

Universidade Federal de São João del Rei
Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia

DENISE PACHECO DOS REIS

**PRODUTIVIDADE, ACÚMULO DE NUTRIENTES E DIVERSIDADE BACTERIANA
DA RIZOSFERA DE GENÓTIPOS DE MILHO EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO
COM *Azospirillum brasilense***

SÃO JOÃO DEL REI
MINAS GERAIS – BRASIL
MARÇO DE 2019

DENISE PACHECO DOS REIS

**PRODUTIVIDADE, ACÚMULO DE NUTRIENTES E DIVERSIDADE BACTERIANA
DA RIZOSFERA DE GENÓTIPOS DE MILHO EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO
COM *Azospirillum brasilense***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia da Universidade Federal de São João del Rei como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de “Doctor Scientiae” (D.Sc.).

SÃO JOÃO DEL REI
MINAS GERAIS – BRASIL
MARÇO DE 2019

Ficha catalográfica elaborada pela Divisão de Biblioteca (DIBIB)
e Núcleo de Tecnologia da Informação (NTINF) da UFSJ,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R375p REIS , DENISE PACHECO DOS .
PRODUTIVIDADE, ACÚMULO DE NUTRIENTES E DIVERSIDADE
BACTERIANA DA RIZOSFERA DE GENÓTIPOS DE MILHO EM
RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* /
DENISE PACHECO DOS REIS ; orientador IVANILDO
EVVÓDIO MARRIEL ; coorientador CHRISTIANE ABREU DE
OLIVEIRA PAIVA; LAURO JOSÉ MOREIRA GUIMARÃES . -- São
João del-Rei, 2019.
104 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Bioengenharia) -- Universidade Federal de São João
del-Rei, 2019.

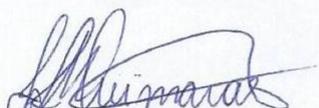
1. Diversidade bacteriana da rizosfera de milho.
2. Produtividade de grãos e acúmulo de nutrientes
em milho. 3. Uso de inoculantes a base de
Azospirillum em milho. I. MARRIEL , IVANILDO EVVÓDIO
, orient. II. , CHRISTIANE ABREU DE OLIVEIRA PAIVA;
LAURO JOSÉ MOREIRA GUIMARÃES, co-orient. III. Título.

DENISE PACHECO DOS REIS

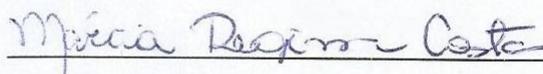
PRODUTIVIDADE, ACÚMULO DE NUTRIENTES E DIVERSIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE GENÓTIPOS DE MILHO EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense*

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Bioengenharia, da Universidade Federal de São João del Rei como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

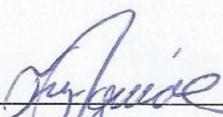
Aprovada: 29 de março de 2019



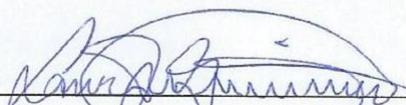
Prof^a. Dr^a. Flávia F. Mendes Guimarães
(FCV)



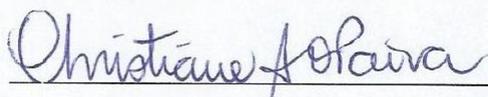
Prof^a. Dr^a. Márcia Regina da Costa
(UFVJM)



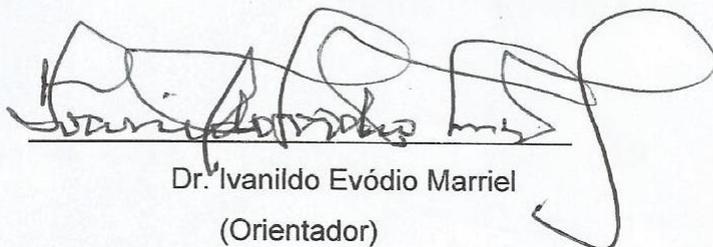
Dr. Frederick Mendes Aguiar
(Membro Externo)



Dr. Lauro José M. Guimarães
(Embrapa)



Dr^a. Christiane A. de Oliveira Paiva
(Embrapa)



Dr. Ivanildo Evódio Marriel
(Orientador)

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que torceram por mim e me ajudaram de alguma forma ao longo do tempo.

AGRADECIMENTOS

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Ao programa de Pós-Graduação em Bioengenharia e a Universidade Federal de São João del Rei pela oportunidade de formação profissional.

A Capes pela concessão da bolsa. A Embrapa Milho e Sorgo, por me dar condições para a execução do trabalho.

Ao meu Orientador Dr. Ivanildo e os co-orientadores Dr. Lauro e Dr^a. Christiane, pela confiança pela execução de trabalho, paciência e ensinamentos.

Aos professores Emanuel, Fábio e Leonardo pela oportunidade de trabalho em parceria com o Núcleo de Fixação de Nitrogênio. Ao núcleo e a UFPR. Aos estudantes que me auxiliaram nas análises. E aos amigos que fiz em Curitiba.

Aos amigos do laboratório de Microbiologia do solo e Melhoramento de Milho e outros amigos da Embrapa Milho e Sorgo.

A todos os meus familiares e amigos que sempre me incentivaram e apoiaram e também pela compreensão.

Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.

Eleanor Roosevelt

RESUMO

REIS, Denise Pacheco (DS). Universidade Federal de São João del-Rei, março de 2019. **PRODUTIVIDADE, ACÚMULO DE NUTRIENTES E DIVERSIDADE BACTERIANA DA RIZOSFERA DE GENÓTIPOS DE MILHO EM RESPOSTA À INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense***. Orientador: Ivanildo Evódio Marriel. Co-orientadores: Christiane Abreu de Oliveira Paiva e Lauro José Moreira Guimarães.

A utilização de insumos sintéticos torna-se de fundamental importância para o potencial produtivo alcançado pela agricultura moderna. Todavia a aplicação intensiva deste insumo pode comprometer a sustentabilidade agrícola na dimensão ambiental. A prática da inoculação com produto biológico à base de bactérias que apresentam a capacidade de fixar nitrogênio tem se mostrado como uma opção promissora e sustentável, tendo em vista a melhoria da produção, redução de custos de produção e baixo impacto ecológico nos agroecossistemas. Essas bactérias colonizam a rizosfera e tecidos internos das plantas promovendo benefícios às culturas agrícolas e estão em interações constantes com microrganismos autóctones. Diante desse cenário, objetivou-se avaliar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre a diversidade bacteriana da rizosfera de diferentes híbridos de milho, o acúmulo de nutrientes e a produtividade de grãos. Utilizou-se diferentes genótipos de milho inoculados com uma mistura de três estirpes de *Azospirillum brasilense*. A diversidade bacteriana foi estimada em amostras de DNA total extraído do solo rizosférico, após o sequenciamento de segunda geração. O acúmulo de nutrientes e a produtividade foram mensurados na fase de florescimento e final do ciclo respectivamente. Os resultados da análise metagenômica mostraram que a composição e estrutura variam em função do genótipo da planta e do inoculante, mas existem alterações principalmente na abundância de alguns filos e gêneros presentes nas amostras de solo. Houve ganhos de produtividade de grãos e de acúmulo de nutrientes em função da inoculação dos genótipos avaliados. Portanto, conclui-se que a formação da estrutura e composição da comunidade bacteriana do solo rizosférico das plantas foi dependente da inoculação com *Azospirillum brasilense* e do genótipo da planta. As características agronômicas do milho (Produtividade e acúmulo de nutrientes) são influenciadas pelo uso de inoculantes.

Palavras-chave: *Zea mays L*; metagenoma; biodiversidade; Fixação Biológica de Nitrogênio.

ABSTRACT

The use of synthetic inputs is of fundamental importance for the productive potential achieved by modern agriculture. However, the intensive use of this input can compromise agricultural sustainability in the environmental dimension. The practice of inoculation with a biological product based on bacteria that can fix nitrogen has shown to be a promising and sustainable option, to improve production, reduce production costs and low ecological impact in agroecosystems. These bacteria colonize the rhizosphere and internal plant tissues promoting benefits to crops and are in constant interactions with autochthonous microorganisms. The objective of this scenario was to evaluate the effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on the bacterial diversity of the rhizosphere of different corn hybrids, nutrient accumulation, and grain yield. Different maize genotypes inoculated with a mixture of three strains of *Azospirillum brasilense* were used. Bacterial diversity was estimated in samples of total DNA extracted from rhizospheric soil after second-generation sequencing. The nutrient accumulation and productivity were measured in the flowering phase and at the end of the cycle, respectively. The results of the metagenomic analysis showed that the composition and structure vary according to the genotype of the plant and the inoculant, but there are changes mainly in the abundance of some phyla and genera present in the soil samples. There were gains in grain yield and nutrient accumulation as a function of the inoculation of the evaluated genotypes. Therefore, it is concluded that the formation of the structure and composition of the bacterial community of the rhizospheric soil of the plants was dependent on the inoculation with *Azospirillum brasilense* and the plant genotype. The agronomic characteristics of corn (Productivity and accumulation of nutrients) are influenced by the use of inoculants

Keywords: *Zea mays L;* metagenome; biodiversity; Biological Fixation of Nitrogen.

LISTA DE FIGURA

- Figura 1- Complexo da nitrogenase. A conversão de N_2 em NH_3 é feita pela proteína Fe-Mo. Podendo também ser produzido hidrogênio gasoso (H_2) rico em energia também pode ser gerado. A energia da conversão de ATP para ADP junto com os elétrons da ferredoxina faz a redução do Fe III na menor proteína de ferro. Durante isso, na proteína Fe-Mo os aglomerados de molibdênio-ferro-enxofre, capturam nitrogênio (N_2) do ar, enquanto o Fe nos aglomerados recebe os elétrons (e^-) fornecidos pela proteína Fe para que o N_2 possa ser reduzido a NH_3 . FONTE: Adaptado de Weil; Brady, 2017 Imagens de Raymond R Weil. 6
- Figura 2- *Azospirillum brasilense* em microscopia de Imagem: Krieg and Döbereiner, Bergey's Trust, 1995. 12
- Figura 3- Distribuição de doze filios encontrados em solo rizosférico de plantas de milho inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense* 28
- Figura 4- Abundância relativa do filo Actinobacteria em diferentes genótipos de milho inoculados e não inoculados. Média seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott ($P < 0.05$). 29
- Figura 5- Filo Candidatus Berkelbacteria significativamente diferente na sua abundância entre os tratamentos BRS1055 e BRS1055+Ino pelo teste t de Welch ($p < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos filios são apresentados. 30
- Figura 6- Filios significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos DKB310 e DKB310+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos filios são apresentados. 30
- Figura 7- Filios significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos DKB390 e DKB390+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos filios..... 31
- Figura 8- Distribuição de quinze gêneros encontrados em solo rizosférico de plantas de milho inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense* 31
- Figura 9 - Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos BRS1040 e BRS1040+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos filios são apresentados. 32
- Figura 10- Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos BRS1055 e BRS1055+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos filios são apresentados. 32
- Figura 11- Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos DKB310 e DKB310+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos gêneros são apresentados. 34

- Figura 12- Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos DKB390 e DKB390+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos gêneros são apresentados..... 34
- Figura 13- Curva de Rarefação baseada em OTUs observadas, para riqueza e biodiversidade. 35
- Figura 14- Distribuição de quinze gêneros fixadores de nitrogênio encontrados em solo rizosférico de plantas de milho inoculadas ou não com *Azospirillum* brasilense.35
- Figura 15- SPAD (unidades SPAD) entre os diferentes tipos de Híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 63
- Figura 16- SPAD (unidades SPAD) para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum* . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 64
- Figura 17-Teor de N entre tratamentos -híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum* brasilense Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 66
- Figura 18-Teor de N entre híbridos sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott 66
- Figura 19-Teor de N para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum* . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott. 67
- Figura 20-Teor de P entre tratamentos -híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 67
- Figura 21-Teor de P em Híbridos de milho não inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott. 68
- Figura 22-Teor de P em Híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott. 68
- Figura 23- Teor de P para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum* . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott. 69
- Figura 24-Teor de K entre tratamentos -híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 69

- Figura 25-Massa seca (MASP) entre tratamentos -híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 71
- Figura 26- Massa seca (MASP) em Híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott. 72
- Figura 27-Massa seca (MASP) para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum* . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5%..... 72
- Figura 28-N-total entre tratamentos -híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 73
- Figura 29- N-total em Híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.. 73
- Figura 30- N-total para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum* . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5%.pelo teste de Scott Knott. 74
- Figura 31-P-total entre tratamentos -híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 74
- Figura 32- P-total em Híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.. 75
- Figura 33- P-total para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum* . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5%. 75
- Figura 34-K-total entre tratamentos -híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 77
- Figura 35- K-total em Híbridos de milho inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.. 78
- Figura 36- K-total para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum* . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5%. 78

Figura 37- Produtividade de grãos entre tratamentos -híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 79

Figura 38-Produtividade de grãos em Híbridos de milho não inoculados com *Azospirillum* brasilense. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott..... 79

Figura 39- Produtividade de grãos para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum* . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5%..... 80

Figura 40 - Produtividade relativa de grãos em relação a tratamentos inoculados e não inoculados. 80

LISTA DE TABELA

- Tabela 1- Resumo das análises de variância os gêneros: *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Massilia*, *Azohydromonas*, *Noviherbaspirillum*, *Noviherbaspirillum*, *Anaeromyxobacter*, *Roseiflexus*, *Devosia*, *Microvirga* e *Rhizobium*..... 36
- Tabela 2- Resumo das análises de variância para as características, altura de planta (AP), altura de espiga (AE) e Índice de SPAD (SPAD) avaliados em híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*..... 63
- Tabela 3- Resumo das análises de variância para as características, Teor de N (%), Teor de P (g/Kg) e Teor de K (g/Kg) avaliados em híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*..... 65
- Tabela 4-Resumo das análises de variância para as características, Massa seca (MASP-Kg.ha⁻¹), N-Total (Kg.ha⁻¹) e P-Total (Kg.ha⁻¹) avaliados em híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*..... 71
- Tabela 5-Resumo das análises de variância para as características K-Total (Kg.ha⁻¹) e P-total (Kg.ha⁻¹) e Produtividade (Kg.ha⁻¹) avaliados em híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*..... 77

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. REFERÊNCIAS.....	2
2. CAPÍTULO I- REVISÃO BIBLIOGRAFICA	4
2.1. A CULTURA DO MILHO.....	4
2.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	5
2.3. GENE <i>nifH</i>	6
2.4. ANÁLISES MOLECULARES EM MICRORGANISMOS.....	7
2.5. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS.....	9
2.6. GÊNERO <i>Azospirillum</i>	11
2.7. REFERÊNCIAS.....	12
3. CAPÍTULO II- INOCULAÇÃO COM <i>Azospirillum brasilense</i> AFETA A COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFÉRA DE GENÓTIPOS DE MILHO, AVALIADA VIA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.	21
3.1. RESUMO.....	21
3.2. INTRODUÇÃO.....	22
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.3.1. Instalação do experimento de Campo	24
3.3.2. Preparo do inoculante	24
3.3.3. Coleta e preparo de amostras de solo rizosférico	25
3.3.4. Extração de DNA e quantificação	25
3.3.5. Amplificação da região 16S rDNA e construção da biblioteca	25
3.3.6. Avaliação da diversidade taxonômica bacteriana	26
3.3.7. Análise estatísticas	27
3.4. RESULTADOS.....	27
3.5. DISCUSSÃO.....	37
3.6. CONCLUSÃO.....	42
3.7. REFERÊNCIAS.....	43
4. CAPÍTULO III- GANHOS DE PRODUTIVIDADE E ACÚMULO DE NUTRIENTES EM FUNÇÃO DO GENÓTIPO DE MILHO E INOCULAÇÃO COM <i>Azospirillum brasilense</i>.	56
4.1. RESUMO.....	56
4.2. INTRODUÇÃO.....	57
4.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.3.1. Instalação experimental	58
4.3.2. Preparo do inoculante	59
4.3.3. Características agronômicas avaliadas	59

4.3.4. Análises estatísticas	62
4.4. RESULTADOS.....	62
4.5. DISCUSSÃO	81
4.6. CONCLUSÃO	83
4.7. REFERÊNCIAS	84

1. INTRODUÇÃO GERAL

Quando se leva em consideração os aspectos socioeconômicos, o milho é uma das mais importantes culturas do setor agrícola brasileiro, uma vez que é produzido em todo território nacional e utilizado em vários processos como fabricação de etanol, rações animais e também na alimentação humana. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB 2018), em seu 2º levantamento da safra 2018/2019, a área plantada de milho está estimada em torno de 16.657 de hectares, com uma produção de 90 milhões de toneladas de grãos.

Atualmente existem desafios em manter os altos padrões produtivos da agricultura, sem desconsiderar seus impactos econômicos e ambientais. Dentre os fatores de produção agrícola, o uso intensivo da adubação, especialmente da nitrogenada, responde por uma parcela significativa dos custos para o produtor e dos impactos negativos sobre a sustentabilidade do agronegócio nacional na dimensão ecológica (Guo *et al.* 2016). Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento e otimização de tecnologias que atendam às exigências nutricionais das plantas, dentro dos preceitos de uma agricultura de baixo custo e ambientalmente amigável. Neste cenário, destaca-se o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) como fonte de nitrogênio às plantas a partir de recursos renováveis. Vale salientar que este processo constitui um dos pilares do plano ABC- Agricultura de Baixo Carbono, que compreende um conjunto de ações de políticas públicas que visam promover a ampliação da adoção de tecnologias agropecuárias sustentáveis com alto potencial de mitigação das emissões de gases de efeito estufa e de combate ao aquecimento global (Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2012).

A Fixação Biológica de Nitrogênio é um processo natural que transforma o nitrogênio atmosférico (N_2) em amônia (NH_3), realizado por microrganismos conhecidos como diazotróficos. Diazotróficos são considerados os microrganismos que possuem o complexo da enzima nitrogenase, que quebra a tripla ligação entre as moléculas no nitrogênio atmosférico (Hu & Ribbe 2013). Esse processo é de grande importância na interação planta-microrganismo, pois resulta em efeitos benéficos na promoção do crescimento vegetal, propriedades químicas, físicas e biológicas do solo e, conseqüentemente, na produtividade dos sistemas agrícolas.

A simbiose com fixadores na cultura da soja pode ser facilmente identificada pela formação de nódulos no sistema radicular que, quando se encontram em extrema atividade de fixação, apresenta coloração rósea intensa pela ação da leghemoglobina. Atualmente, toda a necessidade da soja por N é provida através da FBN (Hungria *et al.* 2007).

De modo geral, observa-se elevada diversidade de bactérias diazotróficas em associação com plantas não leguminosas. Dentre as mais estudadas destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus*, *Acetobacter* e *Burkholderia* (Doornbos *et al.* 2012)

Os microrganismos diazotróficos têm sido empregados como inoculantes em diferentes culturas e ambientes em vários países, como alternativa para substituição/complementação de fertilizantes sintéticos. Com incrementos de até 30% na produtividade de culturas como milho, trigo, arroz e sorgo (Hungria *et al.* 2010). Vale salientar que os benefícios da inoculação envolvem mecanismos diversos, além da fixação biológica, que são modulados pelo genótipo da planta e da bactéria inoculada, além de fatores abióticos, conforme observado por Farina (2012) e Reis & Teixeira (2005).

Diante desse cenário, esse trabalho se justifica por se tratar da identificação da contribuição da FBN em milho de modo a selecionar bactérias e genótipos que apresentem boa interação, resultando em uma melhor produtividade e redução na utilização de adubos químicos nitrogenados. Assim como avaliar o efeito do inoculante à base de *Azospirillum brasilense* sobre a diversidade bacteriana da rizosfera.

1.1. REFERÊNCIAS

- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2018): Acompanhamento da safra brasileira. : 1–142. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>> Acesso em Dez de 2018
- DOORBOS, R.F.; VAN LOON, L.C.; BAKKER, P.A.H.M. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 227–243.

- FARINA, R. (2012). Diversidade de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à cultura de canola (*Brassica napus* L .) cultivada no município de Vacaria , Rio Grande do Sul. 104f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS.
- GUO, C.; LI, P.; LU, J.; REN, T.; CONG, R.; LI, X. (2016): Application of controlled-release urea in rice: reducing environmental risk while increasing grain yield and improving nitrogen use efficiency. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 47: 1176–1183.
- HU, Y. & RIBBE M.W. (2013). Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 13173–13177.
- HUNGRIA, M.; CAMPO R.J.; MENDES I.C. (2007). A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro. *Comunicado técnico* 283: 1–79.
- HUNGRIA, M.; CAMPO R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil* 331: 413–425.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (2012): Plano setorial de mitigação e de adaptação às mudanças climáticas para a consolidação de uma economia de baixa emissão de carbono na agricultura. Biblioteca Nacional de Agricultura-BINAGRI (Ed). Brasília-DF. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/plano-abc/arquivo-publicacoes-plano-abc/download.pdf> > Acesso em Dez de 2018.
- REIS, V.M. & TEIXEIRA, K.R.S. (2005) Fixação Biológica de Nitrogênio – Estado da Arte. In: A. M. DE AQUINO AND R. L. DE ASSIS (Eds), *Miolo_Biota.pmd*. Processos Biológicos do Sistema Solo-Planta, Brasília, p. 151–180.

2. CAPÍTULO I- REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1. A CULTURA DO MILHO

O milho é um cereal de grande relevância econômica e social em padrão mundial e mostra-se como uma das espécies de plantas mais estudadas e a que mais auxilia para o estudo dos princípios essenciais como: genéticos, bioquímicos e fisiológicos (Vittorazzi *et al.* 2013). É uma gramínea da espécie *Zea mays* L. e seus grãos apresentam alta qualidade nutritiva. Seu cultivo iniciou-se a 7.000 ac, com possível origem mexicana (Bertolini *et al.* 2005). Após ser descoberto, foi levado para Europa, onde foi plantado em jardins até que sua qualidade nutritiva tornou-se conhecida (Okumura *et al.* 2012).

O ciclo vegetativo no Brasil varia de 110 a 160 dias conforme a caracterização dos genótipos (superprecoce, precoce e tardio - fase referente ao período entre a semeadura e o ponto de maturidade fisiológica). Assim para uma maior exatidão do manejo adequado é importante levar em consideração a fenologia do milho. (Fancelli 2015). Outra característica importante do milho é em relação ao seu metabolismo, essa gramínea tropical, apresenta-se com uma planta C4, habituada a intensidade luminosa e altamente produtiva em desvantagem pelo grande consumo energético (Bergamaschi *et al.* 2004)

Os maiores produtores mundiais desse grão são responsáveis por 56% da produção global, sendo eles os Estados Unidos, China e Brasil (United States Department of Agriculture 2019). No Brasil, o milho é a segunda cultura de maior importância econômica, ficando atrás apenas da soja. Os estados com maior produção do cereal são Mato Grosso, Paraná e Mato Grosso do Sul (CONAB, 2019). Em terras brasileiras a lavoura acontece em duas safras, podendo ocorrer plantio e colheita simultâneo em diferentes regiões do país. A produção ocorre o ano inteiro.

