–885, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3521-y>.

MONARD, C. *et al.* Habitat generalists and specialists in microbial communities across a terrestrial- freshwater gradient. **Scientific reports**, v. 6, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep37719>.

MONTEIRO, F. *et al.* Reference gene selection and validation for the early responses to downy mildew infection in susceptible and resistant *Vitis vinifera* cultivars. **PLoS ONE**, v. 8, 2013.

MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. **Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016.

MOROENYANE, I. *et al.* Plant compartments and developmental stages modulate the balance between niche-based and neutral processes in soybean microbiome. **Microb. Ecol.** V. 82, p. 416–428, 2021.

MORRIËN, E. *et al.* (2020). Soil networks become more connected and take up more carbon as nature restoration progresses. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13062-3>.

MYERS, J. R.; KMIECIK, K. (2017). Common Bean: Economic Importance and Relevance to Biological Science Research. *In*: PÉREZ de la VEGA, M. (Eds.) **The Common Bean Genome**. Compendium of Plant Genomes. Springer, Cham, 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63526-2_1.

NADEEM, S. M. *et al.* The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 2, p. 429–448, 2014.

NAFIS, A. *et al.* Actinobacteria from Extreme Niches in Morocco and Their Plant Growth-Promoting Potentials. **Diversity**, v. 11, n. 8, 2019. <https://doi.org/10.3390/d11080139>.

NEJAT, N. *et al.* Plant–pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, p. 229–237, 2017.

NERASTRI, L. P. **Rizosfera**. Grupo de Extensão em Microbiologia do Solo ESALQ – USP, 2020. Disponível em: <http://gmicsesalq.com.br/>. Acesso em 16 de março de 2023.

NOVAIS, C. B. *et al.* **Técnicas Básicas em Micorrizas Arbusculares**. Lavras: Ed. UFLA, 2017. 132 p.

OLIVEIRA, L. F. C. *et al.* **Conhecendo a fenologia do feijoeiro e seus aspectos fitotécnicos**. Brasília: Embrapa, 2018, 59 p.

PADDA, K. P.; PURI, A.; CHANWAY, C. P. *Paenibacillus polymyxa*: a prominent biofertilizer and biocontrol agent for sustainable agriculture. **Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agriculture**, v. 2, p. 165-191, 2017. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5343-6_6.

PANDIT, S. N.; KOLASA, J.; COTTENIE, K. Contrasts between habitat generalists and specialists: an empirical extension to the basic metacommunity framework. **Ecology**, v. 90, p. 2253-2262, 2009.

PATOWARY, R.; DEKA, H. Chapter 17 – *Paenibacillus*. In: AMARESAN, N. (Eds.) **Beneficial Microbes in Agro-Ecology**, Academic Press, p. 339-361, ISBN 9780128234143, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00017-4>.

PAULA, H. V. C.; CHELOTTI, M. C. O processo de modernização tecnológica na agricultura e a disputa territorial no campo brasileiro. **Espaço em Revista**, v. 20, n. 1, 2018.

PAUSCH, J.; KUZYAKOV, Y. Carbon input by roots into the soil: quantification of rhizodeposition from root to ecosystem scale. *Global Change Biology*, v. 24, n. 1, p. 1-12, 2018.

PEDRINHO, A. *et al.* The natural recovery of soil microbial community and nitrogen functions after pasture abandonment in the Amazon region. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, ed. 9, 2020.

PEREG, L.; McMILLAN, M. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. **Soil Biol Biochem**. V. 80, p. 349– 58, 2015.

PÉRET, B.; LARRIEU, A.; BENNETT, M. J. Lateral root emergence: a difficult birth, **Journal of Experimental Botany**, v. 60, n. 13, p. 3637–3643, sep. 2009. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp232>.

PÉREZ-MONTAÑO, F. *et al.* Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: from microorganism capacities to crop production. **Microbiol. Res.**, v. 169, p. 325-336, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFFLE, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 9, p. 36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36> .

PHILIPPOT, L. *et al.* Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>.

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

PICKERSKY, E. *et al.* A new member of the CAB gene family: structure, expression and chromosomal location of Cab-8, the tomato gene encoding the Type III chlorophyll a/b-binding polypeptide of photosystem I. **Plant molecular biology**, v. 12, n. 3, p. 257–270, 1989. <https://doi.org/10.1007/BF00043203>.

PII, Y. *et al.* Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00374-015-0996-1>.

PORTEOUS-ÁLVAREZ, A. J.; *et al.* (2020). Genetic Response of Common Bean to the Inoculation with Indigenous *Fusarium* Isolates. **Journal of fungi** (Basel, Switzerland), v. 6, n. 4, p. 228, 2020. <https://doi.org/10.3390/jof6040228>.

PUGLISI, E. *et al.* Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea mays* L.). **Chemosphere**, v. 77, p. 829–837, 2009.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. **Nucleic acids research**, 41(D1), D590-D596, 2012.

REDECKER, D. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. **Mycorrhiza**, v. 10, p. 73–80, 2000. <https://doi.org/10.1007/s005720000061>.

RIBEIRO, C. M.; CARDOSO, E. J. B. N. Isolation, selection and characterization of root-associated growth promoting bacteria in Brazil Pine (*Araucaria angustifolia*). **Microbiological research**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 69-78, 2012.

RIBEIRO, W. R. **Uso de *Trichoderma asperellum* e *Rhizobium tropici* na competitividade e promoção de crescimento na cultura do feijão comum.** Orientador: Klênia Rodrigues Pacheco Sá. 2020. 32 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Agronomia) - UniEVANGÉLICA, Anápolis - GO.

RIDDER-DUINE, A. S. *et al.* Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. **Soil Biol Biochem**, v. 37, p. 349-357, 2005.

ROBINSON, C.J.; BOHANNAN, B. J.; YOUNG, V. B. (2010). From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, n. 3, p. 453–476, 2010. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00014-10>.

ROUT, M. E. The Plant Microbiome. *Advances in Botanical Research*. Academic Press, v. 69, p. 279-309, 2014.

RYAN, R. P. *et al.* Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS microbiology letters**, v. 278, n. 1, p. 1-9, 2008.

- SALAMONE, I. E. G. Microbiología, bioeconomía y objetivos de desarrollo sostenible, **Revista Argentina de Microbiología**, v. 54, n. 2, p. 71-73, ISSN 0325-7541, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.05.007>.
- SANTOS, M. S.; NOGUEIRA, M. A., HUNGRIA, M. Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture. **AMB Express**, v. 9, p. 205, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0932-0>.
- SANTOYO G. *et al.* Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiol Res** v. 183, p. 92–99, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008> .
- SASSE, J.; MARTINOIA, E.; NORTHEN, T. Feed Your Friends: Do Plant Exudates Shape the Root Microbiome?. **Trends in plant science**, v. 23, n. 1, p. 25–41, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.09.003> .
- SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E. Bestimmung der anorganischen Pyrophosphatase-Aktivität. *In: Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1991. https://doi.org/10.1007/978-3-642-97284-3_38.
- SCHMITTGEN1, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v.3, p. 1101- 1108, 2008.
- SILVA, C. M. **Expressão genica diferencial do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) durante interação com a raça 65 *Colletotrichum lindemuthianum***. Orientador: Welison Andrade Pereira. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, 2019.
- SILVA, L. F.; ROMAN, T. H. **Coinoculação com *rhizobium tropici* e *rizoglopus clarum* em feijão**. Monografia (Agronomia) - Instituto Federal de Santa Catarina. Orientador: Prof. Dr. Alcione Miotto. São Miguel do Oeste. SC. 2021. 22 p.
- SINGH, I. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions: a review. *European Journal of Biological Research*, v. 8, p. 191-213, 2018. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1455995>.
- SINGH, S.; SINGH, V.; PAL, K. Importance of microorganisms in agriculture. Climate and Environmental changes: Impact, **Challenges and Solutions**, v. 1, p. 93-117, 2017.
- SMITH, S. E. *et al.* Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. **Plant Physiology**, v. 167, n. 4, p. 1670-1680, 2015.
- SMITH, S. E.; READ, D. J. **Mycorrhizal Symbiosis**. 3. ed. Academic Press, 2008. 787 p. ISBN 9780123705266. <https://doi.org/10.1016/B978-012370526-6.50001-5.3>.
- SMITH, S. E.; SMITH, F. A. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. **Annual Review of Plant Biology**, v. 62, p. 227-250, 2011.
- SOUSA, R. *et al.* Diversity and structure of bacterial community in rhizosphere of lima bean. **Applied Soil Ecology**, v. 150, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103490>.