2.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O processo de fixação biológica de nitrogênio pode ser definido como a transformação do nitrogênio molecular da atmosfera (N_2) em amônia através da ação de microrganismos. Este processo biológico está restrito aos microrganismos dotados do sistema enzimático nitrogenase, que é a enzima de maior importância integrada ao mecanismo de FBN (Sur's *et al.* 2010). No presente momento, têm se conhecimento de três tipos de nitrogenase: um que possui molibdênio (Mo, nitrogenase-1) e ferro (Fe); outro em que o vanádio (V) substitui o Mo (nitrogenase-2); e um terceiro, que só tem ferro (nitrogenase-3) (Ajith 2019; Reis & Teixeira 2005). Sendo a mais estudada a do tipo 1 que apresenta em sua conformação Fe-Mo.

A regulação dessa enzima e sua composição são geradas por um conjunto de genes *nif* (*nitrogen fixation*) que codificam as proteínas do complexo enzimático: *nifD*, *nifK* e *nifH*, dentre outros (Dixon & Kahn 2004; Sarita *et al.* 2008).

O complexo nitrogenase é constituído de dois componentes básicos: (i) proteína Fe (homodímero-dinitrogenase redutase γ_2), que conduz elétrons para a segunda proteína e (ii) a (heterotetrâmero, dinitrogenase $\alpha_2\beta_2$) que possui o sítio ativo (Figura 1) (Ivleva *et al.* 2016; Seefeldt *et al.* 2009).

A Proteína ferro é constituída de duas subunidades gama idênticas de peso molecular 57 e 72KDa. Já a molibdênio-ferro tem massa molecular médio de 220KDa (Cassetari 2015).

A nitrogenase apresenta sensibilidade a elevadas concentrações de oxigênio, o que faz com que os microrganismos criem mecanismos de defesa. Um exemplo disso ocorre em plantas leguminosas para as quais, além do córtex do nódulo ser um impedimento contra a entrada de oxigênio, as leghemoglobinas agem fazendo a retirada do O_2 presente no meio, reduzindo suas concentrações (Cheng 2008; Dixon & Kahn 2004; Fagan *et al.* 2007). Em muitos microrganismos diazotróficos ocorre a inibição da atividade da enzima pela adição de NH_4^+ de forma rápida e reversível (Reis & Teixeira 2005).

O processo da fixação biológica de N_2 (FBN) é representado pela seguinte equação (Hu & Ribbe 2013).

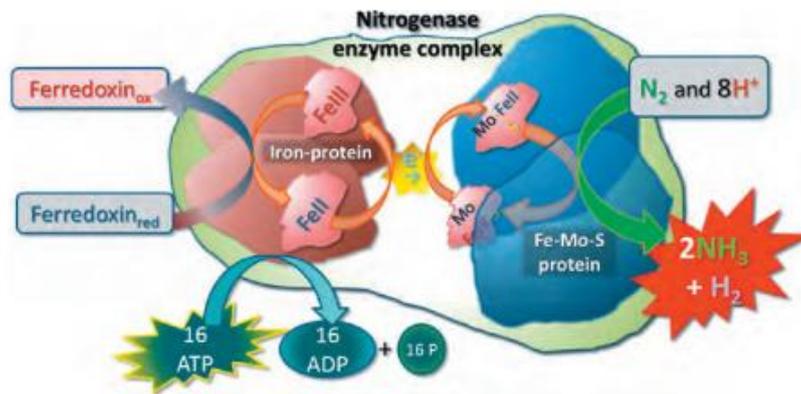
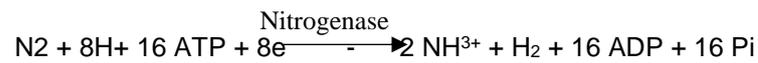


Figura 1- Complexo da nitrogenase. A conversão de N_2 em NH_3 é feita pela proteína Fe-Mo. Podendo também ser produzido hidrogênio gasoso (H_2) rico em energia também pode ser gerado. A energia da conversão de ATP para ADP junto com os elétrons da ferredoxina faz a redução do Fe III na menor proteína de ferro. Durante isso, na proteína Fe-Mo os aglomerados de molibdênio-ferro-enxofre, capturam nitrogênio (N_2) do ar, enquanto o Fe nos aglomerados recebe os elétrons (e^-) fornecidos pela proteína Fe para que o N_2 possa ser reduzido a NH_3 . FONTE: Adaptado de Weil; Brady, 2017 Imagens de Raymond R Weil.

2.3. GENE *nifH*

A codificação da nitrogenase é realizada por um conjunto de genes específicos. Estes foram identificados pela primeira vez em *Klebsiella pneumoniae* (Cannon *et al.* 1976). Inicialmente foram descritos um conjunto de 19 genes dispostos em uma região de 24Kbp, organizados em 8 operons no genoma da bactéria, envolvidos no processo de biossíntese e transcrição da enzima (Merrick 1992).

Estudos realizados a partir da filogenia obtida de genes *nif* apresentaram-se semelhantes à adquirida pela filogenia baseada no gene 16s RNAr. Diante disso, o gene *nif* passou a ser utilizado na caracterização da diversidade de bactérias diazotróficas (Zehr *et al.* 2003). Assim, o estudo da comunidade diazotrófica pode ser

baseado na detecção, quantificação e análise da diversidade desses genes (Silva *et al.* 2011).

Diferentes trabalhos que utilizam técnicas tradicionais baseadas em PCR têm sido empregados para caracterizar microrganismos diazotróficos porque através delas é possível o monitoramento de estirpes de bactérias específicas como as que possuem os genes responsáveis pela nitrogenase, sendo mais utilizado o *nifH* (Raymond *et al.* 2004; Roesch 2007).

O *nifH* está presente em apenas um determinado grupo de fixadores, portanto, sua presença tem sido utilizada para monitorar a ocorrência de microrganismos fixadores de N₂ (Sugitha & Kumar 2009), sendo considerado um dos genes funcionais mais antigos, relacionados à evolução genética de microrganismos diazotróficos (Ueda *et al.* 1995). Sua evolução foi semelhante a do gene rRNA 16S, podendo também ser usado como marcador molecular (Young 1992; Haukka *et al.* 1998)

Dentre os que estão envolvidos no processo de FBN, o gene *nifH* é o que apresenta o maior número de sequências depositadas em bancos de dados, como o do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Sendo também o gene marcador central em estudos que analisam a diversidade, abundância e filogenia da microbiota de fixadores de nitrogênio, existindo vários primers específicos desenhados para que o fragmento desse gene seja amplificado desde amostras ambientais de ecossistemas (Gaby & Buckley 2012).

2.4. ANÁLISES MOLECULARES EM MICRORGANISMOS

A existência de microrganismos remonta aproximadamente 4 bilhões de anos, porém, a maior parte da sua diversidade é ainda desconhecida, apesar do emprego de técnicas modernas da biologia molecular (Melo & Toczyski 2002). Através delas foi possível um avanço nos estudos de identificação e caracterização dos microrganismos, tanto com relação ao conhecimento de novas espécies e de suas funções, quanto com relação ao estudo da diversidade e da ecologia microbiana (Schmidt 2006).

A diversidade das bactérias tem sido estudada através de técnicas de cultivo associadas a técnicas moleculares, como o sequenciamento completo ou parcial do gene 16S rRNA, a fim de estabelecer suas relações filogenéticas (Jarvis *et al.* 1992). Entre as técnicas moleculares usadas estão: a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), análises de diversidade por T-RFLP e sequenciamentos através dos NGS (*Nex Generation Sequence*).

A qPCR é uma variação da PCR convencional. Diferente do que ocorre na PCR qualitativa, a amplificação e detecção das cópias de DNA/RNA ocorrem simultaneamente, podendo ser visualizado em tempo real. A quantificação é medida pela quantidade de produto amplificado a cada ciclo. Essa detecção ocorre pela emissão de moléculas fluorescentes.

A análise de polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição terminal (T-RFLP) de genes amplificados por PCR é uma técnica de impressão digital baseada na digestão com enzimas de restrição de produtos da PCR marcados com fluorescência e separados pela eletroforese capilar ou em gel através de um sequenciador automatizado. Ao final, apenas os fragmentos de restrição marcados com os terminais são detectados. O resultado é o perfil da comunidade composto por uma série de picos de diferentes alturas que é a representação do eletroferograma (Tiquia-Arashiro 2010).

O sequenciamento de nova geração realiza o sequenciamento do DNA total em plataformas capazes de gerar milhões de pares de bases em uma única corrida, com uma velocidade bem maior. O que caracteriza uma vantagem sobre os sequenciadores mais antigos.

Devido ao potencial de aumento de produção em diversas culturas agrícolas, por meio da FBN ou produção de hormônios vegetais, atualmente dá-se uma grande importância em estudos de caracterização de organismos fixadores através de diferentes técnicas moleculares (Roesch 2007).

2.5. BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO DE PLANTAS

Microrganismos são de extrema importância para a manutenção da biodiversidade. Eles realizam diferentes funções para manter a homeostase no ecossistema. No cenário agrícola, destaca-se cada vez mais a interação planta-microrganismos-solo. Da qual se pode citar a associação entre plantas e bactérias que promovem o crescimento vegetal, conhecidas como Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas (BPCP).

As BPCP compreendem as que possuem vida livre, que estabelecem associações simbióticas específicas com plantas, podem ser também endofíticas, colonizando tecidos internos das plantas e as cianobactérias. Todas essas bactérias empregam o mesmo mecanismo de promoção de crescimento (Glick 2012; Santoyo *et al.* 2016). Todavia, algumas apresentam a capacidade de sintetizar a enzima ACC-desaminase que degenera o iniciador direto do etileno em plantas- ACC (Onofre-Lemus *et al.* 2009). A limitação da síntese do etileno traz como resultado a retomada do desenvolvimento da planta, fundamental para o êxito da associação (Bhattacharyya & Jha 2012).

Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas desempenham resultados benéficos sobre os vegetais, principalmente sobre o índice de germinação de sementes, no desenvolvimento e crescimento, na formação de flores e no produto de culturas de importância agrícola (Alekhya & Gopalakrishnan 2017). Desta maneira, o sinergismo existente entre os mecanismos de dinâmica dessas bactérias tem como resultado um maior desenvolvimento radicular e conseqüentemente uma melhor utilização do solo e assimilação de nutrientes (Hungria *et al.* 2010).

As culturas que são inoculadas com essas bactérias representam apenas uma pequena parcela da atividade agrícola mundial. Dentro das estirpes comercializadas estão: *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum lipoferum*, *Azotobacter chroococcum*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus*, *Bacillus subtilis* var, *Amyloliqefaciens*, *Burkholderia cepacia*, *Paenobacillus macerans*, *Pseudomonas*., *Pseudomonas aureofaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas solanacearum*, *Delfitia acidovorans*, *Pantoea agglomerans*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces lydicus* e *Serratia entomophila*, *Rhizobia spp.* (Glick 2012; Olivares *et al.* 2017).

Os estímulos usados pelas BPCP para promover o crescimento das plantas, abrangem a disponibilidade de nutrientes originários de processamento genéticos como: a solubilização de fosfato, a fixação biológica de nitrogênio, produção de sideróforos, supressão da produção do hormônio como etileno e produção de fitormônios (auxinas, citocininas e giberelinas) entre muitos outros (Abhilash *et al.* 2016; Souza *et al.* 2015). Com relação aos mecanismos remotos pode-se citar a inibição de patógenos por meio da formação de antibióticos ou enzimas líticas da parede celular, como por exemplo quitinases e incitando mecanismos de defesa da planta (Sarma *et al.* 2015).

Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas, também apresentam a capacidade de minimizar efeitos prejudiciais dos estresses ambientais nos solos. Dentre esses estresses pode-se citar a poluição por metais pesados e outros compostos inorgânicos (Ma *et al.* 2011) ou por poluentes orgânicos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Vílchez *et al.* 2016) e também a elevada concentração de sais (Nadeem *et al.* 2010).

Entretanto, a eficiência desses microrganismos pode ser afetada por diferentes fatores, entre eles a qualidade e quantidade de bactérias inoculadas, a estirpe, o método usado para inoculação, o genótipo da planta, a etapa de crescimento do vegetal no momento da inoculação, circunstâncias edafo-climáticas do ambiente, relação com a microbiota natural, fitossanidade das plantas, adição inapropriada de nutrientes no solo por meio da fertilização, entre outros fatores (Matsumura *et al.* 2015).

Entre os passos para avanços do uso de inoculantes à base de BPCP está não somente a produção e uso em larga escala, mas também a educação popular sobre o fato que bactérias também podem apresentar benefícios para as plantas (Glick 2012).

2.6. GÊNERO *Azospirillum*

Dentre os microrganismos fixadores de N encontrados em associações com Poaceae, as espécies do gênero *Azospirillum* constituem um dos grupos mais estudados (Hartmann & Baldani 2006) e em relação a espécie o *Azospirillum brasilense* (Figura 2) é uma das espécies com maior esforço em pesquisa.

O gênero foi descrito inicialmente por Beijerinck em 1.925 como *Spirillum lipoferum* e reclassificado como *Azospirillum* em 1978 (Tarrand *et al.* 1978) e o conhecimento de sua interação com diversos hospedeiros experimentou ampla expansão mundial na década de 70.

Atualmente, são descritas 20 espécies do gênero: *Azospirillum lipoferum*; *Azospirillum brasilense* (Tarrand *et al.* 1978); *Azospirillum amazonense* (Magalhães *et al.* 1983); *Azospirillum halopraeferans* (Reinhold *et al.* 1987); *Azospirillum irakense* (Khammas *et al.* 1989); *Azospirillum largimobile* (Dekhil *et al.* 1997); *Azospirillum doebereineriae* (Eckert *et al.* 2001); *Azospirillum oryzae* (Xie & Yokota 2005); *Azospirillum melinis* (Peng *et al.* 2006); *Azospirillum zaeae* (Mehnaz *et al.* 2007); *Azospirillum canadense* (Mehnaz *et al.* 2007); *Azospirillum rugosum* (Young *et al.* 2008); *Azospirillum picis* (Lin *et al.* 2009); *Azospirillum palatum* (Zhou *et al.* 2009), *Azospirillum thiophilum* (Lavrinenko *et al.* 2010); *Azospirillum formosense* (Lin *et al.* 2012); *Azospirillum humicireducens* (Zhou *et al.* 2013); *Azospirillum fermentarium* (Lin *et al.* 2013), *Azospirillum soli* (Lin *et al.* 2015) ; *Azospirillum agricola* (Lin *et al.* 2016).

Azospirillum pertence à subdivisão alfa das Proteobactérias (Young 1992) e são Gram negativas. Suas células exibem formato vibrio e/ou espirilo e regularmente com um único flagelo polar e vários laterais de extensão menor e alta mobilidade (Rosenberg *et al.* 2014) (Figura 2). Este gênero também apresenta preferência por determinadas fontes de carbono, tendo como as mais usadas frutose e glicose, piruvato, succinato e malato (Hartmann & Baldani 2006).

A distribuição geográfica desse microrganismo é vasta, sendo encontrada em diferentes partes do mundo, podem associar com várias espécies de plantas como: milho, arroz, trigo, cana de açúcar, frutíferas e diversas forrageiras (Tortora *et al.* 2012).

No Brasil, o *Azospirillum* tem sido empregado como inoculante para a redução da adubação nitrogenada em diferentes culturas. De acordo com Hungria *et al.* (2010),

levando em consideração a substituição de 50% do fertilizante nitrogenado para o milho, gera uma economia em torno de 52 kg de N ha⁻¹ em 14,1 milhões de ha; já para o trigo a economia é de aproximadamente de 35 kg de N ha⁻¹ em 2,4 milhões ha. Assim, obter resultados que se assemelham a esses é de grande importância econômica e ambiental.

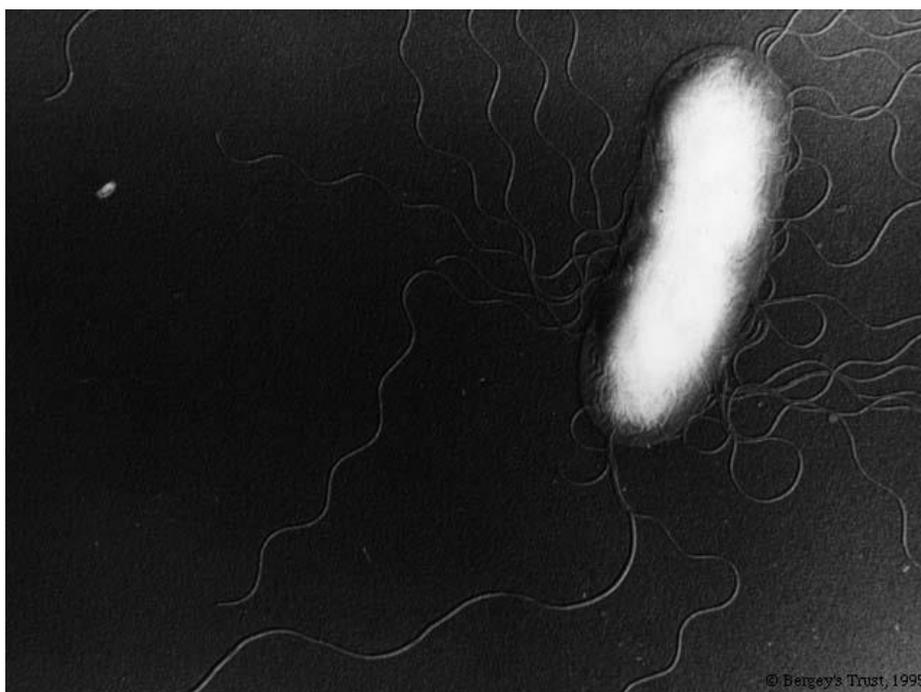


Figura 2- *Azospirillum brasilense* em microscopia da Imagem: Krieg and Döbereiner, Bergey's Trust, 1995.

2.7. REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P.C.; DUBEY, R.K.; TRIPATHI, V.; GUPTA, V.K.; & SINGH, H.B. (2016). Plant growth-promoting microorganisms for environmental sustainability. *Trends in Biotechnol* 34: 847–850.
- AJITH, A. (2019). Activity and diversity of nitrogen-fixing microorganisms novel tools to characterize populations in soil. 168f. Tese (Doutorado em Ciências). Swiss Federal Institut of Technology Zurich, Zurich, Suíça.

- ALEKHYA, G. & GOPALAKRISHNAN, S. (2017). Biological control and plant growth-promotion traits of streptomyces species under greenhouse and field conditions in chickpea. *Agricultural Research* 6: 410–420.
- BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G. A./ BERGONCI, J. I.; BIANCHI, C. A. M.; MÜLLER, A. G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B. M. M. (2004). Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39: 831–839.
- BERTOLINI, M.; FRISANCO, F.; FRANCHI, R. (2005). Um astoriaan chetrentina, 1st ed. San Michele all’Adige:Insstituto Agrariodi. p. 250.
- BHATTACHARYYA, P.N. & JHA, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28:1327–1350.
- CANNON, F.; DIXON, R.A.; & POSTGATE, J.R. (1976). Carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumoniue*. *Journal of General Microbiology* 93: 111–125.
- CASSETARI, A. de S. (2015). Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar inoculada com bactérias. 161f. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade de São Paulo - Piracicaba-SP.
- CHENG, Q. (2008). Perspectives in biological nitrogen fixation research. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 786–798.
- CONAB: Companhia Nacional De Abastecimento (2019). Acompanhamento da safra brasileira-grãos.:1–69. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>> Acesso em Jan de 2019
- DE SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L.M.P. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology* 38: 401–419.

- DEKHIL, S.B.E.N.; CAHILL, M.; STACKEBRANDT, E.; SLY, L; (1997). Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov.; and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. *Systematic and applied microbiology* 20: 72–77.
- DIXON, R. & KAHN, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology* 2: 621–631.
- ECKERT, B.; WEBER, O.B.; KIRCHHOF, G.; HALBRITTER, A.; STOFFELS, M.; HARTMANN, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov, a nitrogen-fixing bacterium associated with the C 4 -grass *Miscanthus*. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 17–26.
- FAGAN, E.B.; MEDEIROS, S.L.P.; MANFRON, P.A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; NETO, D.D.; VAN LIER, Q.D.J.; SANTOS, O.S; MÜLLER, L. (2007). Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja - revisão physiology of biologic fixation nitrogen in soybean - a review. *Revista FZVA* 14: 89–106.
- FANCELLI, A.L. (2015). Manejo baseado na fenologia aumenta eficiência de insumos e produtividade. *Visão Agrícola* 24–29.
- GABY, J.C. & BUCKLEY, D.H. (2012). A comprehensive evaluation of pcr primers to amplify the *nifH* gene of nitrogenase. *Plos One* 7: 1–12.
- GLICK, B.R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012: 1–15.
- HARTMANN, A. & BALDANI, J.I.V.O. (2006). The genus *Azospirillum* . The Prokaryotes (DWORKIN M.; FALKOW S.; ROSENBERG E.; SCHLEIFER KH.; STACKEBRANDT, E. (eds)). New York, NY: Springer, p. 115–140.
- HAUKKA, K.; LINSTRÖM, K.; YOUNG, J.P.W. (1998). Three Phylogenetic Groups of

nodA and *nifH* Genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* Isolates from Leguminous Trees Growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 419–426.

HU, Y. & RIBBE, M.W. (2013). Biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 13173–13177.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant Soil* 331: 413–425.

IVLEVA, N.B.; GROAT, J.; STAUB, J.M.; STEPHENS, M. (2016). Expression of active subunit of nitrogenase via integration into plant organelle genome. *Plos One* 11:1–13.

JARVIS, B.D.; DOWNER, H.L; YOUNG, J.P. (1992). Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia support synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. *Internacional Journal of Systematic Bacteriology* 42: 93–96.

KHAMMAS, I.M.; AGEROU, E.; GRIMONT, P.A.D.; KAISER, P. (1989) *Azospirillum irakense* sp.nov.; a nitrogen-fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Research in Microbiology* 140: 679–693.

LAVRINENKO, K.; CHERNOUSOVA, E.; GRIDNEVA, E.; DUBININA, G.; AKIMOV, V.; KUEVER, J.; LYSENKO, A.; GRABOVICH, M. (2010). *Azospirillum thiophilum* sp . nov .; a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 2832–2837.

LIN, S.-Y.; HAMEED, A.; LIU, Y.-C.; HSU, Y.-H.; LAI, W.-A.; SHEN, F.-T.; YOUNG, C.-C. (2015). *Azospirillum soli* sp. nov.; a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65: 4601–4607.