SPENCER, B. Studies on sulphatases: 20. Enzymic leavage of arylhydrogen sulphates in the presence of H₂ ¹⁸O. *Biochemistry Journal*, v. 69, p.155–159, 1958.

STEINKELLNER, S. *et al.* Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. ***Molecules***, v. 12, n. 7, p. 1290-1306, 2007.

STEINKELLNER, S. *et al.* Flavonoids and Strigolactones in Root Exudates as Signals in Symbiotic and Pathogenic Plant-Fungus Interactions. ***Molecules***, v. 12, p. 1290-1306, 2007. <https://doi.org/10.3390/12071290>.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R. Beneficial microbial allelopathies in the root zone: the management of soil quality and plant disease with rhizobacteria. *Soil & Tillage Research*, v. 72, p. 107-123, 2003.

SUNDARAMOORTHY, S.; RAGUCHANDER, T.; RAGUPATHI, N.; SAMIYAPPAN, R. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*, Amsterdam, v. 60, p. 59-67, 2012.

TABATABAI, M. A. Soil Enzymes. *In*: Weaver, R. (Eds.), **Methods of Soil Analysis: Microbiological and Biochemical Properties**. Madison, WI: Soil Science Society of America, p. 775-833, 1994.

TABATABAI, M. A.; BREMNER, J. M. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity, ***Soil Biology and Biochemistry***, v. 1, ed. 4, p. 301-307, 1969. ISSN 0038-0717, [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1).

TABERLET, P. *et al.* (2012), Environmental DNA. ***Molecular Ecology***, v. 21, p.1789-1793, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>.

TELLES T. S.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Economic value of biological nitrogen fixation in soybean crops in Brazil. ***Environmental technology & Innovation***, v. 32, 103158. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103158>.

TING, A. S. Y. *et al.* Induction of host defence enzymes by the endophytic bacterium *Serratia marcescens*, in banana plantlets. ***International Journal of Pest Management***, London, v. 56, p. 183–188, 2010.

TIPTON, L.; *et al.* Fungi stabilize connectivity in the lung and skin microbial ecosystems. ***Microbiome***, v. 6, n. 12, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0393-0>.

TORO, M.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M. Improvement of Arbuscular Mycorrhiza Development by Inoculation of Soil with Phosphate-Solubilizing Rhizobacteria To Improve Rock Phosphate Bioavailability ((sup32) P) and Nutrient Cycling. ***Environmental Microbiology***, n. 11, v. 63, p. 4408–4412, 1997.

TORO, O.; TOHME, J.; DEBOUCK, D. **Wild bean (*Phaseolus vulgaris* L.): description and distribution**, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR), Cali, CO., 1990, 106 p.

TRABELSI, D.; MHAMDI, R. Microbial inoculants and their impact on soil microbial communities: A Review. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/863240>.

- TRIVEDI, P. *et al.* Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. **Nature reviews. Microbiology**, v. 18, n. 11, p. 607–621, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0412-1>.
- UNTERGASSER, A. *et al.* Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data. **BMC Bioinformatics**, v. 22, p. 398, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04306-1>.
- VANINSBERGHE, D. *et al.* Non-symbiotic *Bradyrhizobium* ecotypes dominate North American forest soils. **The ISME Journal**, v. 9, p. 2435–2441, 2015. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.54>.
- WALKER, T. S. *et al.* Root exudation and rhizosphere biology. **Plant Physiology**, Rockville, v. 132, p. 44–51, 2003.
- WALLENSTEIN, M. D.; VILGALYS, R.J. Quantitative analyses of nitrogen cycling genes in soils. **Pedologia**, Jena, v. 49. N. 6, p. 665-672, 2005.
- WANG, Y. *et al.* Evasion of plant immunity by microbial pathogens. **Nat Rev Microbiol**, v. 20, p. 449–464, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00710-3>.
- WANG, Y. *et al.* Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber. **Plant, Cell & Environment**, v. 16: p. 579-585, 1993. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1993.tb00906.x>.
- WESELOWSKI, B. *et al.* Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. **BMC microbiology**, v. 16, n. 1, p. 244, 2016. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0860-y>.
- WILLIAMS, A. *et al.* Root functional traits explain root exudation rate and composition across a range of grassland species. **J. Ecol.**, v. 110, p. 21–33, 2022. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13630>.
- WU, D. *et al.* Effect of Fenton pretreatment and bacterial inoculation on cellulose-degrading genes and fungal communities during rice straw composting. **The Science of the total environment**, v. 806, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151376>.
- XU, L. *et al.* Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 46, p. 26-32, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.11.010>.
- YADAV, A. N. *et al.* Plant growth promoting bacteria: Biodiversity and multifunctional attributes for sustainable agriculture. **Adv. Biotechnol. Microbiol.** 2017. <https://doi.org/10.19080/AIBM.2017.05.555671>.
- YANG, A. *et al.* Characterization and antifungal activity against Pestalotiopsis of a fusaricidin-type compound produced by *Paenibacillus polymyxa* Y-1. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 147, p. 67–74, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.08.012>.
- YOON, J. H. *et al.* *Nocardioides nitrophenolicus* sp. nov., a p-nitrophenol-degrading bacterium, **Inter. Jour. Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 49, ed. 2, 1999. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-2-675>.

ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C. M. Modulation of host immunity by beneficial microbes. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 25, n. 2, p. 139–150, 2012. <https://doi.org/10.1094/MPMI-06-11-0179>.

ZHANG, H. *et al.* A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. **The Plant Journal**, v. 58, p. 568-577, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03803.x>.

ZHANG, J. *et al.* PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, v. 30, n. 5, p. 614-620, 2014.

ZHANG, N. *et al.* Effects of intercropping and Rhizobial inoculation on the ammonia-oxidizing microorganisms in rhizospheres of maize and faba bean plants. **Applied Soil Ecology**, v. 85, p. 76–85, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.09.008>.

ZHANG, X. *et al.* Biochar-based organic fertilizer application rates for *Tetrastigma hemsleyanum* planted under Moso bamboo. **Journal of Forestry Research**, v. 31, n. 4, 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s11676-019-00965-2>.

ANEXOS

ANEXO A.