- LIN, S.-Y.; LIU, Y.-C.; HAMEED, A.; HSU, Y.-H.; HUANG, H.-I.; LAI, W.-A.; & YOUNG, C.-C. (2016). *Azospirillum agricola* sp . nov.; a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 1453–1458.
- LIN, S.-Y.; LIU, Y.-C.; HAMEED, A.; HSU, Y.-H.; LAI, W.-A.; SHEN, F.; YOUNG, C.-C. (2013). *Azospirillum fermentarium* sp. nov.; a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63: 3762–3768.
- LIN, S.-Y.; SHEN, F.-T.; YOUNG, L.-S.; ZHU, Z.-L.; CHEN, W.-M.; YOUNG, C.-C. (2012). *Azospirillum formosense* sp . nov.; a diazotroph from agricultural soil. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62:1185–1190.
- LIN, S.-Y.; YOUNG, C.-C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; ARUN, A.B.; CHEN, W.-M.; LAI, W.-A.; SHEN, F.-T.; REKHA, P.D.; YASSIN, A.F; (2009). *Azospirillum picis* sp . nov .; isolated from discarded tar. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 761–765.
- MA, Y.; PRASAD, M.N.V.; RAJKUMAR, M.; FREITAS, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances* 29: 248–258.
- MAGALHÃES, F.M.M.; DÖBEREINER, J.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R. (1983). A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 55: 471–430.
- MATSUMURA, E.E.; SECCO, V.A.; MOREIRA, R.S.; DOS SANTOS, O.J.A.P.; HUNGRIA, M.; OLIVEIRA, A.L.M. (2015). Composition and activity of endophytic bacterial communities in field-grown maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Annals of Microbiology* 65: 2187–2200.
- MEHNAZ, S.; WESELOWSKI, B.; LAZAROVITS, G. (2007). *Azospirillum canadense* sp . nov .; a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *Internacional*

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 620–624.

MELO, J. & TOCZYSKI, D. (2002). A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Current Opinion in Cell Biology* 14: 237–245.

MERRICK, W.C. (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiological reviews* 56: 291–315.

NADEEM, S.M.; ZAHIR, Z.A.; NAVEED, M.; ASGHAR, H.N.; ARSHAD, M. (2010). Rhizobacteria capable of producing acc-deaminase may mitigate salt stress in wheat. *Soil Science Society of America Journal* 74: 533.

OKUMURA, R.S.; MARIANO, D. DE C.; ZACCHEO, P.V.C. (2012). Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. *Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias* 4: 226–244.

OLIVARES, F.L.; BUSATO, J.G.; DE PAULA, A.M.; DA SILVA LIMA, L.; AGUIAR, N.O.; CANELLAS, L.P. (2017). Plant growth promoting bacteria and humic substances: crop promotion and mechanisms of action. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4:1–13.

ONOFRE-LEMUS, J.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; GIRARD, L.; CABALLERO-MELLADO, J. (2009). ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6581–6590.

PENG, G.; WANG, H.; ZHANG, G.; HOU, W.; LIU, Y.; WANG, E.T.; TAN, Z. (2006). *Azospirillum melinis* sp. nov.; a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56:1263–1271.

SILVA, M.C. P; SEMENOV, A. V.; VAN ELSAS, J.D.; SALLES, J.F. (2011). Seasonal variations in the diversity and abundance of diazotrophic communities across soils. *FEMS Microbiology Ecology* 77:57–68.

- RAYMOND, J.; SIEFERT, J.L.; STAPLES, C.R.; BLANKENSHIP, R.E. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution* 21: 541–554.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRIK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELEVIANS, S.; LEY, J.D.E. (1987). Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Internacional Journal of Systematic Bacteriology* 37: 43–51.
- REIS, V.M. & TEIXEIRA, K.R.S. (2005). Fixação Biológica de Nitrogênio – Estado da Arte. *Miolo_Biota.pmd*, 1st ed. (de Aquino, A.M. & de Assis, R.L. eds). Brasília: Processos Biológicos do Sistema Solo-Planta, p. 151–180.
- ROESCH, L.F.W. (2007). Diversidade De Bactérias Diazotróficas Associadas a Plantas De Milho Cultivadas No Estado Do Rio Grande Do Sul. 165f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS
- ROSENBERG, E.; DELONG, E.F.; LORY, S.; STACKEBRANDT, E.E.; THOMPSON, F.F. (2014). The Prokaryotes: alphaproteobacteria and betaproteobacteria. 4 ed New York. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p.1013.
- SANTOYO, G./ MORENO-HAGELSIEB, G.; DEL CARMEN OROZCO-MOSQUEDA, M.; GLICK, B.R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 183: 92–99.
- SARITA, S.; PRIEFER, U.B.; PRELL, J.; SHARMA, P.K. (2008). Diversity of *nifH* gene amplified from rhizosphere soil DNA. *Current Science* 94 109–115.
- SARMA, B.K.; YADAV, S.K.; SINGH, S.; SINGH, H.B. (2015). Microbial consortium-mediated plant defense against phytopathogens: Readdressing for enhancing efficacy. *Soil Biology and Biochemistry* 87: 25–33.
- SCHMIDT, T.M. (2006). The maturing of microbial ecology. *International Microbiology* 9: 217–223.

- SEEFELDT, L.C.; HOFFMAN, B.M.; DEAN, D.R. (2009). Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. *Annual Review of Biochemistry* 78:1–28.
- SUGITHA, T.C.K. & KUMAR, K. (2009). Identification of nif genes of heterotrophic and endophytic diazotrophs associated with rice (*Oryza sativa* L .;) by targeted DNA finger printing. *African Journal of Biotechnology*, 8: 6249–6252.
- SUR'S, S.; BOTHRA, A.K.; SEN, A. (2010). Symbiotic Nitrogen Fixation-A Bioinformatics Perspective. *Biotechnology* 3: 257–273.
- TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R.; DÖBERAINER, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group , with descriptions of a new genus. *Canadian Journal of Microbiology* 24: 967-980.
- TIQUIA-ARASHIRO, S.M. (2010). Using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis to assess microbial community structure in compost systems. *Methods in molecular biology* 599: 89–101.
- TORTORA, M.L.; DÍAZ-RICCI, J.C.; & PEDRAZA, R.O. (2012) Protection of strawberry plants (*Fragaria ananassa* Duch) against anthracnose disease induced by *Azospirillum brasilense*. *Plant and Soil* 356: 279–290.
- UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. (1995). Remarkable N₂-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *Journal of bacteriology* 177:1414–1417.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2019). Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. <https://www.fas.usda.gov/data/grain-word-markets-andtrade>. URL <https://www.fas.usda.gov/data/grain-word-markets-andtrade>.
- VÍLCHEZ, J.I.; NAVAS, A.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.; ARCOS, S.C.; MANZANERA, M. (2016). Biosafety test for plant growth-promoting bacteria: proposed environmental and human safety index (EHSI) protocol. *Frontiers in Microbiology* 6:1–14.

- VITTORAZZI, C.; JÚNIOR, A.T. DO A.; GONÇALVES, L.S.A.; CANDIDO, L.S.; & SILVA, T.R. DA C. (2013). Seleção de pré-cultivares de milho-pipoca baseado em índices não paramétricos. *Revista Ciencia Agronomica* 44: 356–362.
- WEIL, R.R. & BRADY, N.C. (2017). Nitrogen and Sulfur Economy of Soils. The Nature and Properties of Soils.; 15th ed. (Weil, R.R. & Brady, N.C. eds). p. 583–642.
- XIE, C. & YOKOTA, A. (2005). *Azospirillum oryzae* sp . nov .; a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1435–1438.
- YOUNG, C.C.; HUPFER, H.; SIERING, C.; HO, M.; ARUN, A.B.; LAI, W.; REKHA, P.D.; SHEN, F.; HUNG, M.; CHEN, W.; YASSIN, A.F. (2008). *Azospirillum rugosum* sp . nov.; isolated from oil-contaminated soil. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 959–963.
- ZEHR, J.P.; JENKINS, B.D.; SHORT, S.M.; STEWARD, G.F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiology*5: 539–554.
- ZHOU, S.; HAN, L.; WANG, Y.; YANG, G.; ZHUANG, L.; HU, P. (2013). *Azospirillum humicireducens* sp. nov.; a nitrogen- fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*; 63: 2618–2624.
- ZHOU, Y.; WEI, W.; WANG, X.; XU, L.; & LAI, R. (2009). Full Paper *Azospirillum palatum* sp. nov.; isolated from forest soil in Zhejiang province , China. *J. The Journal of General and Applied Microbiology* 7: 1–7.

3. CAPÍTULO II- INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense* AFETA A COMPOSIÇÃO E ESTRUTURA DA COMUNIDADE BACTERIANA DA RIZOSFÉRA DE GENÓTIPOS DE MILHO, AVALIADA VIA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO.

3.1. RESUMO

A crescente demanda mundial por alimentos implica na necessidade de aumento da produção agrícola, que requer práticas mais eficientes do uso de solo ao mesmo tempo que se exige menores impactos sobre os diferentes agroecossistemas. Neste trabalho, objetivou-se avaliar por meio de técnicas metagenômicas a biodiversidade bacteriana do solo da rizosfera de plantas de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. Para a análise foram utilizadas amostras obtidas de solo rizosférico de genótipos de milho cultivado em solo Latossolo Vermelho Distrófico, fase cerrado, pobre em nitrogênio (<20 ppm de N mineral), em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG. Utilizou-se uma adubação de base de 300 kg ha⁻¹ da formulação 8-28-16 de NPK sem adubação nitrogenada de cobertura. Foram testados quatro híbridos de milho (BRS1055, DKB310, BRS1040 e DKB390), na presença e ausência de inoculação com *Azospirillum brasilense*, em delineamento de blocos casualizados com quatro repetições. O DNA total das amostras de solo rizosférico foi extraído e amplificado na região do gene ribossomal 16S rRNA. Os amplicons foram sequenciados no sequenciador "MiSeq" da Illumina e os reads analisado na plataforma QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology), para classificação taxonômica. Em seguida, efetuou-se a análise de variância ao nível de filo e gênero. Observou-se através da classificação das Operational Taxonomic Unit (OTUs), domínio do filo Proteobactéria (32%) e maior frequência dos gêneros *Sphingomonas*, *Gemmatimonas*, *Solirubrobacter*. Concluiu-se que a modulação da estrutura e composição da comunidade bacteriana do solo rizosférico em plantas foi dependente do genótipo e da prática de inoculação com *Azospirillum brasilense* utilizada.

Palavras chaves: *Bioinformática; metagenoma; biodiversidade; Fixação Biológica de Nitrogênio.*

3.2. INTRODUÇÃO

A cultura do milho destaca-se entre os diferentes cereais cultivados mundialmente, em particular no Brasil. Elevadas produtividades são necessárias para atender à crescente demanda, conseqüentemente há aplicação de altas doses de fertilizantes químicos, principalmente o nitrogênio (Dartora *et al.* 2013; Subedi & Ma 2009). Entretanto, o uso intensivo de fertilizantes nitrogenados apresenta limitações em relação a custos de produção e problemas ambientais, como efeito estufa, eutrofização de recursos hídricos e chuva ácida (Gastal & Lemaire 2002). Portanto o desenvolvimento e adoção de tecnologias nos sistemas agrícolas que mitiguem o uso de insumos industriais e que assegurem bons rendimentos de colheita através de práticas de uma agricultura sustentável, reduzindo seus efeitos negativos sobre meio ambiente (Zebarth *et al.* 2009).

Em escala global, a tecnologia de uso de inoculantes à base de bactérias diazotróficas tem sido usada de modo crescente como alternativa ecológica, inclusive no Brasil. Nas últimas décadas, eles vêm sendo usados para a melhoria do uso de nutrientes e redução do uso de produtos químicos. Os biofertilizantes formulados com estirpes de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) (Bhardwaj *et al.* 2014) foram desenvolvidos devido ao avanço de estudos bioquímicos, interações genômicas, pós genômicas e ecológicas de estirpes microbianas benéficas (Umesha *et al.* 2018).

O gênero *Azospirillum*, um representante das BPCP, está entre os mais bem estudados como inoculantes do mundo, em diferentes culturas agrícolas (Cassán *et al.* 2015; Hartmann & Bashan 2009; Smith *et al.* 2015). Os biofertilizantes, quando aplicados, precisam se inter-relacionar com o microbioma da rizosfera e interior dos tecidos vegetais para estabelecimento e promoção de benefícios às plantas hospedeiras (Lakshmanan *et al.* 2014).

A rizosfera das plantas é classificada como um dos ecossistemas mais enigmáticos da biosfera e representa uma estreita área circundante que é afetada

pelas raízes vegetais, sendo um local favorável para a multiplicação de organismos diversos (Hinsinger & Marschner 2006; Raaijmakers & Lugtenberg 2013). A composição da microbiota rizosférica é mediada pelos exsudatos radiculares que variam em função da espécie e genótipo da planta (Berendsen *et al.* 2012). Dessa maneira, as plantas exercem uma pressão seletiva sobre a estrutura e função das comunidades microbianas do solo (Haichar *et al.* 2008; Lecal *et al.* 2011).

Em milho, a colonização microbiana da endo e ectorizosfera pode ser afetada pela inoculação de BPCP (Kuan *et al.* 2016) e de modo similar, o estabelecimento da bactéria inoculada pode ser afetado pela microbiota nativa do solo (Castro-Sowinski *et al.* 2007).

Estudos envolvendo comunidades microbianas e suas respostas a inoculação têm sido possíveis através de análises moleculares baseadas no gene 16S rRNA (Grosch *et al.* 2012). Nos últimos anos surgiram novas técnicas como a metagenômica, que possibilita a obtenção de uma ampla faixa de diversidade independente de cultivo microbiano (Coughlan *et al.* 2015; Peiffer *et al.* 2013).

Devido a relevância da diversidade bacteriana para a função de agroecossistemas, tornam-se relevantes as pesquisas com ênfase no avanço do conhecimento neste ambiente. A diversidade bacteriana faz parte dos mecanismos de funcionamento dos ecossistemas o que é de fundamental importância para sistemas de produção agrícola (Dutta *et al.* 2013; Wood *et al.* 2015).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da inoculação com *Azospirillum brasilense* sobre a diversidade bacteriana da rizosfera de diferentes híbridos de milho.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Instalação do experimento de Campo

O experimento foi conduzido em solo Latossolo Vermelho Distrófico, em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 19°28'S de latitude sul e longitude 44°15'08" W. Foram avaliados quatro híbridos de milho: BRS1055, DKB310, BRS1040 e DKB390 (pertencentes ao Programa de Melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo) combinados com e sem inoculante contendo um mix de três estirpes: E7, E11 e E26) de *Azospirillum brasilense* (pertencentes a Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo), totalizando oito tratamentos. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições. As parcelas foram constituídas por duas linhas de 5m de comprimento, espaçadas de 0,70m entre linhas e 0,20m entre plantas. Foram plantadas 22 sementes por linhas. A adubação de base foi de 300kg.ha⁻¹ da formulação 8-28-16 de NPK sem adubação nitrogenada de cobertura.

3.3.2. Preparo do inoculante

O inoculante foi preparado através da metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2013), com adaptações. Três estirpes de bactérias de *Azospirillum brasilense* (E7, E11 e E26) pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, foram cultivadas separadamente em caldo de soja trip-caseína, durante 72h, à temperatura de 29°C sob agitação de 350 rpm constante. Após esse período, os inóculos foram centrifugados por 10 minutos a 6000 G e retirado o sobrenadante. As células bacterianas foram ressuspensas em solução salina [0,85% (m/v) NaCl] e ajustadas para aproximadamente 10⁸ UFC mL⁻¹. Posteriormente as suspensões foram incorporadas a carvão vegetal moído (60% p/v) como veículo e adicionadas às

sementes umedecidas com goma de fécula de mandioca (5%, p/v) como agente adesivo. Depois de concluída a inoculação, foi realizado o plantio.

3.3.3. Coleta e preparo de amostras de solo rizosférico

Aos 35 dias após a emergência das sementes, o sistema radicular inteiro de quatro plantas por parcela foi coletado no campo. Em seguida, as raízes foram destacadas e o solo firmemente aderido às raízes foi removido e peneirado em peneira de 2mm, e imediatamente colocadas em tubos sob nitrogênio líquido, levadas ao laboratório e posteriormente armazenadas em freezer -80°C até a extração do DNA total.

3.3.4. Extração de DNA e quantificação

A extração de DNA total do solo foi realizada com o kit comercial “Fast Kit DNA for soil da MP Biomedicals” de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. O DNA extraído, foi quantificado por espectrofotometria a 260 nm, em espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (ThermoScientific). Em seguida, a integridade do DNA extraído foi avaliada com base nas amostras corridas em gel de agarose à 1%, coradas com uma solução de brometo de etídeo 1% e visualizadas com luz ultravioleta em transiluminador de luz ultravioleta.

3.3.5. Amplificação da região 16S rDNA e construção da biblioteca

A amplificação de fragmentos de 250 bases da região hipervariável V4 do gene ribossomal 16S rRNA foi efetuada utilizando-se os primers universais 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA) e 806R (5'-GGACTACHVHHHTWTCTAAT). Foram

utilizadas as seguintes condições de PCR: 94°C 3 min, 18x (94°C 45 s, 50°C 30 s, 68°C 1 min), 72°C 10 min.

A partir destes amplificados foi construída a biblioteca metagenômica utilizando-se o kit comercial “Nextera DNA Library Preparation Kit” da Illumina®. Os amplificados foram reunidos em pools e posteriormente sequenciados no sequenciador “MiSeq” da Illumina® (Degnan & Ochman 2012).

3.3.6. Avaliação da diversidade taxonômica bacteriana

As leituras ou “reads” obtidos no sequenciador foram analisadas na plataforma QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology (Caporaso *et al.* 2010) seguindo-se um fluxo de trabalho desde a remoção de sequências de baixa qualidade, filtração, remoção de quimeras e classificação taxonômica. As sequências foram classificadas em gêneros bacterianos através do reconhecimento de OTUs do inglês *Operational taxonomic unit*, neste caso, a homologia entre as sequências quando comparadas contra uma base de dados. Para comparar as sequências, utilizou-se o banco de dados de sequências ribossomais SILVA database. (Yilmaz *et al.* 2014).

Para gerar a classificação das comunidades bacterianas por identificação de OTUs, foram utilizadas 10.963 leituras por amostra, com a finalidade de normalizar os dados e melhorar a precisão da classificação taxonômica.

3.3.6.1. Gêneros fixadores de nitrogênio

A partir da classificação dos gêneros identificados pelas OTUs, foram verificados nesses resultados os que são fixadores de nitrogênio. Para isso as bactérias diazotróficas foram pesquisadas em dois bancos de dados: National Center for Biotechnology Information (NCBI) e o Uniprot (NCBI, 2019; UniProt, 2019). As buscas foram realizadas na base de dados de proteínas, feitas através da palavra

chave “nitrogenase” e levado em consideração o gene *nif* e a proteína. O que resultou em uma lista de gêneros descritos depositadas nesses bancos de dados, através desta lista foi verificado quais gêneros deste trabalho são considerados fixadores de nitrogênio.

3.3.7. Análises estatísticas

Os resultados da abundância de OTUs de filós bacterianos obtidos no QIIME com valores superior a 3% foram verificados a partir da análise de variância e teste de Scott Knott ($p < 0,05$) para comparação geral entre todos os tratamentos utilizando o aplicativo computacional Sisvar (Ferreira 2011).

Os resultados também foram comparados entre cada tratamento inoculado e não inoculado separadamente sem delimitação de valores de abundância. Para isso, foram utilizados os resultados de sequenciamento de quatro repetições por tratamento. Assim, a tabela de filo e gêneros bacterianos obtida no QIIME foi convertida ao formato *sp* e transferida ao programa estatístico de metagenômica STAMP: statistical analysis of metagenomic profiles (Parks 2014). Para determinar se as médias dos filós e gêneros bacterianos apresentavam a mesma abundância entre tratamentos, procedeu-se a comparação pelo teste *t* de Welch, com nível de confiança de 95%. E a riqueza de espécie foi calculada através do índice de Chao1.

3.4. RESULTADOS

Para os resultados de OTU, foram identificados 45 filós bacterianos no total, sendo o filo Proteobacteria o de maior abundância em todas as amostras, com média de 32%, seguido de Actinobacteria (22,5%). Além destes os filós que apresentaram OTUs, superiores a 5% foram: Acidobacteria (9,6%), Bacteroidetes (7,9%), Gemmatimonadetes (7,2%), Chloroflexi (5,3%) e Verrucomicrobia (5,2%) (Figura 3). Observou-se que os principais grupos de filo tenderam a manter sua abundância

(Figura 3), independente do cultivar de milho e da inoculação ou não com *Azospirillum brasilense*.

Por meio da análise de variância dos filios, considerando a abundância superior a 3%, foram encontradas diferenças significativas entre todos os tratamentos. O filo Actinobacteria foi o que diferiu dos demais, com abundância entre 18 e 27%, de forma que os maiores valores foram encontrados na presença do inoculante nos híbridos BRS1055, BRS1040 e DKB390 com 24, 23 e 27,6% respectivamente (Figura 4).

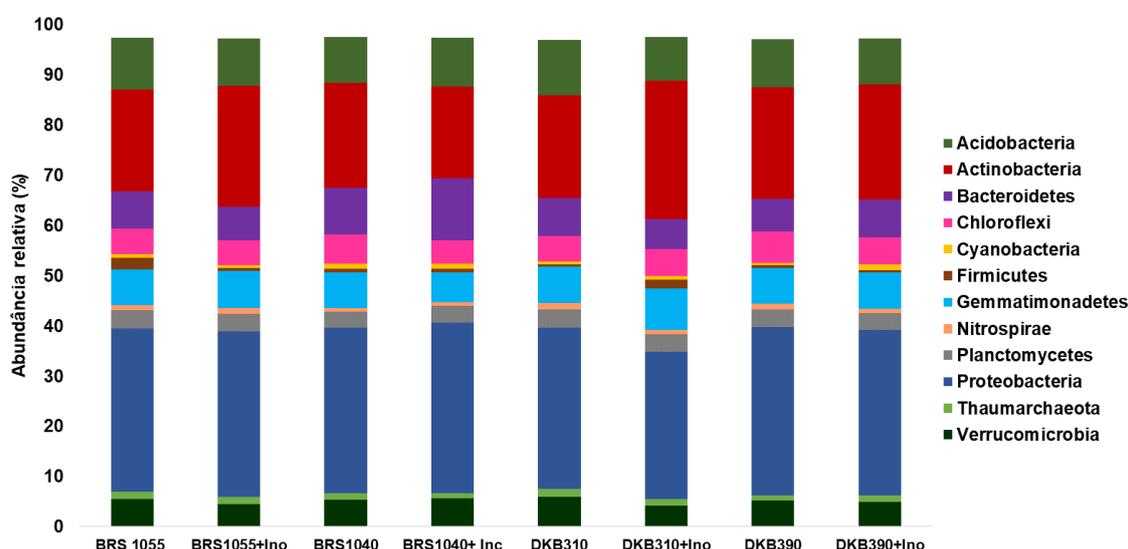


Figura 3- Distribuição de doze filios encontrados em solo rizosférico de plantas de milho inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense*

Em relação à abundância de filios em função da inoculação com *Azospirillum* aplicada nas sementes, observaram-se variações na composição da comunidade bacteriana foram dependentes do genótipo da planta, quando comparada as médias de cada genótipo de milho inoculado e não inoculado. Quando se compara os tratamentos BRS1055 e BRS1055+Ino, foi detectada maior abundância do filo Candidatus Berkelbacteria no tratamento BRS1055+Ino (Figura 5). Por outro lado, observou-se aumento significativos dos filios Tectomicrobia, Latescibacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Nitrospirae e Armatimonadetes nos genótipos DKB310 e dos filios Armatimonadetes e Saccharibacteria no genótipo DKB 390, ambos na ausência de inoculação (Figura 6 e 7)

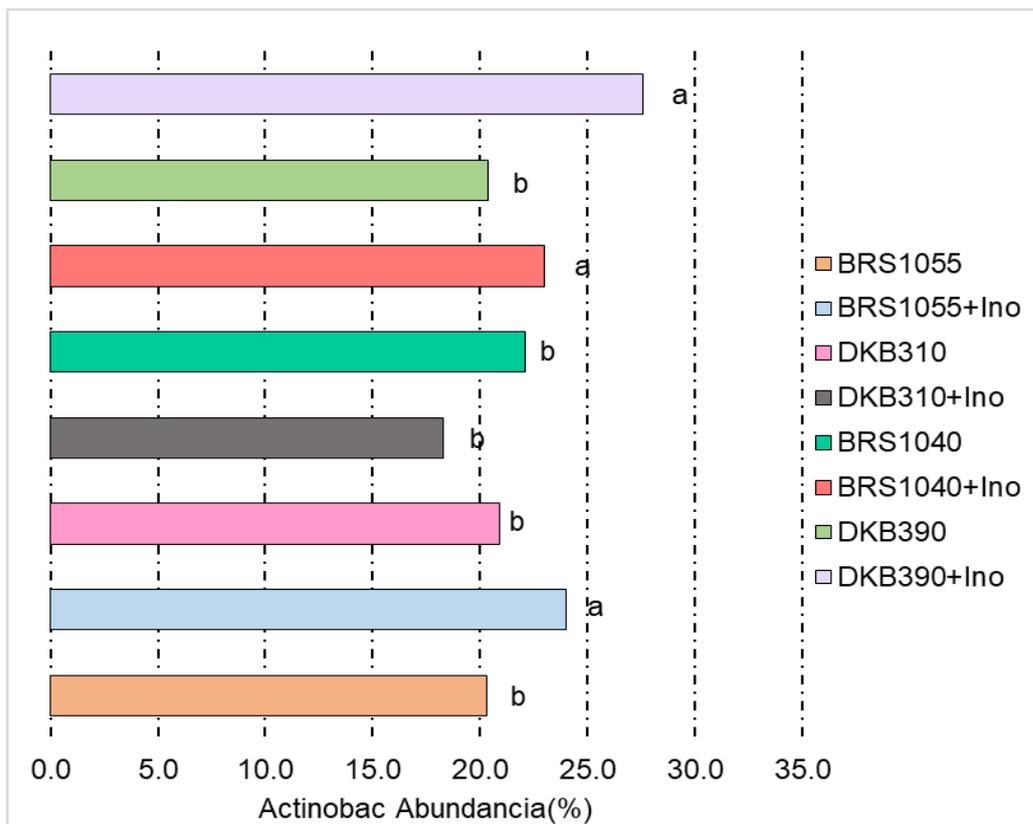


Figura 4- Abundância relativa do filo Actinobacteria em diferentes genótipos de milho inoculados e não inoculados. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott ($P < 0.05$).