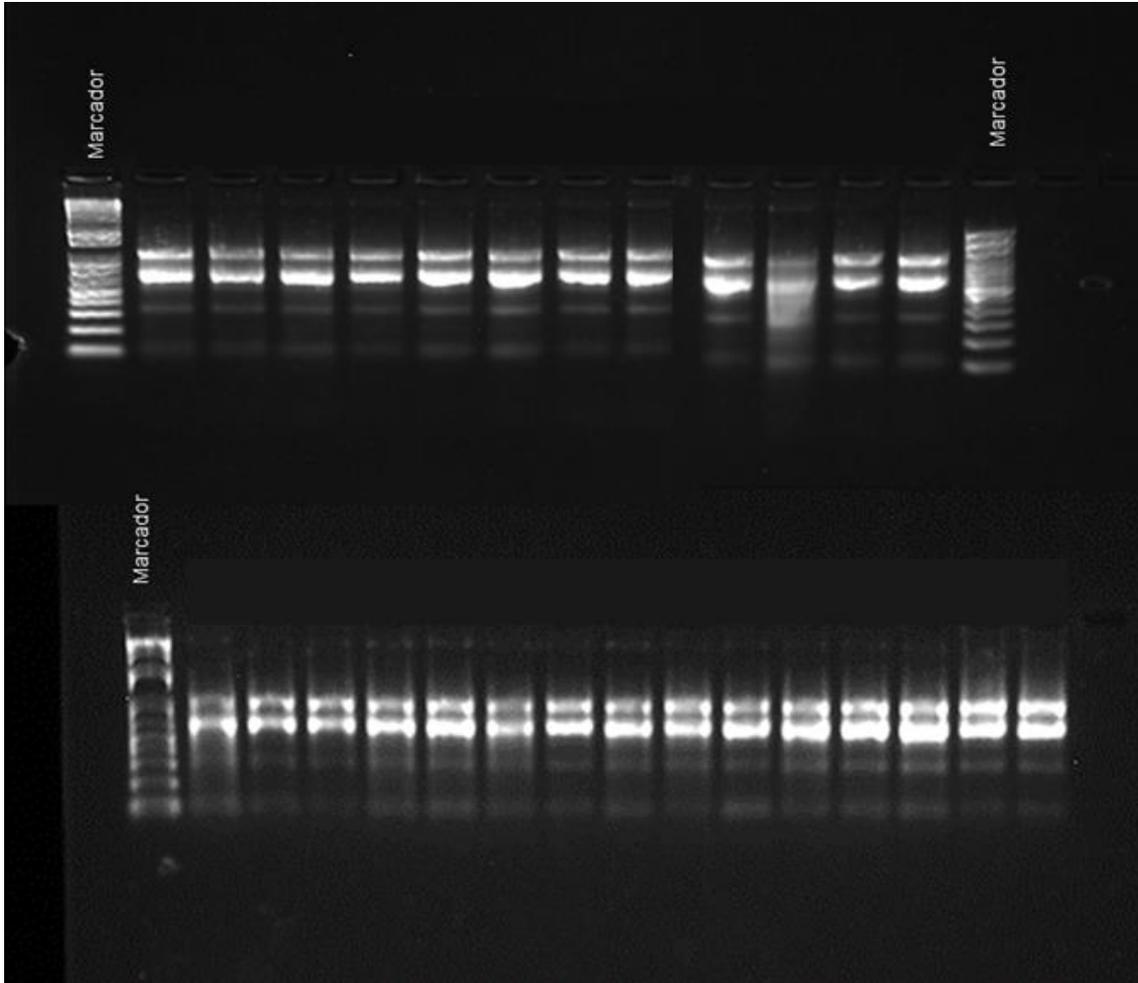


Figura Suplementar S1. Integridade do RNA total da terceira folha trifoliolada, verificada por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

ANEXO B.