Ao nível de gênero foram identificados 1420 gêneros bacterianos, sendo os mais abundantes: *Sphingomonas* 2,6%; *Gemmatimonas* 2,3%; *Gemmatimonas* 2,2% e *Streptomyces* 1,5% (Figura 8). Entre os tratamentos BRS1040 e BRS1040+Ino, observou-se maior abundância do gênero *Kribbella* na presença da inoculação e menor dos gêneros *Nibrella*, *Brevundimonas*, *Crossiella* e *Aureimonas* (Figura 9).

Ao nível de gênero foram identificados 1420 gêneros bacterianos, sendo os mais abundantes: *Sphingomonas* 2,6%; *Gemmatimonas* 2,3%; *Gemmatimonas* 2,2% e *Streptomyces* 1,5% (Figura 8). Entre os tratamentos BRS1040 e BRS1040+Ino, observou-se maior abundância do gênero *Kribbella* na presença da inoculação e menor dos gêneros *Nibrella*, *Brevundimonas*, *Crossiella* e *Aureimonas* (Figura 9).

Em relação ao genótipo BRS1055 foi observado, maior abundância dos gêneros *Tahibacter*, *Hamadaea* e *Coxiella* na presença da inoculação (Figura 10).

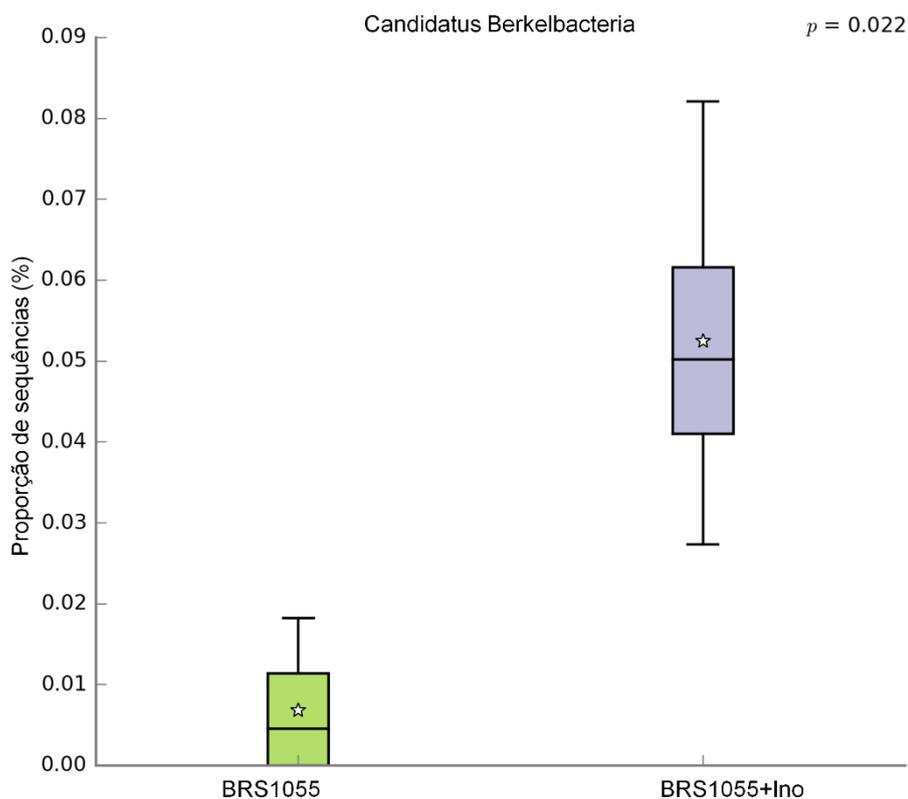


Figura 5- Filo Candidatus Berkelbacteria significativamente diferente na sua abundância entre os tratamentos BRS1055 e BRS1055+Ino pelo teste t de Welch ($p < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos filis são apresentados.

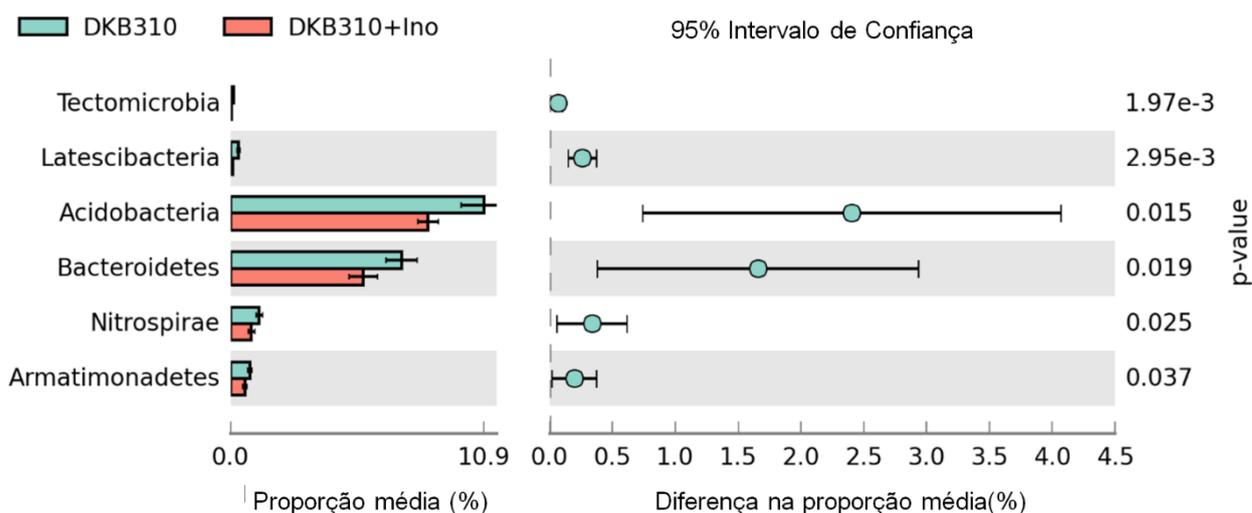


Figura 6- Filos significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos DKB310 e DKB310+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos filis são apresentados.

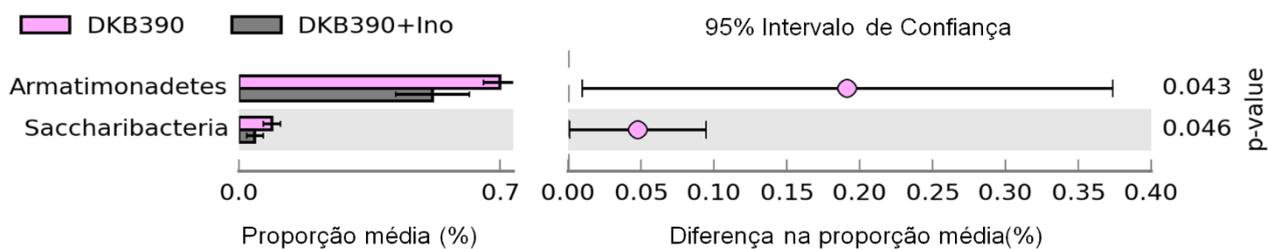


Figura 7- Filos significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos DKB390 e DKB390+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos filis

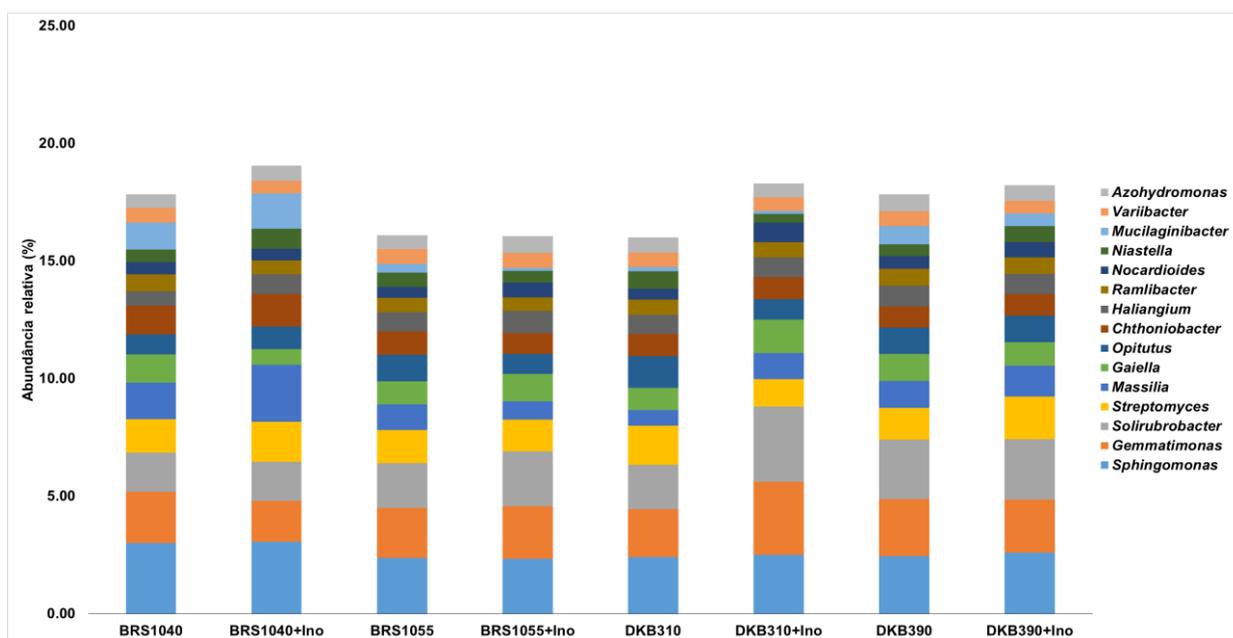


Figura 8- Distribuição de quinze gêneros encontrados em solo rizosférico de plantas de milho inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense*.

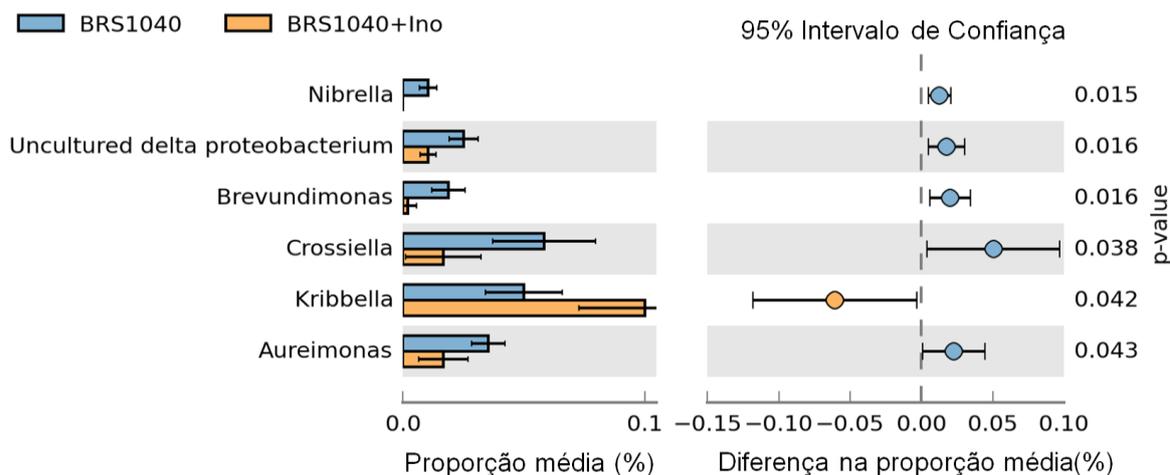


Figura 9- Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos BRS1040 e BRS1040+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos filós são apresentados.

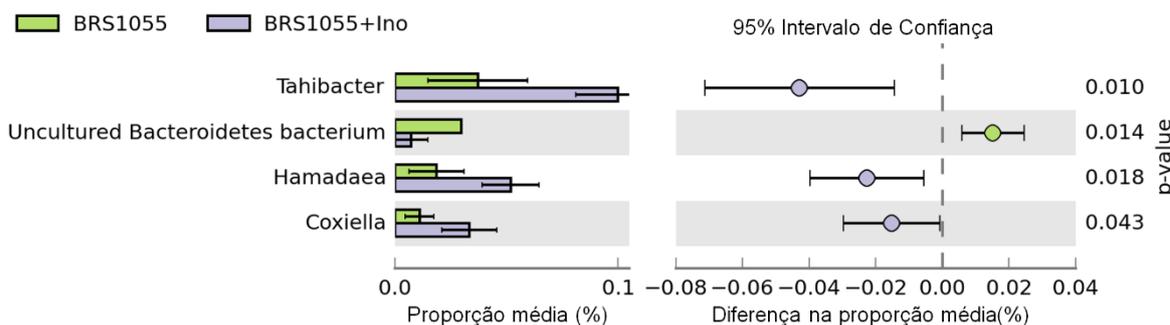


Figura 10- Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos BRS1055 e BRS1055+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos filós são apresentados.

Nos tratamentos DKB310 e DKB310+Ino, apresentaram aumento significativo dos gêneros *Gemmatimonas*, *Gemmatirosa*, *Blastococcus* e *Gemmatimonas* com a inoculação e diminuição significativa dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium* no tratamento sem inoculação (Figura 11). Observou-se que nesses tratamentos, independentemente de haver inoculação, há uma maior variação significativa na composição de gêneros.

Nos tratamentos DKB390 e DKB390+Ino, observou-se aumento significativo dos gêneros *Brevundimonas* e *Actinomadura* no tratamento com inoculação e

diminuição significativa dos gêneros *Lactobacillus*, *Acinetobacter* e *Bacteriovorax* no tratamento sem inoculação (Figura 12).

Adicionalmente, referente à riqueza ou biodiversidade das comunidades bacterianas, não foi observado diferença significativa entre os diferentes tratamentos. A riqueza (índice de Chao) pode ser verificada na curva de rarefação (Figura 13).

Os gêneros fixadores identificados foram em um total de 126, o que equivale a 8% do total encontrado nesse trabalho. O gênero *Sphingomonas* foi o de maior abundância em todas as amostras, totalizando uma média de 2,6%, seguido de *Streptomyces* (1,5%), além dos gêneros que apresentaram OTUs, superiores a 0,4% como *Massilia* (1,3%), *Azohydromonas* (0,6%), *Noviherbaspirillum* (0,6%), *Anaeromyxobacter* (0,5%), *Roseiflexus*, *Devosia*, *Microvirga* e *Rhizobium* com (0,4%) (Figura 14). Por meio da análise de variância dos gêneros diazotróficos com abundância superior a 0,4%, não foram encontradas diferenças significativas entre todos os tratamentos (Tabela 1).

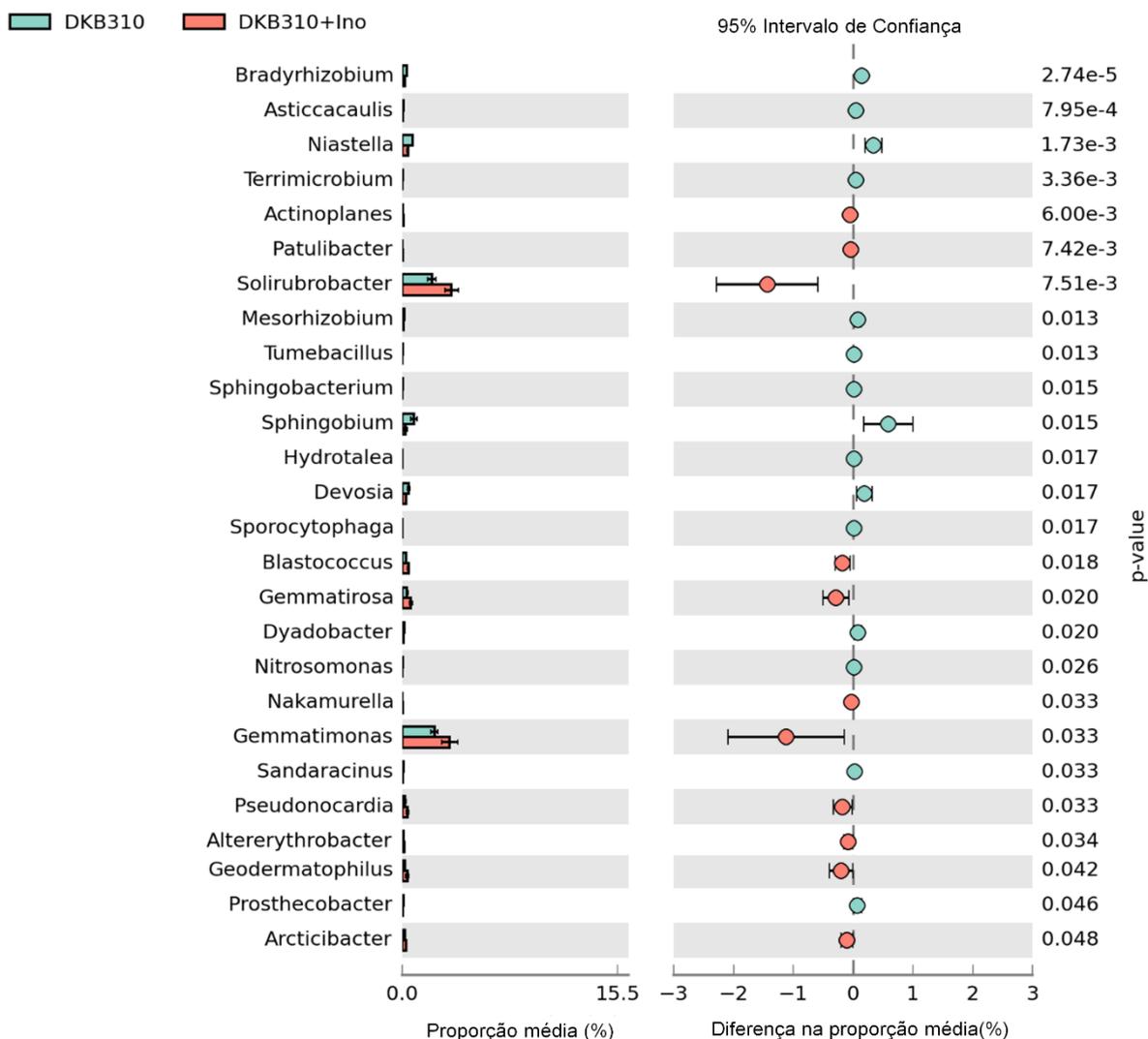


Figura 11- Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos DKB310 e DKB310+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos gêneros são apresentados

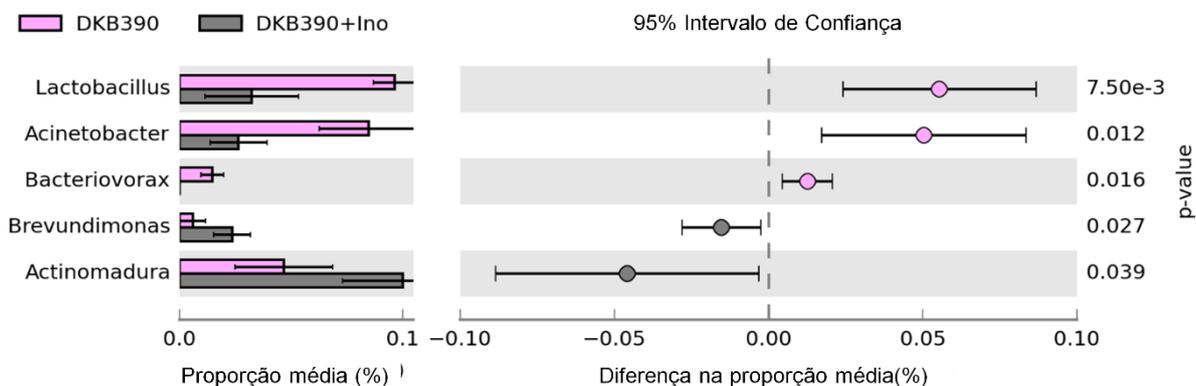


Figura 12- Gêneros significativamente diferentes na sua abundância entre os tratamentos DKB390 e DKB390+Ino pelo teste t de Welch ($P < 0.05$). Média e desvio padrão da abundância dos gêneros são apresentados.