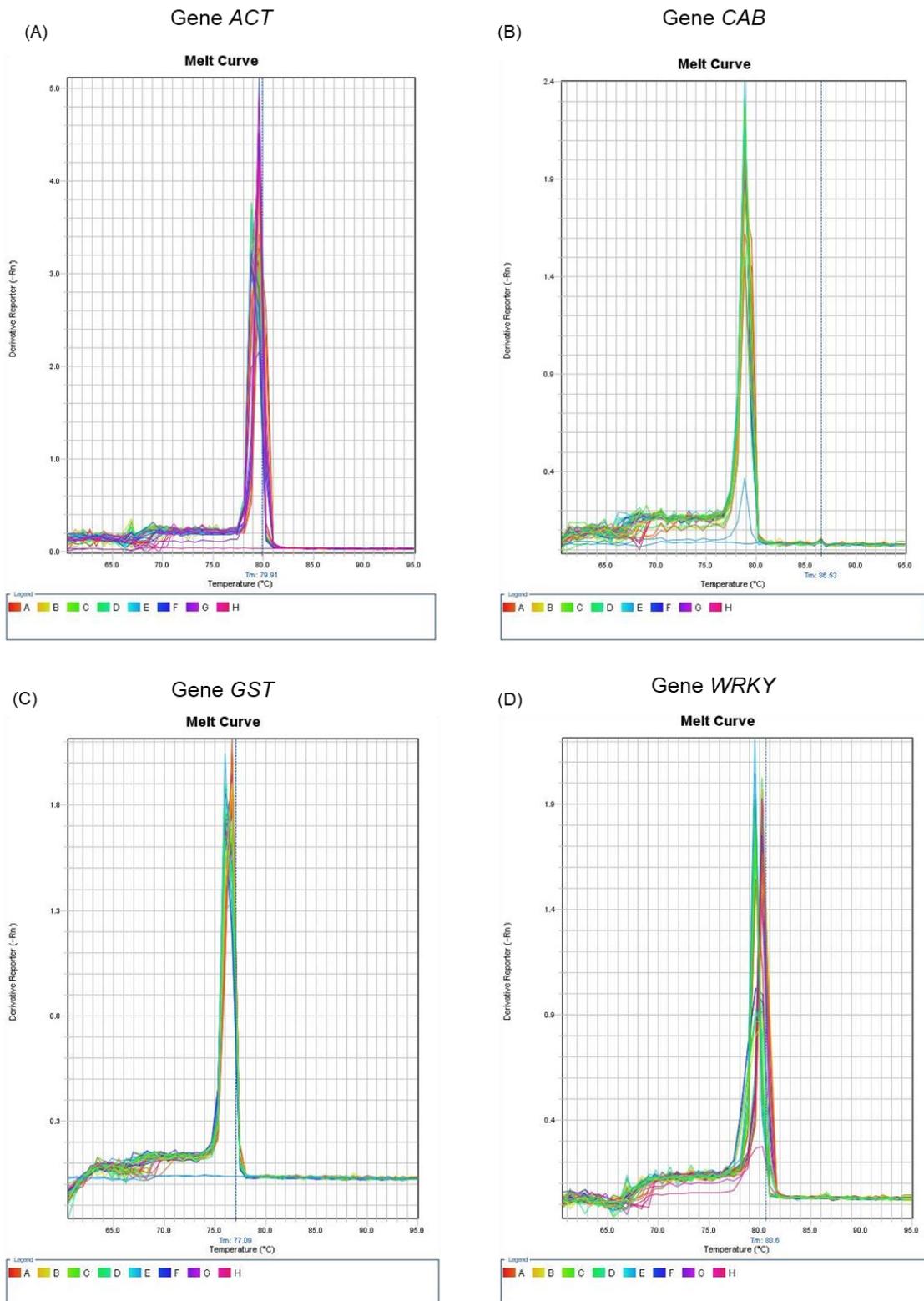


Figura Suplementar S2. Resultados da curva de *Melting* dos genes avaliados para determinação da expressão gênica de feijão. A - Actina, B - *CAB*, C - *GST* e E - *WRKY*.

ANEXO C.

Tabela Suplementar S1. Parâmetros biométricos da planta.

TRATAMENTOS	Altura (cm)	Área Foliar (cm ²)	D. Caule (dm ²)	C. Raiz (cm)	MS. Folha (g)	MS. Raiz (g)	MS. Caule (g)	MS. P. Aérea (g)	MS. Total (g)
Controle	39,7	780,4	6,4	18,8	2,1	1,2	1,5	3,6	4,9
	±2,3	±51,9	±0,8	±4,5	±0,1	±0,7	±0,2	±0,2	±0,9
<i>B. paramycoides</i>	38,1	866,5	6,9	16,1	2,3	0,7	1,6	3,9	4,4
	±4,4	±263,1	±0,2	±3,2	±0,5	±0,2	±0,5	±0,9	±1,0
<i>B. barbaricus</i>	40,7	815,3	6,2	15,2	2,2	1,0	1,8	4,6	5,2
	±6,0	±277,7	±0,8	±3,3	±0,8	±0,9	±0,8	±0,4	±1,2
<i>P. jamaicensis</i>	38,5	845,9	6,2	20,3	2,6	1,3	1,7	4,3	5,7
	±3,3	±137,4	±0,2	±6,6	±0,4	±0,6	±0,2	±0,6	±1,1
<i>P. polymyxa</i>	40,8	873,8	5,8	21,0	2,4	2,5	1,8	4,1	6,4
	±4,4	±58,4	±0,6	±5,0	±0,3	±1,4	±0,2	±0,3	±1,7
Pool Bacteriano	37,6	728,7	6,2	19,8	2,1	1,5	1,9	4,0	5,6
	±1,5	±114,7	±0,6	±5,1	±0,1	±1,1	±0,5	±0,5	±1,6

D. Caule: Diâmetro do Caule; **C. Raiz:** Comprimento de Raiz; **MS.:** Massa Seca;

Médias ± erro padrão.

Médias não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

ANEXO D.