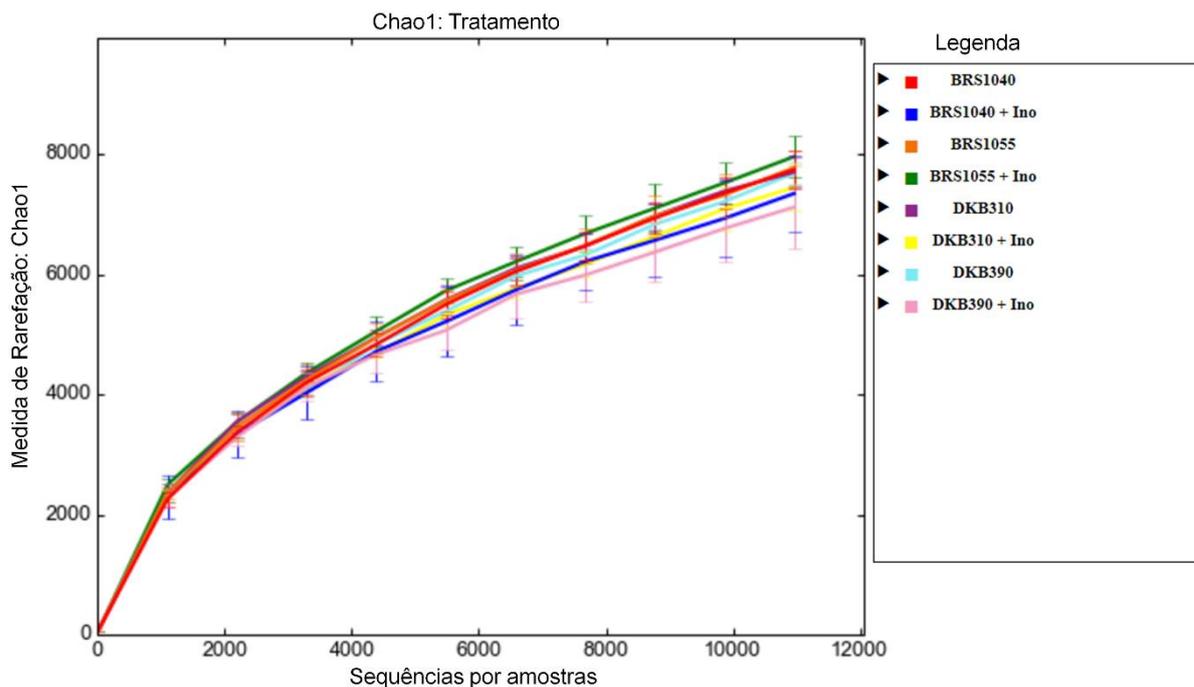


Figura 13- Curva de Rarefação baseada em OTUs observadas para riqueza e biodiversidade.

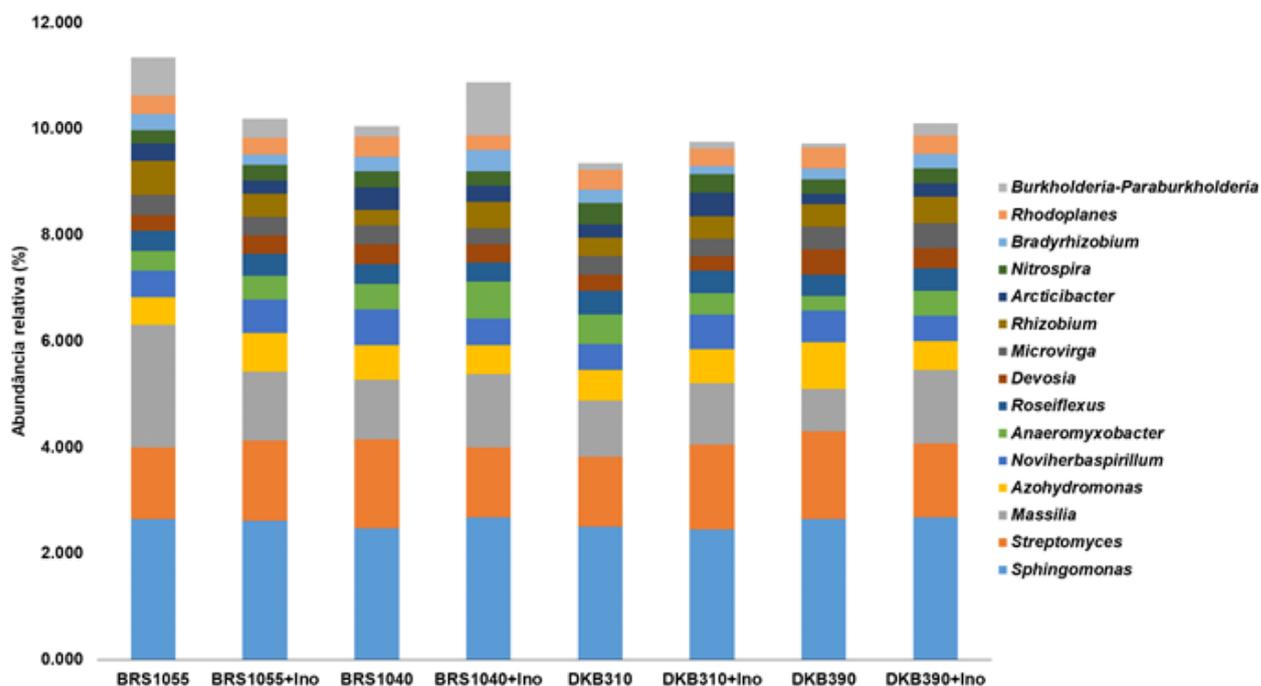


Figura 14- Distribuição de quinze gêneros fixadores de nitrogênio encontrados em solo rizosférico de plantas de milho inoculadas ou não com *Azospirillum brasilense*.

Tabela 1- Resumo das análises de variância os gêneros: *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Massilia*, *Azohydromonas*, *Noviherbaspirillum*, *Noviherbaspirillum*, *Anaeromyxobacter*, *Roseiflexus*, *Devosia*, *Microvirga* e *Rhizobium*.

		Quadrado Médio									
FV	GL	<i>Sphingomonas</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Massilia</i>	<i>Azohydromonas</i>	<i>Noviherbaspirillum</i>	<i>Anaeromyxobacter</i>	<i>Roseiflexus</i>	<i>Devosia</i>	<i>Microvirga</i>	<i>Rhizobium</i>
Bloco	3	0,21	0,01	2,77	0,03	0,00	0,015	0,04	0,00	0,01	0,07
Trat	7	0,03 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,87 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,063 ^{ns}	0,00 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,04 ^{ns}
Erro	21	0,19	0,19	1,15	0,03	0,04	0,03	0,01	0,01	0,01	0,04
CV		17,0	29,56	85,43	27,94	36,33	39,62	25,30	33,65	33,67	50,36
Média		2,58	1,48	1,25	0,65	0,57	0,46	0,40	0,35	0,38	0,44

^{ns}, não significativo a 5% de probabilidade de acordo com a análise de variância.

3.5. DISCUSSÃO

A inoculação constitui-se na aplicação de suprimento de elevadas densidades de microrganismos viáveis e eficazes para uma povoação ligeira da rizosfera e estabelecimento nos tecidos da planta hospedeira, com impactos ou não sobre as comunidades bacterianas nativas no solo (Trabelsi & Mhamdi 2013). Nesse estudo, o inoculante usado foi a base da espécie *Azospirillum brasilense*. O gênero é abundantemente estudado e usado de maneira comercial como BPCP. Estudos ao longo dos anos vem evidenciando sua aptidão para fixação de nitrogênio atmosférico, com a sucessiva promoção de crescimento dos vegetais pela produção de fito-hormônios (Fukami *et al.* 2018).

Sabe-se que o inoculante à base de *Azospirillum* pode ocasionar mudanças fisiológicas e morfológicas no sistema radicular, durante o crescimento das plantas (Herschkovitz *et al.* 2005b), o que pode levar indiretamente, ou diretamente, a mudança na estrutura e diversidade das associações bacterianas ligadas a raiz (Herschkovitz *et al.* 2005a).

Diante da importância dos microrganismos e seu papel ambiental, o trabalho teve como objetivo analisar a microbiota independente de cultivo da rizosfera de milho inoculado ou não com *Azospirillum*. Utilizou-se a tecnologia do sistema illumina para sequenciamento da região 16S rDNA e as ferramentas da bioinformática para avaliar amostras do DNA genômico total que foram extraídos da rizosfera de plantas inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Como resultado obteve-se um grande número de diferentes filos e gêneros.

Os resultados demonstram a ocorrência de um grande número de filos, sendo alguns mais predominantes. Resultados similares foram relatados em estudos de abundância microbiana em solo (Deakin *et al.* 2018; Rachid *et al.* 2013), com diferenças apenas nas proporções, que pode ser influenciado pelo teor de carbono orgânico total, teor de fósforo, textura e pH do solo (Docherty *et al.* 2015; Kuramae *et al.* 2012). Estes mesmos filos, geralmente são encontrados entre comunidades bacterianas dominantes da rizosfera (Dror Minz *et al.* 2013) inclusive em milho (Johnston-monje *et al.* 2016; Li *et al.* 2014; Yang *et al.* 2017). Há evidências sugerindo que plantas, são beneficiadas pela colonização em sua endosfera e ectorizosfera por Proteobacterias, mais que por outros filos de bactérias. Também são encontradas

frequentemente nessas regiões filas como Firmicutes, Actinomicetos, enquanto que Acidobacteria e Planctomycetes comumente detectados somente na ectorizosfera (Bulgarelli *et al.* 2013; Philippot *et al.* 2013).

Entre os genótipos avaliados, apenas o BRS1055 aumentou a abundância de filo na presença do inoculante. O BRS1040, não apresentou diferenças na presença e ausência do inoculante. Os híbridos DKB310 e DKB390 demonstraram uma inibição do filo com a inoculação de *Azospirillum* que pode estar diretamente ligada ao genótipo da planta, uma vez que estes genótipos já evidenciaram ter influência acerca da população bacteriana da rizosfera em campo (Peiffer *et al.* 2013; Peiffer & Ley 2013).

O filo Candidatus Berkelbacteria que teve aumento em sua abundância na presença de inoculante é recém descrito e faz parte do grupo denominado Candidate Phyla Radiation (CPR) (Brown *et al.* 2015). CPR é uma ampliação recentemente representada na árvore da vida que não dispunha de genomas sequenciados até 2012 (Wrighton *et al.* 2012). Em um trabalho realizado por Danczak *et al.* (2017), para verificar se membros CPR seriam funcionalmente diferenciados por capacidade de ciclagem de N e carbono, foi observado que o Berkelbacteria era o filo individualmente melhor representado.

Os outros filas encontrados nos genótipos apresentaram aumento de abundância na ausência do inoculante (Figura 6 e 7). Sendo que os filas Tectomicrobia, Latescibacteria, Armatimonadetes e Saccharibacteria, são filas candidatus não cultiváveis que ainda estão sendo estudadas quanto as suas funções metabólicas na ecologia microbiana. Eles refletem mais de 15% da riqueza bacteriana e apresentam “células ultra pequenas”, com dimensões entre de 0,1 e 0,2 μm (Brown *et al.* 2015). Os demais Acidobacteria, Bacteroidetes, Nitrospirae são mais conhecidos, com um grande número de espécies catalogadas.

O filo Armatimonadetes presente com maior abundância em dois genótipos nesse trabalho, já foi verificada sua presença em diferentes levantamentos genéticos em ambientes variados, com diversas características biogeoquímicas e físicas (Dunfield *et al.* 2012; Portillo & González 2009). Também há relatos de sua presença em gramíneas como milho (Correa-galeote *et al.* 2016; Johnston-monje *et al.* 2016) e trigo (Edwards *et al.* 2014). Foi constatado aumento na rizosfera de alface inoculado com estirpes de *Pseudomonas* (Cipriano *et al.* 2016) e em alfafa inoculadas com *Sinorhizobium meliloti* (Ju *et al.* 2018).

O filo Tectomicrobia foi descrito recentemente e é ainda não cultivável. É amplamente distribuído em esponjas e são encontradas também principalmente em ecossistemas terrestres anaeróbios e apresentam alto potencial para síntese de metabólitos secundários (Newman & Cragg 2015; Reveillaud *et al.* 2014; Wilson *et al.* 2014). Em estudo realizado para avaliação da contribuição de comunidades bacterianas no ciclo do N e fixação de C em solos este filo apresentou contribuição no processo de transcrição do gene *idh1* ligado ao ciclo de ácido tricarboxílico redutor (Ren *et al.* 2018).

O filo Latescibacteria é encontrado em diferentes habitats como marinhos, terrestres, sedimentos marinhos, fontes hidrotermais, solos, ambientes impactados por hidrocarbonetos, entre outros (Carbonetto *et al.* 2014; Pereira *et al.* 2014; Yakimov *et al.* 2013). Este filo tem sido relatado em estudos de comunidades bacterianas em rizosfera e solos de milho (Correa-galeote *et al.* 2016), e também é relatado em solo de campos de cultivo de trigo (Xu *et al.* 2012; Zhou *et al.* 2018).

O filo Acidobacteria foi encontrado com uma abundância elevada quando na ausência do inóculo. Segundo Bulgarelli *et al.* (2013), este filo é comum somente em rizosfera. Ao analisar a diversidade bacteriana endofítica de milho em relação a diferentes cultivos do solo, Correa-galeote *et al.* (2018), relataram a ocorrência deste filo na rizosfera de milho. Estudos indicam que este filo ainda apresenta um baixo número de genomas sequenciados pela dificuldade de cultivo, e assim seu papel ecológico ainda não é bem conhecido (Kielak *et al.* 2016).

Entretanto, já foi constatado que as estirpes da subdivisão 1 deste filo indicam que elas podem atuar como promotoras do crescimento de plantas (Kielak *et al.* 2016). Sua abundância pode estar relacionada a um aumento de carbono e baixo pH do solo (Trivedi *et al.* 2016) e ainda estar altamente envolvido nos ciclos biogeoquímicos do solo rizosférico (Lee *et al.* 2008).

O filo Bacteroidetes não teve seu número de abundância elevados pela presença do inoculante. Semelhante ao encontrado nesse trabalho, a inoculação com *Azospirillum* em plantas de milho não influenciou o aumento de abundância deste filo (Herschkovitz *et al.* 2005a). Este filo normalmente ocupa o ambiente endofítico de plantas, se mostrando como um dos mais abundantes na filosfera e rizosfera (Peiffer *et al.* 2013; Shakya *et al.* 2013). Estudos relatam sua abundância na comunidade bacteriana da rizosfera de milho (Li *et al.* 2014; Yang *et al.* 2017) e em culturas como trigo (Mahoney *et al.* 2017). Os Bacteroidetes também têm sido evidenciados como

importante colaborador para a disponibilização de nutrientes do solo (Yousuf *et al.* 2012).

Para o filo Nitrospirae, também não apresentou aumento de sua abundância na presença de *Azospirillum*, existem relatos de sua presença em estudos de diversidade em culturas de milho (Correa-galeote *et al.* 2016; Yang *et al.* 2017), arroz (Gu *et al.* 2017) cana-de-açúcar (Durrer *et al.* 2017). Este grupo é diverso é composto de bactérias gram-negativas com pouco gêneros cultiváveis (Lefèvre *et al.* 2011). O filo Nitrospirae já foi descrito como um grupo oligotrófico, que vive em ambientes carentes de nutrientes com índices de crescimento lento (Ling *et al.* 2017; Nie *et al.* 2018). O conjunto filogenético que compões nitrospirae são aptos ao processo de nitrificação (Coolon *et al.* 2013; Lückner *et al.* 2010; Sorokin *et al.* 2012) e apresentados como os mais numerosos em solos alterados com fertilizante de N inorgânico (Coolon *et al.* 2013). Assim ele é um importante associado na contribuição global de ciclagem de N (Cobo-díaz *et al.* 2015; Durrer *et al.* 2017).

O filo Saccharibacteria apresentou valores de abundância elevados na ausência de inoculantes. Este filo antes era conhecido como Candidate Division TM7 (Kindaichi *et al.* 2016). Não é relatado sua presença em plantas de milho inoculadas. No entanto, já foi descrito na rizosfera de milho (Correa-galeote *et al.* 2016), trigo (Mahoney *et al.* 2017) e cana de açúcar (Dong *et al.* 2018). Em estudo realizado com a inoculação de *Bacillus pumilus* em Mesquite, a presença do filo foi verificada em solo não rizosférico e em solo ausente de plantas (Galaviz *et al.* 2018). Este filo também já foi relacionado como potencial supressor de doenças de plantas (Shen *et al.* 2018).

A maioria dos filios encontrados no presente trabalho, são predominantes em análises independente de cultivo da rizosfera de plantas como é o caso de Acidobacteria, Bacteroidetes e Saccharibacteria (Buée *et al.* 2009).

Em relação a gêneros, sabe-se que membros de quatro filios bacterianos Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria e Firmicutes, formam grande parte da diversidade bacteriana da microbiota da raiz (Bodenhausen *et al.* 2013; Bulgarelli *et al.* 2015; Lundberg *et al.* 2012). Nesse trabalho os gêneros que apresentaram mudança em sua abundância, estão distribuídos nesses quatro filios e também no Gemmatimonadetes, totalizando cinco filios. São eles: Proteobacteria (*Brevundimonas*, *Tahibacter*, *Coxiella*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Acinetobacter*, *Bacteriovorax*), seguido de Actinobacteria (*Kribbella*, *Crossiella*,

Hamadaea, *Gemmatimonas*, *Blastococcus*, *Actinomadura*), *Gemmatimonadetes* (*Gemmatimonas*, *Gemmatirosa*), Firmicutes (*Lactobacillus*) e Bacteroidetes (*Nibrella*).

Alguns gêneros presentes nesse trabalho apresentaram modificações em sua abundância, influenciados ou não pela presença do inoculante. Em cada tratamento foi possível observar gêneros diferentes, o que indica que a planta pode ser o principal fator seletor daquela população. A intervenção do vegetal sobre a diversidade da comunidade microbiana acontece majoritariamente pela entrada de compostos orgânicos no solo (Vezzani *et al.* 2018) com a exsudação de oxigênio livre, água, enzimas, mucilagem (Bertin *et al.* 2003) e de fontes de carbono pelas plantas (Richardson *et al.* 2009).

Verificou-se nesse estudo que alguns gêneros são mais abundantes na presença do inoculante, enquanto outros somente em sua ausência. O que pode estar relacionado com as relações ecológicas que acontecem no ambiente, alguns participando ativamente da ecologia do micro bioma, desempenhando funções nos ciclos biogeoquímicos, como no ciclo de fósforo: *Brevundimonas* (Rana *et al.* 2011); *Acinetobacter* (Gulati *et al.* 2009); *Actinomadura* (Franco-Correa & Chavarro-Anzola 2016), e ciclo do nitrogênio: *Gemmatimonas* (Ding *et al.* 2014; Park *et al.* 2017); *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* (Ferguson *et al.* 2013); *Acinetobacter* (Indiragandhi *et al.* 2008).

Além de infinitas interações que ocorrem na rizosfera e endosfera, a maneira de ação do *Azospirillum* interfere no metabolismo de células vegetais resultando na alteração do metabolismo da planta inoculada e proliferação das raízes (Bashan & De-Bashan 2010). A diversidade de elementos externos como estágio de desenvolvimento do vegetal e o grupo autóctone da rizosfera também interferem (Baudoin *et al.* 2002; Gadhave *et al.* 2018). Além disso a aptidão para nutrientes e tipo de solo podem estar relacionados à abundância de diferentes grupos e assim na composição e dinâmica da comunidade bacteriana da rizosfera (Berg & Smalla 2009; Gadhave *et al.* 2018).

Neste trabalho foi possível identificar alguns gêneros fixadores de N, mesmo com o sequenciamento realizado a partir da região 16s rRNA. Resultados semelhantes já foram encontrados por Yang *et al.* (2017), ao analisar a rizosfera e solo de milho através de pirosequenciamento, foram encontrados os gêneros *Phenylobacterium*, *Inquilinus*, *Bradyrhizobium*, *Nitrosovibrio* *Azospirillum* e *Actinomyces*. Os gêneros fixadores de N encontrados nesse trabalho, estão

bem representados e diversos, uma vez que nas buscas realizadas em banco de dados foram encontrados pouco mais de 600 gêneros que atenderam os critérios de buscas. Essa diversidade encontrada é importante, porque garante a continuidade e eficiência dos processos que mediam em um determinado ambiente (Moreira & Siqueira 2006).

Observou-se que a inoculação com *Azospirillum brasilense* não influenciou a riqueza e a biodiversidade das bactérias em nenhum dos tratamentos analisados, corroborando com os resultados encontrados por Herschkovitz *et al.*(2005), onde os autores não encontraram diferenças na estrutura da comunidade do solo rizosférico de milho em função do uso de inoculante a base de *Azospirillum* . Essa não variação na biodiversidade pode também estar relacionado à época que a coleta foi realizada e ao grande número de sequências que ainda não podem ser identificadas.

Por meio dos avanços do uso de técnicas moleculares, infinitas interações edafoclimáticas podem ser observadas e até certo ponto investigadas, muitas das quais afetam de forma significativa a duração das bactérias na rizosfera das plantas e a resposta à inoculação (Skonieski 2015). Assim, mais estudos são necessários para elucidar o efeito do uso de inoculante sobre a diversidade bacteriana da rizosfera, uma vez que são poucos os estudos que abordam a diversidade através de análises metagenômicas em plantas inoculadas. São necessários principalmente estudos a nível de gênero, possibilitando entender melhor a inter-relação que ocorre no micro bioma da rizosfera.

3.6. CONCLUSÃO

A inoculação com *Azospirillum brasilense* e o genótipo do milho alteram a composição e estrutura da comunidade bacteriana da rizosfera a nível de filo e gênero.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* e o genótipo de milho não influenciam a diversidade e riqueza de bactérias da rizosfera.

A inoculação com *Azospirillum brasilense* e o genótipo de milho não influenciam a diversidade de bactérias diazotróficas da rizosfera.

3.7. REFERÊNCIAS

- BASHAN, Y. & DE-BASHAN, L.E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. *Advances in Agronomy*, vol. 108: 1st ed. Elsevier Inc.; pp. 77–136.
- BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. (2002). Impact of growth stage on the bacterial community structure along maize roots, as determined by metabolic and genetic fingerprinting. *Applied Soil Ecology* 19:135–145.
- BERENDSEN, R.L.; PIETERSE, C.M.J.; BAKKER, P.A.H.M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *cell Press* 17: 478–486.
- BERG, G. & SMALLA, K. (2009). Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 68: 1–13.
- BERTIN, C.; YANG, X.; WESTON, L.A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* 256: 67–83.
- BHARDWAJ, D.; ANSARI, M.W.; SAHOO, R.K.; TUTEJA, N. (2014). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility , plant tolerance and crop productivity. *Microbial Cell Factories* 13: 1–10.
- BODENHAUSEN, N.; HORTON, M.W.; BERGELSON, J. (2013). Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* 8:1–9.
- BROWN, C.T.; HUG, L.A.; THOMAS, B.C.; SHARON, I.; CASTELLE, C.J.; SINGH, A.; WILKINS, M.J.; WRIGHTON, K.C.; WILLIAMS, K.H.; BANFIELD, J.F. (2015). Unusual biology across a group comprising more than 15% of domain bacteria. *Nature* 523: 208–211.