Tabela Suplementar S2. Análise química foliar.

QUÍMICA FOLIAR	TRATAMENTOS						
	Controle	<i>B. paramycoides</i>	<i>B. barbaricus</i>	<i>P. jamilae</i>	<i>P. polymyxa</i>	Pool Bac.	
MACRONUTRIENTES	N	51,3 ^{ab} ±1,3	53,7 ^{ab} ±2,4	52,1 ^{ab} ±1,7	49,5 ^{ab} ±1,6	54,0 ^a ±2,6	49,6 ^b ±0,9
	P	3,9 ±0,4	4,3 ±0,5	4,5 ±0,5	3,8 ±0,2	4,1 ±0,3	3,9 ±0,3
	K	33,0 ±2,4	38,4 ±4,2	38,0 ±9,0	34,4 ±5,1	36,1 ±3,9	32,4 ±3,2
	Ca	24,1 ±2,7	22,1 ±3,1	20,8 ±2,7	20,7 ±1,3	22,7 ±2,5	21,6 ±1,8
	Mg	6,2 ^{ab} ±0,4	6,2 ^b ±0,3	6,4 ^{ab} ±0,2	6,3 ^{ab} ±0,3	6,8 ^a ±0,3	6,8 ^{ab} ±0,2
	S	2,0 ±0,3	2,1 ±0,3	2,1 ±0,4	2,4 ±0,1	2,1 ±0,1	2,0 ±0,3
MICRONUTRIENTES	B	35,4 ±1,1	34,9 ±4,9	31,5 ±0,0	37,8 ±6,3	34,1 ±4,2	36,4 ±3,2
	Cu	7,5 ^b ±1,0	7,3 ^b ±1,0	8,0 ^b ±1,4	43,8 ^a ±23,0	18,8 ^{ab} ±13,0	45,3 ^a ±12,1
	Fe	149,3 ^{ab} ±17,0	138,3 ^b ±15,8	158,8 ^{ab} ±26,7	191,3 ^a ±33,7	189,8 ^a ±24,9	170,0 ^{ab} ±11,6
	Mn	1166,3 ±276,8	1211,8 ±304,6	1682,5 ±488,2	1483,0 ±402,5	1425,5 ±234,5	1574,3 ±418,5
	Zn	88,3 ±19,2	84,3 ±13,5	78,0 ±10,0	72,8 ±3,2	78,8 ±9,7	73,5 ±8,2

Médias ± erro padrão.

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);

ANEXO E.

Tabela Suplementar S3. Média e desvio padrão dos parâmetros químicos do solo.

QUÍMICA DO SOLO	TRATAMENTOS						
	Bulk	Controle	<i>B. paramycoïdes</i>	<i>B. barbaricus</i>	<i>P. jamilae</i>	<i>P. polymyxa</i>	Pool Bac.
pH (CaCl ₂)	4,7 ^a ±0,05	4,5 ^b ±0,08	4,4 ^{bc} ±0,05	4,4 ^{bc} ±0,05	4,4 ^{bc} ±0,05	4,4 ^{bc} ±0,05	4,3 ^c ±0,05
M.O (g dm ⁻³)	6,5 ^b ±1,0	7,5 ^{ab} ±1,0	6,5 ^b ±1,0	6,5 ^b ±1,9	8,0 ^{ab} ±1,2	9,0 ^a ±0,0	7,0 ^{ab} ±0,0
P (mg dm ⁻³)	193,5 ^a ±45,0	87,8 ^b ±32,4	89,3 ^b ±27,2	94,5 ^b ±24,8	105,8 ^b ±17,0	118,5 ^b ±30,1	91,5 ^b ±21,0
K (mmol _c dm ⁻³)	9,2 ^a ±2,6	4,0 ^b ±0,6	3,5 ^b ±0,6	2,9 ^b ±0,2	3,7 ^b ±1,0	3,6 ^b ±0,7	3,8 ^b ±1,0
Ca (mmol _c dm ⁻³)	17,8 ^a ±6,2	10,5 ^b ±1,0	8,8 ^b ±0,5	9,3 ^b ±1,0	9,3 ^b ±1,5	11,3 ^b ±0,5	9,8 ^b ±1,7
Mg (mmol _c dm ⁻³)	10,0 ^a ±2,9	5,3 ^b ±0,5	3,8 ^b ±0,5	5,0 ^b ±0,0	5,0 ^b ±0,8	6,0 ^b ±0,0	5,3 ^b ±0,5
H+Al (mmol _c dm ⁻³)	15,8 ^{bc} ±0,5	14,5 ^c ±1,0	18,0 ^{ab} ±1,6	15,0 ^{bc} ±0,0	15,8 ^c ±0,5	19,5 ^a ±1,9	16,3 ^{bc} ±1,3
Al (mmol _c dm ⁻³)	2,8 ±0,5	2,8 ±1,0	3,8 ±0,5	3,3 ±1,0	3,8 ±1,0	3,8 ±0,5	3,8 ±0,5
SB (mmol _c dm ⁻³)	37,3 ^a ±11,6	19,8 ^b ±0,5	16,0 ^b ±0,8	17,3 ^b ±1,0	17,8 ^b ±3,1	20,8 ^b ±1,0	19,0 ^b ±1,6
CTC (mmol _c dm ⁻³)	53,0 ^a ±12,0	34,3 ^b ±1,0	34,0 ^b ±1,4	32,3 ^b ±1,0	33,5 ^b ±3,3	40,3 ^b ±1,3	35,3 ^b ±1,7
V%	69,0 ^a ±6,7	57,8 ^b ±2,5	47,0 ^c ±2,9	53,5 ^{bc} ±1,9	52,8 ^{bc} ±4,1	51,8 ^{bc} ±3,3	53,5 ^{bc} ±3,3
m%	7,5 ^b ±3,1	12,0 ^{ab} ±3,2	19,0 ^a ±2,7	15,8 ^a ±4,0	17,5 ^a ±4,0	15,3 ^a ±2,2	16,8 ^a ±2,6
S (mg/dm ³)	28,0 ^a ±9,5	15,8 ^b ±3,3	15,8 ^b ±3,0	15,5 ^b ±1,3	12,5 ^b ±3,5	18,8 ^{ab} ±1,3	17,3 ^{ab} ±5,8
Cu (mg/dm ³)	1,3 ±0,2	1,3 ±0,2	1,3 ±0,2	1,4 ±0,2	1,2 ±0,1	1,1 ±0,1	1,4 ±0,2
Fe (mg/dm ³)	22,9 ±8,9	23,7 ±2,4	26,3 ±2,6	23,9 ±1,4	23,7 ±3,9	24,2 ±2,5	25,3 ±1,4
Zn (mg/dm ³)	7,0 ^a ±2,2	3,5 ^b ±0,2	3,3 ^b ±0,5	3,7 ^b ±0,1	3,4 ^b ±0,6	3,3 ^b ±0,2	2,8 ^b ±0,5
Mn (mg/dm ³)	35,3 ±18,7	19,6 ±2,6	20,4 ±3,0	17,4 ±10,2	20,4 ±2,4	21,5 ±2,7	23,1 ±1,8
B (mg/dm ³)	0,5 ±0,5	0,2 ±0,1	0,3 ±0,0	0,2 ±0,1	0,2 ±0,0	0,2 ±0,0	0,3 ±0,2

Médias ± erro padrão.

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (p < 0,05);

ANEXO F.**Tabela Suplementar S4.** Atividade enzimática do solo.

TRATAMENTOS	Fosfatase ácida	β -glucosidase	Arilsulfatase
	-----10 - ug p-nitrofenol g ⁻¹ (de solo seco) h ⁻¹ -----		
Bulk	153,1 ^b	12,3	10,3
Controle	395,4 ^a	47,3	11,9
<i>B. paramycoides</i>	398,7 ^a	29,2	10,5
<i>B. barbaricus</i>	366,4 ^{ab}	28,3	11,1
<i>P. jamaicae</i>	370,3 ^a	70,9	12,9
<i>P. polymyxa</i>	327,8 ^{ab}	32,8	10,5
Pool Bacteriano	272,0 ^{ab}	57,5	9,7

Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$);