- BUÉE, M.; DE BOER, W.; MARTIN, F.; VAN OVERBEEK, L.; JURKEVITCH, E. (2009). The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil* 321:189–212.
- BULGARELLI, D.; GARRIDO-OTER, R.; MÜNCH, P.C.; WEIMAN, A.; DRÖGE, J.; PAN, Y.; MCHARDY, A.C.; SCHULZE-LEFERT, P. S (2015). Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley. *Cell Host and Microbe* 17: 392–403.
- BULGARELLI, D.; SCHLAEPPI, K.; SPAEPEN, S.; THEMAAT, E.V.L. VAN; SCHULZE-LEFERT, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology* 64: 807–838.
- CAPORASO, J.G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J.; BITTINGER, K.; BUSHMAN, F.D.; ELIZABETH, K.; FIERER, N.; PEÑA, A.G.; GOODRICH, J.K.; GORDON, J.I.; HUTTLEY, G.A.; SCOTT, T.; KNIGHTS, D.; KOENIG, J.E.; LEY, R.E.; LOZUPONE, C.A.; MCDONALD, D.; BRIAN, D.; PIRRUNG, M.; REEDER, J.; SEVINSKY, J.R.; TURNBAUGH, P.J.; WALTERS, W.A.; WIDMANN, J.; YATSUNENKO, T.; ZANEVELD, J.; KNIGHT, R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature method* 7: 335–336.
- CARBONETTO, B.; RASCOVAN, N.; ÁLVAREZ, R.; MENTABERRY, A.; VÁZQUEZ, M.P. (2014). Structure, composition and metagenomic profile of soil microbiomes associated to agricultural land use and tillage systems in Argentine Pampas. *Plos One* 9: 1–11.
- CASSÁN, F.D.; OKON, Y.; CREUS, C.M. (2015). Handbook for *Azospirillum* : Technical issues and protocols. , handbook for *Azospirillum* : technical Issues and protocols. Springer International Publishing. 514p.
- CIPRIANO, M.A.P.; LUPATINI, M.; LOPES-SANTOS, L.; SILVA, M.J.; ROESCH, L.F.W.; DEST, S.A.L.; FREITAS, S.S.; KURAMAE, E.E. (2016). Lettuce and

rhizosphere microbiome responses to growth promoting *Pseudomonas* species under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology* 92: 1–13.

COBO-DÍAZ, J.F.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.J.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. (2015). Metagenomic assessment of the potential microbial nitrogen pathways in the rhizosphere of a mediterranean forest after a wildfire. *Microbial Ecology* 69: 895–904.

COOLON, J.D.; JONES, K.L.; TODD, T.C.; BLAIR, J.M.; HERMAN, M.A. (2013). Long-term nitrogen amendment alters the diversity and assemblage of soil bacterial communities in tallgrass prairie. *Plos One* 8: 1–11.

CORREA-GALEOTE, D.; BEDMAR, E.J.; ARONE, G.J. (2018). Maize endophytic bacterial diversity as affected by soil cultivation history. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–9.

CORREA-GALEOTE, D.; BEDMAR, E.J.; FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, A.J.; FERNÁNDEZ-LOPEZ, M.; ARONE, G.J. (2016). Bacterial communities in the rhizosphere of amilaceous maize (*Zea mays* L.) as assessed by pyrosequencing. *Frontiers in Plant Science* 7: 1–8.

COUGHLAN, L.M.; COTTER, P.D.; HILL, C.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A. (2015). Biotechnological applications of functional metagenomics in the food and pharmaceutical industries. *Frontiers in Microbiology* 6: 1–22.

DANCZAK, R.E.; JOHNSTON, M.D.; KENAH, C.; SLATTERY, M.; WRIGHTON, K. C.; WILKINS, M.J. (2017). Members of the candidate phyla radiation are functionally differentiated by carbon- and nitrogen-cycling capabilities. *Microbiome* 5: 1–14.

DARTORA, J.; GUIMARÃES, V.F.; MARINI, D.; SANDER, G. (2013). Adubação nitrogenada associada à inoculação com *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* na cultura do milho. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 17:1023–1029.

- DEAKIN, G.; TILSTON, E.L.; BENNETT, J.; PASSEY, T.; HARRISON, N.; FERNÁNDEZ-FERNANDEZ, F.; XU, X. (2018). Spatial structuring of soil microbial communities in commercial apple orchards. *Applied Soil Ecology* 130: 1–12.
- DEGNAN, P.H. & OCHMAN, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *The Isme Journal* 6: 183–194.
- DING, G.; RADL, V.; SCHLOTTER-HAI, B.; JECHALKE, S.; HEUER, H.; SMALLA, K.; SCHLOTTER, M. (2014). Dynamics of soil bacterial communities in response to repeated application of manure containing sulfadiazine. *Plos One*, 9: 1–10.
- DOCHERTY, K.M.; BORTON, H.M.; ESPINOSA, N.; GEBHARDT, M.; GIL-LOAIZA, J.; GUTKNECHT, J.L.M.; MAES, P.W.; MOTT, B.M.; PARNELL, J.J.; PURDY, G.; RODRIGUES, P.A.P.; STANISH, L.F.; WALSER, O.N.; GALLERY, R.E. (2015). Key edaphic properties largely explain temporal and geographic variation in soil microbial communities across four biomes. *Plos One* 9: 1–23.
- DONG, M.; YANG, Z.; CHENG, G.; PENG, L.; XU, Q.; XU, J. (2018). Diversity of the bacterial microbiome in the roots of four *Saccharum Species*: *S. spontaneum*, *S. robustum*, *S. barberi*, and *S. officinarum*. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–10.
- DROR MINZ, OFEK, M.; HADAR, Y. (2013). Plant rhizosphere microbial communities. In: Eugene Rosenberg, DeLong, E.F.; Lory, S.; Stackebrandt, E.; Thompson, F. (Eds) *The Prokaryotes* p. 57–84.
- DUNFIELD, P.F.; TAMAS, I.; LEE, K.C.; MORGAN, X.C.; MCDONALD, I.R.; STOTT, M.B. (2012). Electing a candidate : a speculative history of the bacterial phylum OP10. *Environ Microbiology* 14: 3069–3080.
- DURRER, A.; GUMIERE, T.; TAKETANIB, R.G.; COSTA, D.P.; SILVA, M.C.P.; ANDREOTEA, F. D. (2017). The drivers underlying biogeographical patterns of bacterial communities in soils under sugarcane cultivation. *Applied Soil Ecology* 110: 12–20.
- DUTTA, S.; RANI, T.S.; PODILE, A.R. (2013). Root exudate-induced alterations in

Bacillus cereus cell wall contribute to root colonization and plant growth promotion. *Plos One* 8: 1–12.

EDWARDS, J.; JOHNSON, C.; SANTOS-MEDELLÍN, C.; LURIE, E.; PODISHETTY, N.K.; BHATNAGAR, S.; EISEN, J.A.; SUNDARESAN, V. (2014). Structure , variation , and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *PNAS*, 112: 911–920.

FERGUSON, B.J.; LIN, M.; GRESSHOFF, P.M. (2013). Regulation of legume nodulation by acidic growth conditions. *Plant Signaling & Behavior* 8: 1–5.

FERREIRA, D.F. (2011). SISVAR: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, 35: 1036–1042.

FRANCO-CORREA, M. & CHAVARRO-ANZOLA, V. (2016). Actinobacteria as plant growth-promoting rhizobacteria. In: DHANASEKARAN, D. JIANG, Y. (eds). *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. p. 249–270.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. (2018). *Azospirillum* : benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 73: 1–12.

GADHAVE, K.R.; DEVLIN, P.F.; EBERTZ, A.; ROSS, A.; GANGE, A.C. (2018). Soil Inoculation with *Bacillus* spp. modifies root endophytic bacterial diversity, evenness, and community composition in a context-specific manner. *Microbial Ecology* 76: 741–750.

GALAVIZ, C.; LOPEZ, B.R.; DE-BASHAN, L.E.; HIRSCH, A.M.; MAYMON, M.; BASHAN, Y. (2018). Root growth improvement of mesquite seedlings and bacterial rhizosphere and soil community changes are induced by inoculation with plant growth- promoting bacteria and promote resto. *Land Degradation and Development* 29: 1–36.

GASTAL, F. & LEMAIRE, G. (2002). N uptake and distribution in crops: an agronomical and ecophysiological perspective. *Journal of Experimental Botany*

53: 789–799.

- GU, Y.; WANG, Y.; LU, S.; XIANG, Q.; YU, X.; ZHAO, K.; ZOU, L.; CHEN, Q.; TU, S.; ZHANG, X. (2017). Long-term fertilization structures bacterial and archaeal communities along soil depth gradient in a paddy soil. *Frontiers in Microbiology* 8: 1–15.
- GULATI, A.; VYAS, P.; RAHI, P.; KASANA, R.C. (2009). Plant growth-promoting and rhizosphere-competent acinetobacter rhizosphaerae strain BIHB 723 from the cold deserts of the himalayas. *Current Microbiology* 58: 371–377.
- HAICHAR, Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J.I.; PROSSER, J.I.; BALESSENT, J.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. (2008). Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* 2: 1221–1230.
- HARTMANN, A. & BASHAN, Y. (2009). Ecology and application of *Azospirillum* and other plant growth-promoting bacteria (PGPB). - Special Issue. *European Journal of Soil Biology* 45: 1–2.
- HERSCHKOVITZ, Y.; LERNER, A.; DAVIDOV, Y.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. (2005). *Azospirillum brasilense* does not affect population structure of specific rhizobacterial communities of inoculated maize (*Zea mays*). *Environ Microbiology* 7: 1847–1852.
- HERSCHKOVITZ, Y.; LERNER, A.; DAVIDOV, Y.; ROTHBALLER, M.; HARTMANN, A.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. (2005). Inoculation with the plant-growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* causes little disturbance in the rhizosphere and rhizoplane of maize (*Zea mays*). *Microbial Ecology* 50: 277–288.
- HINSINGER, P. & MARSCHNER, P. (2006). Rhizosphere perspectives and Challenges a tribute to Lorenz Hiltner. *Plant and Soil* 283:1–2.
- INDIRAGANDHI, P.; ANANDHAM, R.; MADHAIYAN, M.; SA, T. (2008).

Characterization of plant growth-promoting traits of bacteria isolated from larval guts of Diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology* 56: 327–333.

JOHNSTON-MONJE, D.; LUNDBERG, D.S.; LAZAROVITS, G.; REIS, V.M.; RAIZADA, M.N. (2016). Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. *Plant and Soil* 405: 337–355.

JU, W.; LIU, L.; FANG, L.; CUI, Y.; DUAN, C.; WU, H. (2018). Impact of co-inoculation with plant-growth-promoting rhizobacteria and rhizobium on the biochemical responses of alfalfa-soil system in copper contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 167: 218–226.

KIELAK, A.M.; CIPRIANO, M.A.P.; KURAMAE, E.E. (2016). Acidobacteria strains from subdivision 1 act as plant growth promoting bacteria. *Archives of Microbiology* 198: 987–993.

KINDAICHI, T.; YAMAOKA, S.; UEHARA, R.; OZAKI, N.; OHASHI, A.; ALBERTSEN, M.; NIELSEN, P.H.; NIELSEN, J.L. (2016). Phylogenetic diversity and ecophysiology of candidate phylum Saccharibacteria in activated sludge. *FEMS Microbiology Ecology* 92: 1–11.

KUAN, K.B.; OTHMAN, R.; RAHIM, K.A. S, Z.H. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria inoculation to enhance vegetative growth , nitrogen fixation and nitrogen remobilisation of maize under greenhouse conditions. *Plos One*11: 1–19.

KURAMAE, E.E.; YERGEAU, E.; WONG, L.C.; PIJL, A.S.; VEEN, J.A. VAN, KOWALCHUK, G.A. (2012). Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. *FEMS Microbiology Ecology* 79: 12–24.

LACAL, J.; MUÑOZ-MARTÍNEZ, F.; REYES-DARIAS, J.A.; DUQUE, E.; MATILLA, M.A.; SEGURA, A.; CALVO, JOSE JULIO ORTEGA, CELIA, J.-S.; KRELL, T.; RAMOS, J.L. (2011). Bacterial chemotaxis towards aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas*. *Environmental Microbiology* 13:1733–1744.

- LAKSHMANAN, V.; SELVARAJ, G.; BAIS, H.P. (2014). Functional soil microbiome : belowground solutions to an aboveground problem. *Update on the Soil Microbiome Functional* 166: 689–700.
- LEE, S.; KA, J.; CHO, J. (2008). Members of the phylum acidobacteria are dominant and metabolically active in rhizosphere soil. *FEMS Microbiology Ecology* 285: 263–269.
- LEFÈVRE, C.T.; FRANKEL, R.B.; ABREU, F.; LINS, U.; BAZYLINSKI, D.A. (2011). Culture-independent characterization of a novel, uncultivated magnetotactic member of the nitrospirae phylum. *Environ Microbiology* 13: 538–549.
- LI, X.; RUI, J.; MAO, Y.; YANNARELL, A.; MACKIE, R. (2014). Dynamics of the bacterial community structure in the rhizosphere of a maize cultivar. *Soil Biology and Biochemistry* 68: 392–401.
- LING, N.; CHEN, D.; GUO, H.; WEI, J.; BAI, Y.; SHEN, Q.; HU, S. (2017). Differential responses of soil bacterial communities to long-term N and P inputs in a semi-arid steppe. *Geoderma* 292: 25–33.
- LÜCKER, S.; WAGNER, M.; MAIXNER, F.; PELLETIER, E.; KOCH, H.; VACHERIE, B.; RATTEI, T.; DAMSTÉ, J.S.S.; SPIECKG, E.; PASLIER, D. LE, DAIMSA, H. (2010). A Nitrospira metagenome illuminates the physiology and evolution of globally important nitrite-oxidizing bacteria. *PNAS* 107: 13479–13484.
- LUNDBERG, D.S.; LEBEIS, S.L.; PAREDES, S.H.; YOURSTONE, S.; GEHRING, J.; MALFATTI, S.; TREMBLAY, J.; ENGELBREKTSON, A.; KUNIN, V.; DEL RIO, T.G.; EDGAR, R. C. EICKHORST, T.; LEY, R.E.; HUGENHOLTZ, P.; TRINGE, S.G.; DANGL, J.L. (2012). Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488: 86–90.
- MAHONEY, A.K.; YIN, C.; HULBERT, S.H. (2017). Community structure , species variation , and potential functions of rhizosphere-associated bacteria of different winter wheat (*Triticum aestivum*). cultivars. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–14.

- MOREIRA, F.M.S. SIQUEIRA, J.O. (2006). *Rizosfera*. In: MOREIRA, F.M.S. SIQUEIRA, J.O (Eds) *Microbiologia E Bioquímica Do Solo*. Universidade Federal de Lavras. Lavras. p.407-448
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (2019). Disponível em: <[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=>](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/?term=) Acesso em 15 de fevereiro de 2019.
- NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M. (2015). Endophytic and epiphytic microbes as “sources” of bioactive agents. *Frontiers in Chemistry* 3: 1–13.
- NIE, Y.; WANG, M.; ZHANG, W.; NI, Z.; HASHIDOKO, Y.; SHEN, W. (2018). Ammonium nitrogen content is a dominant predictor of bacterial community composition in an acidic forest soil with exogenous nitrogen enrichment. *Science of the Total Environment* 624: 407–415.
- PARK, D.; KIM, H.; YOON, S. (2017). Nitrous oxide reduction by an obligate aerobic bacterium, *Gemmatimonas aurantiaca* strain T-27. *Applied and Environmental Microbiology* 83: 1–12.
- PEIFFER, J.A. & LEY, R.E. (2013). A glimpse into a highly complex system. *Communicative & Integrative Biology* 6: 6–8.
- PEIFFER, J.A.; SPOR, A.; KOREN, O.; JIN, Z.; GREEN, S.; DANGL, J.L. EDWARD S. BUCKLERA, E.S.; LEYB, R.E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *PNAS*, 110: 6548–6553.
- PEREIRA, A.D.; LEAL, C.D.; DIAS, M.F.; ETCHEBEHERE, C.; CHERNICHARO, C.A.L.; ARAÚJO, J.C (2014). Effect of phenol on the nitrogen removal performance and microbial community structure and composition of an anammox reactor. *Bioresource Technology* 166: 103–111.
- PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J.M.; LEMANCEAU, P.; PUTTEN, W.H.V.D. (2013).

Going back to the roots : the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* 11: 789–799.

PORTILLO, M. C. & GONZÁLEZ, J.M. (2009). Members of the candidate division op10 are spread in a variety of environments. *World Journal Microbiol Biotechnol* 25: 347–353.

RAAIJMAKERS, J.M. & LUGTENBERG, B.J.J. (2013). Perspectives for rhizosphere research. *Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere* 2: 1227–1232.

RACHID, C.T.C.C.; SANTOS, A.L.; PICCOLO, M.C.; BALIEIRO, F.C.; COUTINHO, H.L.C.; PEIXOTO, R.S.; TIEDJE, J.M.; ROSADO, A.S. (2013). Effect of sugarcane burning or green harvest methods on the brazilian cerrado soil bacterial community structure. *Plos One* 8: 1–8.

RANA, A.; SAHARAN, B.; JOSHI, M. PRASANNA, R.; KUMAR, K.; NAIN, L. (2011). Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of Microbiology* 61: 893–900.

REN, M.; ZHANG, Z.; WANG, X.; ZHOU, Z.; CHEN, D.; ZENG, H.; ZHAO, S.; CHEN, L.; HU, Y.; ZHANG, C.; YUNXIANG, L.; SHE, Q.; ZHANG, Y.; NAN, P. (2018). Diversity and contributions to nitrogen cycling and carbon fixation of soil salinity shaped microbial communities in Tarim Basin. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–14.

REVEILLAUD, J.; MAIGNIEN, L.; EREN, M.A.; HUBER, J.A.; APPRILL, A.; SOGIN, M.L.; VANREUSEL, A. (2014). Host-specificity among abundant and rare taxa in the sponge microbiome. *The ISME Journal*. 8: 1198–1209.

RICHARDSON, A.E.; BAREA, J.M.; MCNEILL, A.M.; PRIGENT-COMBARET, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321: 305–339.

SHAKYA, M.; GOTTEL, N.; CASTRO, H.; YANG, Z.K.; GUNTER, L.; LABBE, J.; MUCHERO, W.; BONITO, G.; VILGALYS, R.; TUSKAN, G.; PODAR, M.; SCHADT, C.W. (2013). A multifactor analysis of fungal and bacterial community

structure in the root microbiome of mature populus deltoides trees. *Plos One*, 8: 1–12.

SHEN, G.; ZHANG, S.; LIU, X.; JIANG, Q.; DING, W. (2018). Soil acidification amendments change the rhizosphere bacterial community of tobacco in a bacterial wilt affected field. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102: 9781–9791.

SKONIESKI, F.R. (2015). Inoculação de *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio em milho para produção de silagem e grãos. 94f. Tese (Doutorado em Zootecnia) Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria-RS.

SMITH, S.; HABIB, A.; KANG, Y.; LEGGETT, M.; DÍAZ-ZORITA, M. (2015). No LCO applications provide improved responses with legumes and nonlegumes. biological. In: de BRUIJNEN, F (Ed) Biological nitrogen fixation. v.2, chapter 107. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, USA. p 1077–1086.

SOROKIN, D.Y.; LUCKER, S.; VEJMEJKOVA, D.; KOSTRIKINA, N.A.; KLEEREBEZEM, R.; RIJPSTRA, W.I.C.; SINNINGHE DAMSTÉ, J.S.; LE PASLIER, D.; MUYZER, G.; WAGNER, M.; VAN LOOSDRECHT, M.C.M. VAN, DAIMS, H. (2012). Nitrification expanded : discovery , physiology and genomics of a nitrite-oxidizing bacterium from the phylum chloroflexi. *The ISME Journal* 6: 2245–2256.

SUBEDI, K.D.& MA, B.L. (2009). Assessment of some major yield-limiting factors on maize production in a humid temperate environment. *Field Crops Research* 110: 21–26.

TRABELSI, D. & MHAMDI, R. (2013). Microbial Inoculants and their impact on soil microbial communities : a microbial inoculants and their impact on soil microbial communities : A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 1–11.

TRIVEDI, P.; DELGADO-BAQUERIZO, M.; ANDERSON, I.C.; SINGH, B.K. (2016). Response of soil properties and microbial communities to agriculture : implications

for primary productivity and soil health indicators. *Frontiers in Plant Science.*; 7: 1–13.

UMESHA SHARANAIAH.; SINGH PRADEEP KUMAR.; SINGH, RAJAT PRATAP (2018). Microbial biotechnology and sustainable agriculture. In: SINGH, RAM LAKHAN AND MONDAL, SUKANTA (Eds). *Biotechnology for Sustainable Agriculture*. Sawston: Woodhead Publishing). p.185–205.

UNIPROT (2019). UniProtKB. Disponível em: <<https://www.uniprot.org/uniprot/?query=sort=score>.> Acesso em 18 de fev de 2019.

VEZZANI, F.M.; ANDERSON, C.; MEENKEN, E.; GILLESPIE, R.; PETERSON, M.; BEARE, M.H. (2018). The importance of plants to development and maintenance of soil structure, microbial communities and ecosystem functions. *Soil and Tillage Research* 175: 139–149.

WILSON, M.C.; MORI, T.; RÜCKERT, C.; URIA, A.R.; HELF, M.J.; TAKADA, K.; GERNERT, C.; STEFFENS, U.A.E.; HEYCKE, N.; SCHMITT, S.; RINKE, C.; HELFRICH, E.J.N.; BRACHMANN, A.O.; GURGUI, C.; WAKIMOTO, T.; KRACHT, M.; CRÜSEMANN, M.; HENTSCHEL, U.; ABE, I.; MATSUNAGA, S.; KALINOWSKI, J.; TAKEYAMA, H.; PIEL, J. (2014). An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* 000: 58–62.

WOOD, S.A.; KARP, D.S.; DECLERCK, F.; KREMEN, C.; NAEEM, S.; PALM, C.A. (2015). Functional traits in agriculture : agrobiodiversity and ecosystem services. *Trends in Ecology and Evolution* 30: 1–9.

WRIGHTON, K.C.; THOMAS, B.C.; SHARON, I.; MILLER, C.S.; CASTELLE, C.J.; VERBERKMOES, N.C.; WILKINS, M.J.; HETTICH, R.L.; LIPTON, M.S.; WILLIAMS, K.H.; LONG, P.E.; BANFIELD, J.F. (2012). Fermentation, hydrogen, and sulfur metabolism in multiple uncultivated bacterial phyla. *Science* 337: 1661–1665.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. (2012). Plant nitrogen assimilation and use efficiency.

Annual Review of Plant Biology 63, 153–182.

- YAKIMOV, M.M.; CONO, V. LA, SLEPAK, V.Z.; SPADA, G. LA, ARCADI, E.; MESSINA, E.; BORGHINI, M.; MONTICELLI, L.S.; ROJO, D.; BARBAS, C.; GOLYSHINA, O. V, FERRER, M.; GOLYSHIN, P.N.; GIULIANO, L. (2013). Microbial life in the lake medee, the largest deep-sea salt-saturated formation. *Nature Scientific Reports* 3: 1–9.
- YANG, Y.; WANG, N.; GUO, X.; ZHANG, Y.; YE, B. (2017). Comparative analysis of bacterial community structure in the rhizosphere of maize by high- throughput pyrosequencing. *Plos One*12: 1–11.
- YILMAZ, P.; PARFREY, L.W.; YARZA, P.; GERKEN, J.; LUDWIG, W.; PRUESSE, E.; QUAST, C.; SCHWEER, T.; Peplies, J .;Ludwig, W.; Glöckner, F.O (2014). The SILVA and “ All-species Living tree project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research* 42: 643–648.
- YOUSUF, B.; KESHRI, J.; MISHRA, Um.; JHA, B. (2012). Application of targeted metagenomics to explore abundance and diversity of CO₂ - fixing bacterial community using cbbL gene from the rhizosphere of *Arachis hypogaea*. *Gene*, 506: 18–24.
- ZEBARTH, B.J.; DRURY, C.F.; TREMBLAY, N.; CAMBOURIS, A.N. (2009). Opportunities for improved fertilizer nitrogen management in production of arable crops in eastern Canada : A review. *Canadian Journal of soil Science* 89: 113–132.
- ZHOU, X.; WANG, Z.; JIA, H.; LI, L.; WU, F. (2018). Continuously monocropped jerusalem artichoke changed soil bacterial community composition and ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria abundances. *Frontiers in Microbiology.*; 9: 1–14.

4. CAPÍTULO III- GANHOS DE PRODUTIVIDADE E ACÚMULO DE NUTRIENTES EM FUNÇÃO DO GENÓTIPO DE MILHO E INOCULAÇÃO COM *Azospirillum brasilense*.

4.1. RESUMO

O uso de bactérias diazotróficas como inoculantes está entre as alternativas para redução do consumo de insumos nitrogenados na cultura do milho. Objetivou-se neste trabalho, avaliar os efeitos agronômicos em híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. O estudo foi conduzido em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG. Foram avaliados sete híbridos de milho (BRS1055; BRS1040; BRS1060; BRS1010; BRS3042; DKB390 DKB310) na presença e ausência de um inoculante constituído de três diferentes estirpes de *Azospirillum brasilense*, em delineamento de blocos casualizados, com quatro repetições. No plantio efetuou-se uma adubação base de 300 kg.ha⁻¹ da formulação 8-28-16. Não se efetuou a adubação de cobertura. O inoculante foi preparado a partir de três estirpes de *Azospirillum brasilense* e posteriormente aplicado nas sementes. Avaliou-se as características agronômicas como: altura de Planta, altura de Espiga. Índice de SPAD, Teor e acúmulo de NPK e produtividade de grãos. Observou-se que alguns híbridos de milho apresentam variações para o índice de SPAD, Teores e Acúmulo de nutrientes e produtividade de grãos, na ausência do inoculante, na presença do inoculante e na combinação da presença e ausência do inoculante. Não apresentando influência para altura de Planta e altura de espiga. Assim conclui-se que o uso de inoculantes influencia nas características com ganhos positivos na produtividade de grãos e acúmulo de nutrientes dependendo do genótipo de milho utilizado.

Palavras chaves: FBN; *Zea mays*; biotecnologia

4.2. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um cereal de grande importância na agricultura brasileira. Devido ao alto valor nutritivo é destinado a alimentação animal e humana. Os grãos são compostos de amido, proteína, fibras e óleo (Araújo 2017; Lima *et al.* 2018).

Estima-se que uma área equivalente a 16 milhões de hectares foi plantada no ano agrícola 2018/2019 incrementando o aumento de 0,4% em relação à safra 2017/2018. A estimativa de produtividade de grãos para apenas janeiro/2019 é de 5.476 kg por hectare (CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento 2018) porém condições ambientais como clima e fatores nutricionais do solo podem afetar significativamente sobre estes valores (Dias *et al.* 2018).

O Nitrogênio (N) é o principal nutriente requerido pela planta e está relacionado com o metabolismo, desenvolvimento e produtividade do milho, sendo um elemento fundamental na estruturação de aminoácidos, enzimas, ácidos nucléicos e clorofilas da planta (Taiz & Zeiger 2013). Devido a relação entre disponibilidade de N e produtividade de grãos do cultivar, aumentou-se a aplicação de fertilizantes nitrogenados nas lavouras com o intuito de obter melhores rendimentos na cultura (Morais *et al.* 2018; Pinto *et al.* 2017).

A adubação nitrogenada na cultura do milho geralmente é dividida devido as perdas destes nutrientes quando aplicadas em altas doses em única aplicação, sendo a primeira é realizada na semeadura e a outra no estágio V4 - V8 da planta e é capaz de perfazer um aproveitamento de 50% do fertilizante fornecido durante todo o processo.

A aplicação de fertilizantes, além do impacto gerado ao meio ambiente, demanda alto investimento de recursos financeiros, com isso a implementação de tecnologias biológicas têm representado uma alternativa importante capaz de reduzir custos e aumentar a produtividade sem causar dano ambiental (Valderrama *et al.* 2009). Entre as tecnologias está o uso de bactérias que fixam o nitrogênio, cuja fórmula química não é assimilável pelas plantas.

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) utiliza bactérias diazotróficas, capazes de fixar N atmosférico, para suplementar e diminuir a aplicação de fertilizantes nitrogenados. Além disso, a FBN contribui com a redução dos gases de

efeito estufa e da poluição ambiental. O processo de fixação ocorre através da via enzimática nitrogenase que viabiliza a quebra das ligações da molécula de nitrogênio atmosférico (N_2) reduzindo-o a amônia (NH_3), que é facilmente assimilável pela planta (Nunes *et al.* 2003)

Microrganismos rizosféricos do gênero *Azospirillum* são considerados promotores de crescimento vegetal e vivem em associação com diversas plantas, inclusive o milho. Devido ao potencial diazotrófico expressado por este grupo, tais microrganismos são utilizados para FBN (Schaefer *et al.* 2018).

Dentre as espécies do gênero, o *Azospirillum brasilense* é o mais estudado. Autores relatam a capacidade do organismo em aumentar a superfície radicular, acumular nutrientes como Nitrogênio e Fósforo, induzir a produção de fitormônios, que auxiliam no crescimento vegetal, tolerância a estresse hídrico e aumentam a produtividade de grãos (Santini 2018; Santos 2018). Diante do exposto, esse trabalho se justifica por avaliar o desempenho agrônômico de diferentes híbridos submetidos a inoculação com novas estirpes de *Azospirillum brasilense*. Por isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o acúmulo de nutrientes em milho inoculados com *Azospirillum brasilense* e a produtividade de grãos.

4.3. MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1. Instalação experimental

O experimento foi conduzido em solo Latossolo Vermelho Distrófico, em área experimental da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas - MG, 19°28'S de latitude sul e longitude 44°15'08" W GrW. No ano agrícola de 2016, durante a segunda safra (safrinha). Foram avaliados sete híbridos de milho combinados com inoculante a base de *Azospirillum brasilense*, totalizando 14 tratamentos: BRS1055; BRS1055 +Inoc; BRS1040; BRS1040+Inoc; BRS1060; BRS1060+Inoc; BRS1010, BRS1010+Inoc BRS3042; BRS3042+Inoc; DKB390; DKB390+Inoc; DKB310; DKB310+Inoc. O delineamento utilizado foi o de blocos casualizados, com quatro repetições. As

parcelas foram constituídas de duas linhas de 5m de comprimento, espaçadas de 0,70m entre linhas e 0,20m entre plantas. Foram plantadas 22 sementes por linhas. A adubação de base foi de 300kg.ha⁻¹ de NPK da formulação 8-28-16, sem adubação de cobertura.

4.3.2. Preparo do inoculante

O inoculante foi preparado através da metodologia descrita por Oliveira *et al.* (2013), adaptada. Três estirpes de bactérias de *Azospirillum brasilense* (E7, E11 e E26) pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo, foram cultivadas separadamente em caldo de soja trip-caseína, durante 72h, à temperatura de 29°C sob agitação de 350 rpm constante. Após esse período, os inóculos foram centrifugados por 10 minutos a 6000 G e retirado o sobrenadante. As células bacterianas foram ressuspensas em solução salina [0,85% (m/v) NaCl] e ajustadas para aproximadamente 10⁸ UFC mL⁻¹. Posteriormente as suspensões foram incorporadas a carvão vegetal moído (60% p/v) como veículo e adicionadas às sementes umedecida com goma de fécula de mandioca (5%, p/v) como agente adesivo. Depois de concluída a inoculação, foi realizado o plantio.

4.3.3. Características agronômicas avaliadas

Foram avaliadas algumas características agronômicas: altura de Planta (AP), altura de Espiga (AE), Índice de SPAD (SPAD), Massa seca (MASP), Teores e acúmulo de Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K) na parte aerea e ao Produtividade de Grãos (PG).

4.3.3.1. Altura de Planta

A altura da planta foi medida do solo até a inserção da folha bandeira.

4.3.3.2. Altura de espiga

A altura da espiga foi medida do solo até a inserção da primeira espiga.

4.3.3.3. Índice de SPAD

O índice de SPAD, que mede a coloração verde e foi medido utilizando o medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Minolta Camera Co. Ltda.). As medições foram realizadas durante o estágio de florescimento.

O clorofilômetro apresenta diodos que emitem radiação em comprimentos de onda de 650 e 940 nm, sendo luz vermelha e radiação infravermelha, respectivamente. A luz passa através da folha, é recebida por um fotodiodo de silicone e é transformada, a princípio, em sinais elétricos e, depois, em sinais digitais. Estes passam por um processador que calcula os valores medidos e estes estão relacionados a intensidade da cor verde.

4.3.3.4. Massa seca

Para determinação da massa seca dos tecidos vegetais as quatro plantas coletadas submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar, sob temperatura de 65°C até atingir massa constante, conforme trabalho realizado por (Oliveira *et al.* 2013). Posteriormente, as amostras foram pesadas e a variável expressa em Kg.ha⁻¹.

4.3.3.5. Teores e acúmulo de Nitrogênio (N) na parte aérea

Para se verificar o teor de N na parte aérea, as amostras dos tecidos vegetais após a determinação da massa seca foram moídas para retirada de uma subamostra de 300g para análise. Elas foram analisadas de acordo com a metodologia de Dumas (1.831), que consiste na oxidação total da amostra na presença de oxigênio em elevadas temperaturas, seguida de redução dos óxidos de nitrogênio e detecção do nitrogênio molecular produzido. Para isso utilizou-se de um analisador de Nitrogênio, marca LECO, modelo FP-528, provido de carrossel amostrador com 35 posições. Para o acúmulo de Nitrogênio foi realizado o cálculo a partir do teor de N multiplicado pela massa seca e expressa em Kg.ha^{-1} .

4.3.3.6. Teores de Fósforo (P) e Potássio (K) na parte aérea.

Os teores de P e K foram obtidos por espectrometria de emissão plasma e o acúmulo dessas duas variáveis calculadas a partir do teor multiplicado pela massa seca e expressa em Kg.ha^{-1} .

4.3.3.7. Produtividade de grãos e produtividade relativa de grãos

Para avaliar a produtividade de grãos, as espigas foram colhidas. Retirou-se toda a palha das espigas, e procedeu-se a debulha dos grãos de cada parcela. Posteriormente foi determinado o peso de grãos, o qual foi corrigido para umidade 13% e expresso em kg.ha^{-1} .

A produtividade relativa de grãos é calculada através de porcentagem, considerando o tratamento não inoculado como zero e a produção do inoculado em relação a ele.

4.3.4. Análises estatísticas

Foi realizada a análise de variância e comparações de médias pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade para as características avaliadas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o aplicativo computacional Sisvar (Ferreira 2011).

4.4. RESULTADOS

Os resultados da análise de variância para as variáveis AP, AE, e índice de SPAD podem ser vistos na Tabela 2. Conforme resumo da análise de variância, apenas a característica de SPAD apresentou diferença para a fonte de variação híbridos com inoculante e para o Híbrido BRS3042 com ausência e presença do inoculante ($p < 0,05$). A média do índice de SPAD foi de 27,42 e apresentou maiores valores para os híbridos inoculados BRS1055, BRS1040, BRS1060, BRS1010 e BRS3042, com médias de 29,10, 27,22, 32,07, 30,58 e 34,50 (unidade SPAD) respectivamente, diferindo dos híbridos DKB390 e DKB310 com médias de 25,82 e 21,41 (unidade SPAD) (Figura 15). O resultado da comparação para cada híbrido na presença e ausência do inoculante está disposto na (Figura 16), o BRS3042 apresentou maior índice de SPAD na presença do inoculante com 34,5 (unidade SPAD) (Figura 16-E).

Tabela 2- Resumo das análises de variância para as características, altura de planta (AP), altura de espiga (AE) e Índice de SPAD (SPAD) avaliados em híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*.

FV	GL	Quadrado Médio		
		AP (cm)	AE (cm)	SPAD (unid SPAD)
BLOCO	3	567,85	42,11	57,62
TRATAMENTOS	13	176,78ns	150,58ns	55,33ns
HIBRIDO SEM INOC	6	162,20ns	123,80ns	30,41ns
HIBRIDO COM INOC	6	218,15ns	130,95ns	74,88**
BRS1055 X BRS1055+INOC	1	28,12ns	3,12ns	17,88ns
BRS1040 X BRS1040+INOC	1	50,00ns	112,50ns	0,80ns
BRS1060 X BRS1060+INOC	1	0ns	12,50ns	0,48ns
BRS1010 X BRS1010+INOC	1	12,50ns	3,12ns	44,46ns
BRS3042 X BRS3042+INOC	1	3,12ns	312,50ns	141,45*
DKB390 X DKB390+INOC	1	78,12ns	28,12ns	21,22ns
DKB310 X DKB310+INOC	1	253,12ns	450,00ns	17,94ns
ERRO	39	290	174,48	32,21
CV		8,57	11,08	20,7
MEDIA		198,82	119,19	27,42

ns,*,** não significativo, significativo a 1 e 5% respectivamente.

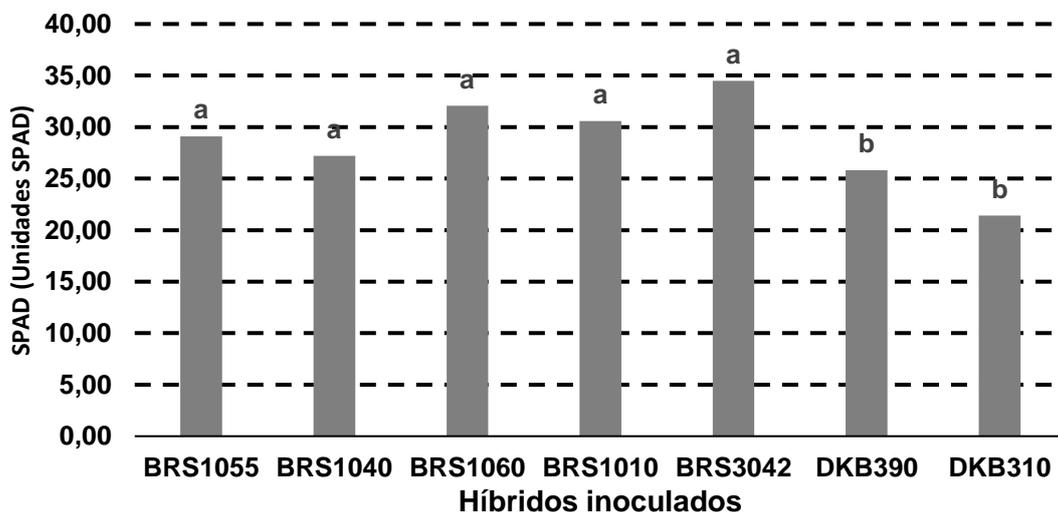


Figura 15- SPAD (unidades SPAD) entre os diferentes tipos de Híbridos de milho inoculados com *Azospirillum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

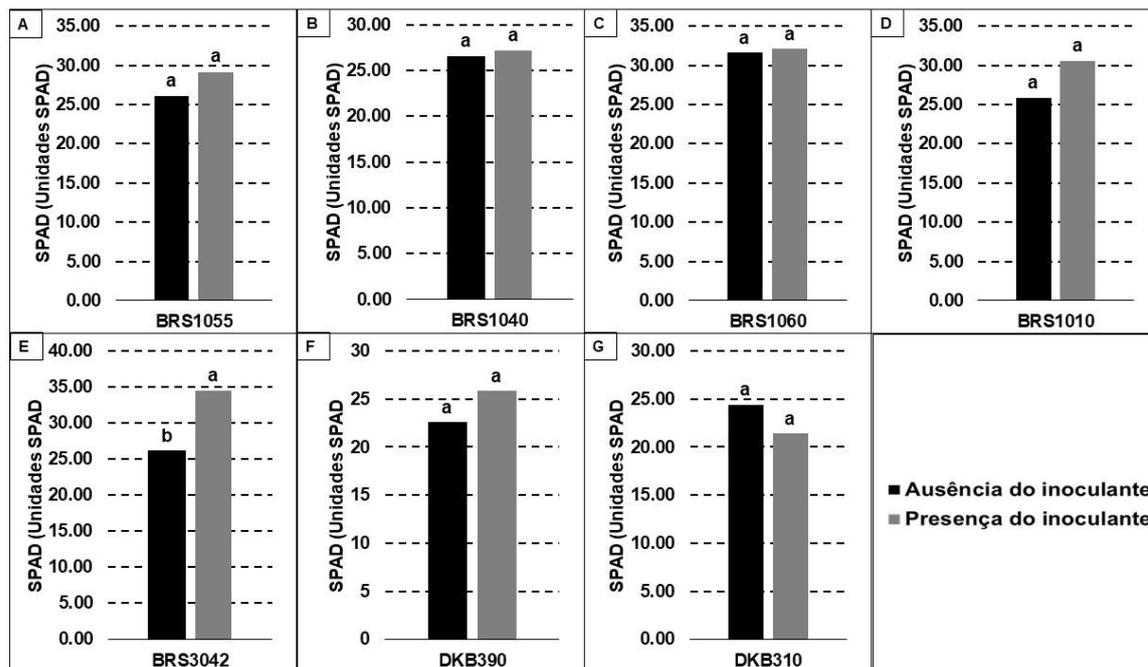


Figura 16- SPAD (unidades SPAD) para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

Os resultados da análise de variância para as variáveis Teor de N, P, e K podem ser vistos na Tabela 3. De acordo com o resumo da análise, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para a fonte de variação tratamentos (Teor de N, P e K), entre híbridos não inoculados (Teor de N e P), híbridos inoculados (Ter de P) e para cada híbrido comparado na presença e ausência do inoculante BRS1060 e BRS1010 (Teor de N), BRS3042 (Teor de N e P) DKB310 (Teor de P). A média do teor de N nos tecidos vegetais foi de 1,10% e apresentou aumento para BRS1055 (1,08%), BRS1055+Inoc (1,24%), BRS1040 (1,12%), BRS1040+Inoc (1,16%), BRS1060 (1,39), BRS1060+Inoc (1,06%), BRS1010+Inoc (1,16%), BRS3042+Inoc (1,23%), DKB390 e DKB390+Inoc (1,18%) diferindo estatisticamente dos demais (Figura 17). Para a fonte de variação híbridos sem inoculante (Figura 18) é possível ver diferença entre três grupos com diferenças estatísticas, o BRS1060 sozinho apresentou maior teor de N com 1,39%, seguido do BRS1055, BRS1040 e DKB390 com 1,08, 1,12 e 1,18% respectivamente e por último BRS3042 e DKB310 com 0,85 e 0,88% respectivamente. Já para a comparação entre híbrido inoculados e sem inoculação (Figura 19), o híbrido BRS 1060 sem inoculação apresentou maior teor de N (1,39%) (Figura 19-A), já para o BRS1010 (Figura 19-D) e BRS3042 (Figura 19-E)

o maior teor de N foi na presença do inoculante com médias respectivas de 1,16% e 1,23%

O teor de P nos tecidos vegetais obteve média de 0,98 (g/Kg) e apresentou aumento para os tratamentos BRS1055 (1,00 g/Kg), BRS1055+Inoc (1,07 g/Kg), BRS1040+Inoc (1,04 g/Kg), BRS1060+Inoc (1,01 g/Kg), BRS3042+Inoc (1,18 g/Kg), DKB390 (1,05 g/Kg) e DKB310+Inoc (1,29 g/Kg) diferindo estatisticamente dos demais (Figura 20). Para a fonte de variação híbridos não inoculados (Figura 21) é possível observar maiores teores de P para BRS1055, BRS1040 e DKB310 com médias de 1,00, 0,94 e 1,04 (g/Kg) respectivamente. Já para híbridos com inoculante pode-se verificar aumento para BRS3042 (1,18 g/Kg) e DKB310 (1,28 g/Kg) (Figura 22). Quando comparado cada híbrido na presença e ausência do inoculante (Figura 23), pode-se verificar que os híbridos BRS3042 (Figura 23-E) e DKB310 (Figura 23-G) apresentam aumentam no teor de P quando inoculados.

O teor de K apresentou média 10,73 (g/Kg) e apresentou aumento nos tratamentos BRS1055+Inoc (11,62 g/Kg), BRS1040+Inoc (12,56 g/Kg), BRS1060 (11,36 g/Kg), BRS1060+Inoc (11,03 g/Kg), BRS1010 (12,56 g/Kg), BRS3042+Inoc (11,71g/Kg) e DKB390+Inoc (10,92 g/Kg) (Figura 24).

Tabela 3- Resumo das análises de variância para as características, Teor de N (%), Teor de P (g/Kg) e Teor de K (g/Kg) avaliados em híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*.

FV	GL	Quadrado Médio		
		TEOR DE N (%)	TEOR DE P (g/Kg)	TEOR DE K (g/Kg)
BLOCO	3	0,09	0,09	11,44
TRATAMENTOS	13	0,09**	0,07**	5,50*
HIBRIDO SEM INOC	6	0,14**	0,03*	5,64ns
HIBRIDO COM INOC	6	0,04ns	0,08**	5,53ns
BRS1055 X BRS1055+INOC	1	0,05ns	0,01ns	7,39ns
BRS1040 X BRS1040+INOC	1	0,002ns	0,01ns	8,82ns
BRS1060 X BRS1060+INOC	1	0,21**	0,02ns	0,22ns
BRS1010 X BRS1010+INOC	1	0,10*	0,009ns	8,62ns
BRS3042 X BRS3042+INOC	1	0,28**	0,23*	5,95ns
DKB390 X DKB390+INOC	1	0,00ns	0,07ns	0,93ns
DKB310 X DKB310+INOC	1	0,009ns	0,44**	0,01ns
ERRO	39	0,01	0,02	2,69
CV		12,18	15,72	15,28
MEDIA		1,1	0,98	10,73

ns, **, não significativo, significativo a 1 e 5% respectivamente.

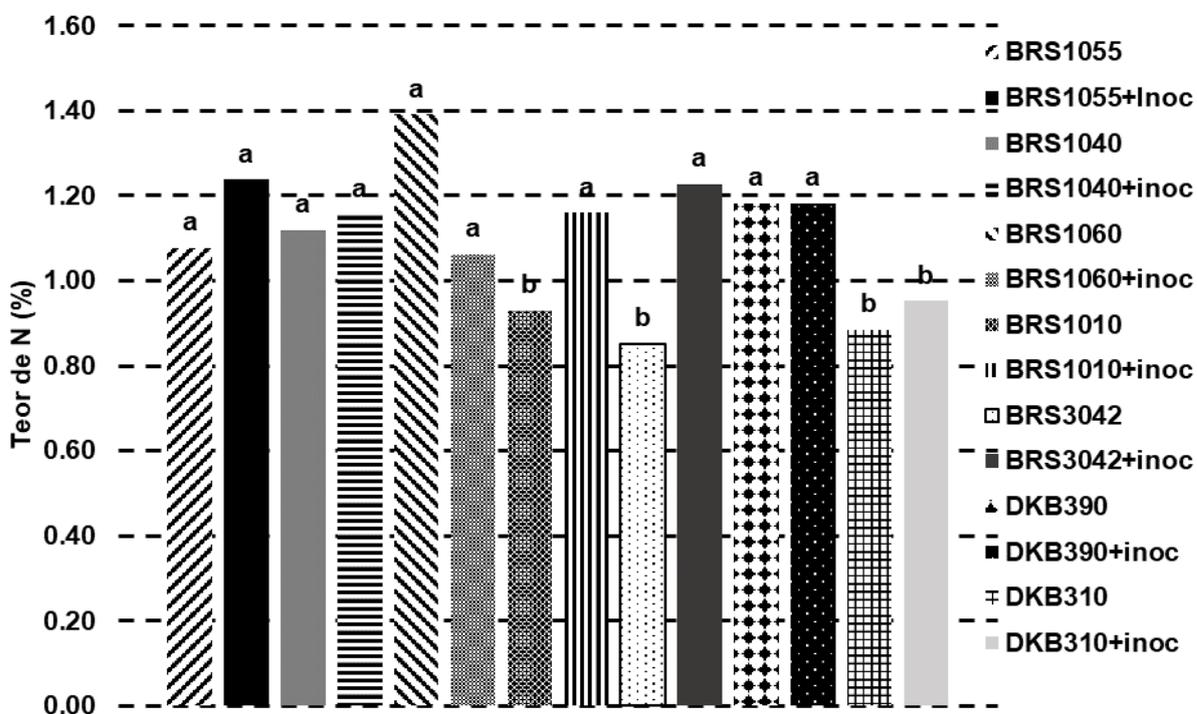


Figura 17- Teor de N entre tratamentos - híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

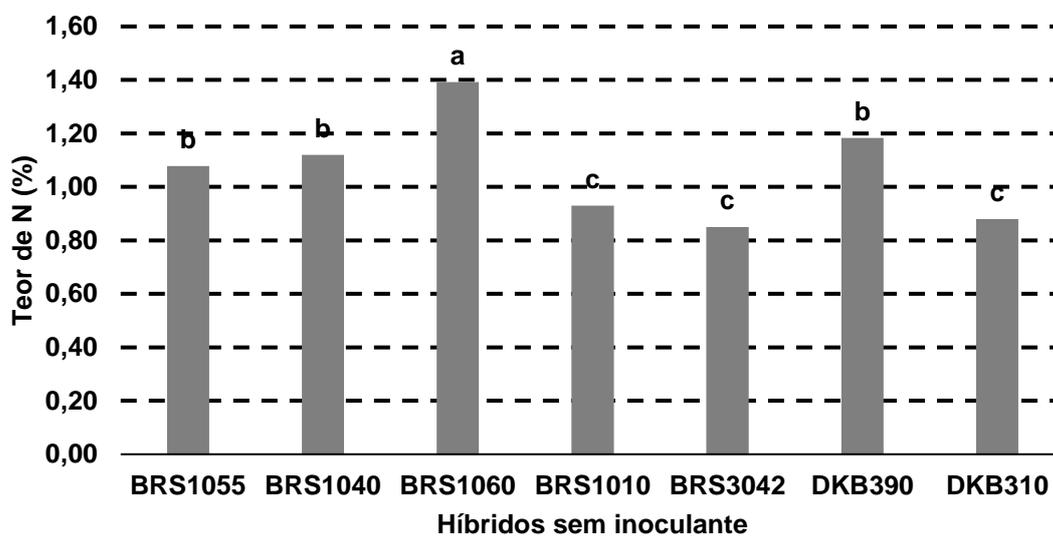


Figura 18- Teor de N entre híbridos sem inoculação. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott

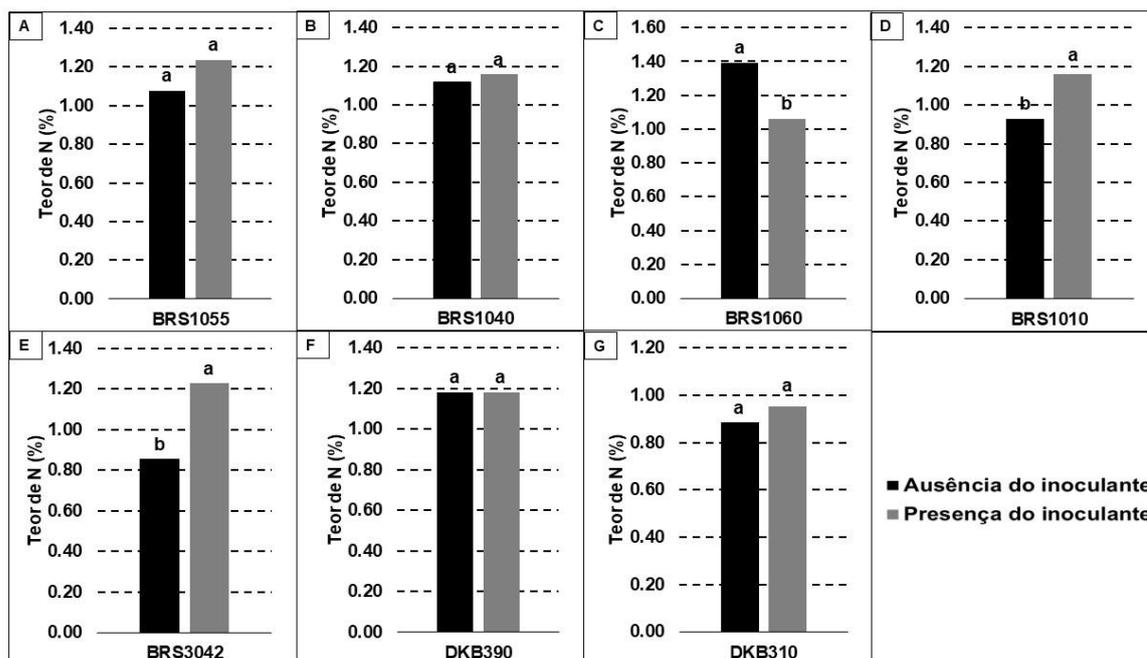


Figura 19- Teor de N para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

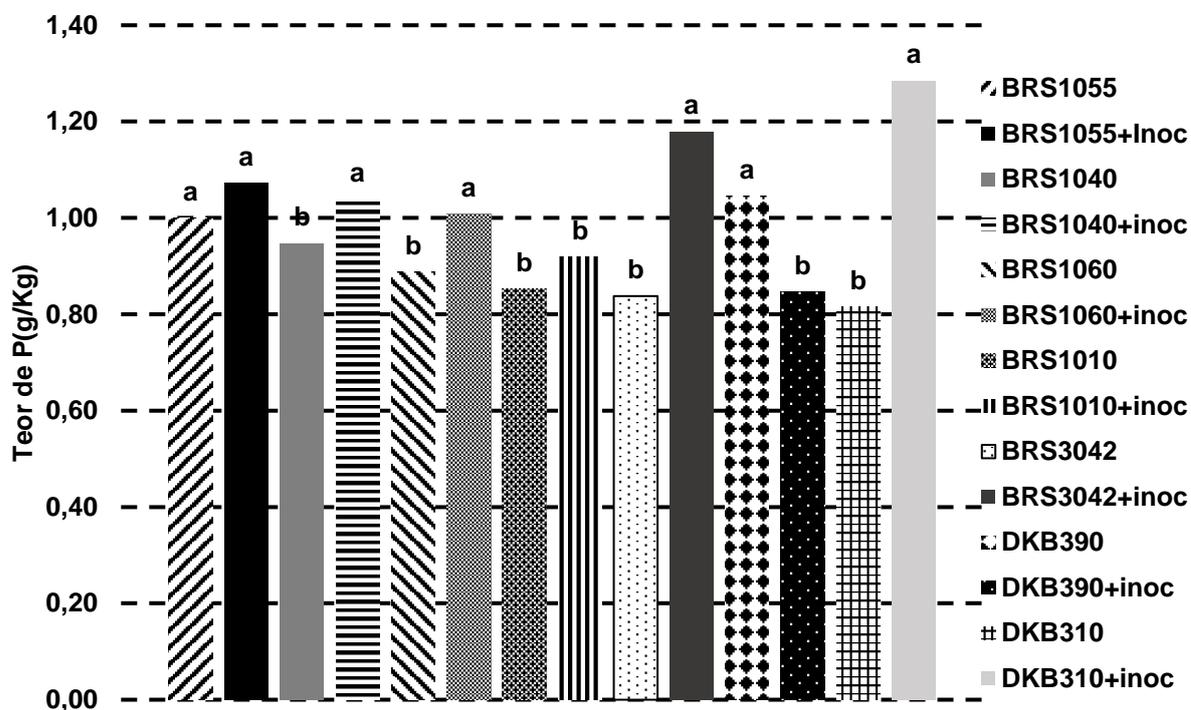


Figura 20- Teor de P entre tratamentos - híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

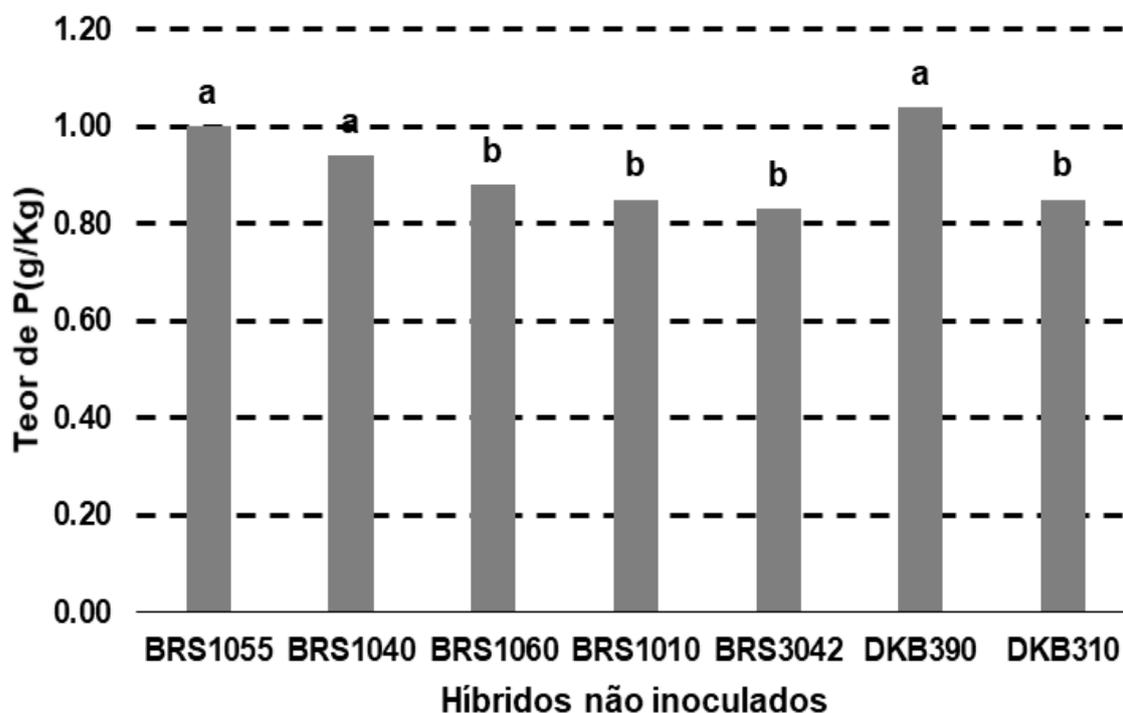


Figura 21- Teor de P em híbridos de milho não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

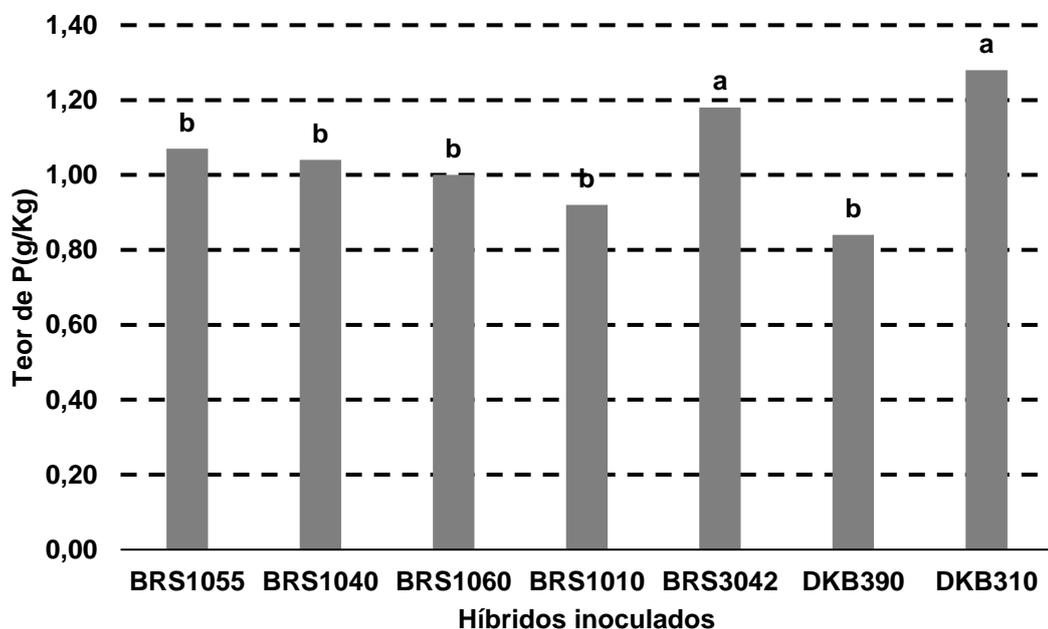


Figura 22- Teor de P em híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

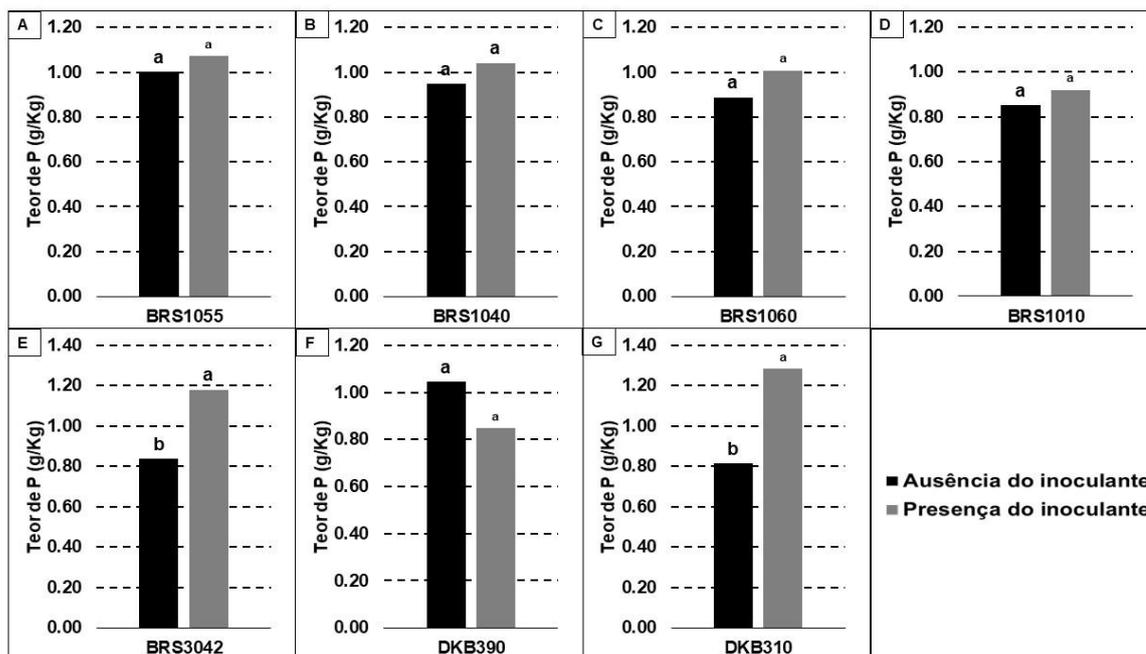


Figura 23- Teor de P para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

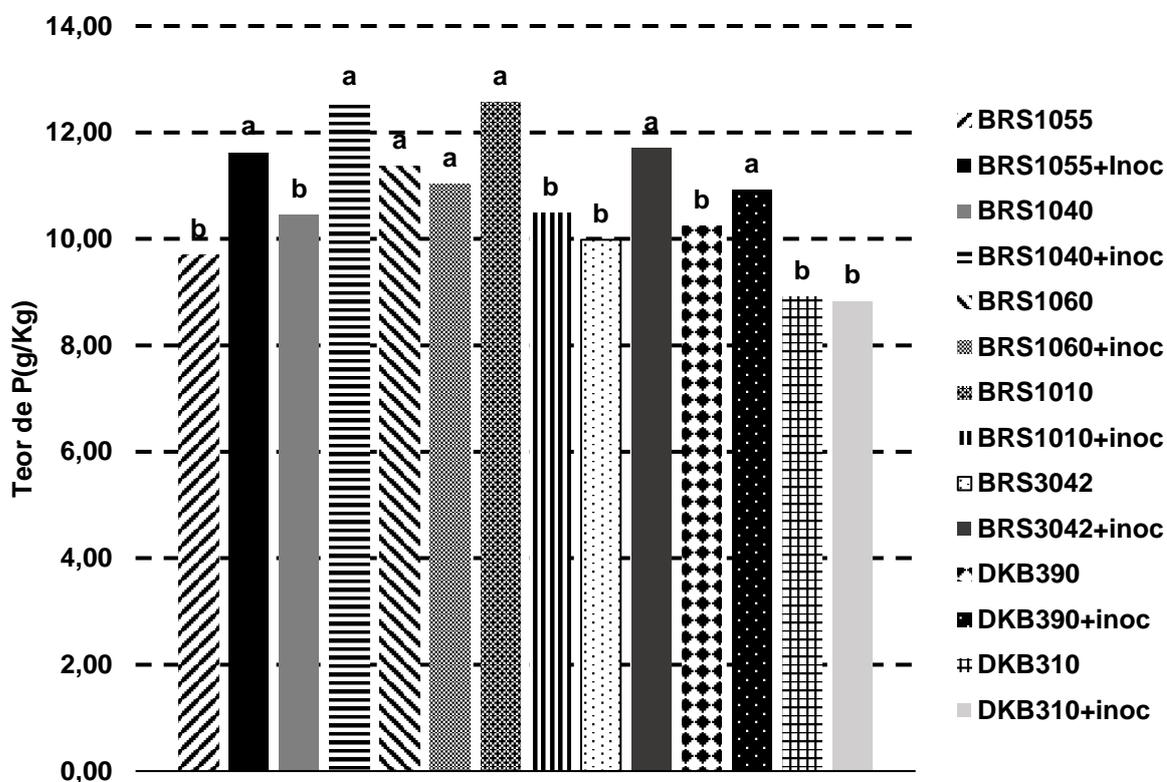


Figura 24- Teor de K entre tratamentos - híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

Os resultados da análise de variância para as variáveis Massa seca, Nitrogênio total e P total podem ser vistos na Tabela 4. De acordo com o resumo da análise, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) a fonte de variação tratamentos (Massa seca, N-total e P-Total), híbridos com inoculação (Massa seca, N-total e P-Total), e para cada híbrido comparado na presença e ausência do inoculante para o BRS3042 (Massa seca, N-total e P-Total) e DKB310 (P-total). A média de Massa seca nos tecidos vegetais foi de $8,8 \text{ Kg.ha}^{-1}$ entre os tratamentos e apresentou aumento para BRS3042+ Inoc com média de $(12,52 \text{ Kg.ha}^{-1})$ (Figura 25). Para a fonte de variação híbridos inoculados (Figura 26) é possível ver que o BRS3042 ($12,52 \text{ Kg.ha}^{-1}$) diferiu dos demais. Já para a comparação da massa seca entre híbrido inoculados e sem inoculação (Figura 27), o híbrido BRS3042 (Figura 27-E) apresentou melhor desempenho na presença do inoculante.

O N-Total, obteve média nos tecidos de $9,66 \text{ Kg.ha}^{-1}$ e apresentou aumento no BRS3042+Inoc com média de $12,52 \text{ Kg.ha}^{-1}$ (Figura 28). Para a fonte de variação híbridos inoculados (Figura 29) maior valor de N-total foi observado no híbrido BRS3042 com média de $15,38 \text{ Kg.ha}^{-1}$. Quando comparado N-total em cada híbrido na presença e ausência do inoculante (Figura 30), pode-se verificar que os híbridos BRS3042 (Figura 30-E) apresenta uma melhor resposta na presença do inoculante

A característica de P total apresentou média nos tecidos vegetais de $8,69 \text{ kg.ha}^{-1}$ e a diferença para a fonte de variação tratamentos mostrou o agrupamento de três grupos, onde o BRS3042+Inoc sozinho destacou-se com demais com $14,74 \text{ Kg.ha}^{-1}$ acúmulo de P nos tecidos vegetais, seguido do DKB310+Inoc ($12,02 \text{ Kg.ha}^{-1}$) e os demais em um terceiro grupo que apresentou valores que variaram entre $6,09 \text{ Kg.ha}^{-1}$ a $9,76 \text{ Kg.ha}^{-1}$ de P-Total nos tecidos vegetais (Figura 31). Para a fonte de variação híbridos inoculados (Figura 32), verifica-se também a formação de três grupos com destaque para BRS3042 com $14,74 \text{ Kg.ha}^{-1}$ acúmulo de P nos tecidos vegetais, seguido do DKB310 $12,02 \text{ Kg.ha}^{-1}$ e os demais híbridos variando entre $7,01$ e $9,76 \text{ Kg.ha}^{-1}$. Quando comparado na presença e ausência do inoculante (Figura 33) os híbridos BRS3042 e DKB310 (Figura 33 E e G) apresentaram ganhos significativos na presença do inoculante com $14,74$ e $12,02 \text{ Kg.ha}^{-1}$ de P-Total respectivamente.

Tabela 4- Resumo das análises de variância para as características, Massa Seca (MASP- Kg.ha⁻¹), N-Total (Kg.ha⁻¹) e P-Total (Kg.ha⁻¹) avaliados em híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*.

FV	GL	Quadrado Médio		
		MASP (Kg.ha ⁻¹)	N-Total (Kg.ha ⁻¹)	P-Total (Kg.ha ⁻¹)
BLOCO	3	0,56	6,17	5,35
TRATAMENTOS	13	7,37**	15,38**	20,57**
HIBRIDO SEM INOC	6	5,12ns	5,36ns	4,64ns
HIBRIDO COM INOC	6	9,60**	21,76**	30,55**
BRS1055 X BRS1055+INOC	1	0,57ns	8,76ns	3,29ns
BRS1040 X BRS1040+INOC	1	0,07ns	0ns	0,33ns
BRS1060 X BRS1060+INOC	1	1,92ns	2,87ns	6,25ns
BRS1010 X BRS1010+INOC	1	2,78ns	1,60ns	0,47ns
BRS3042 X BRS3042+INOC	1	52,63**	164,45**	149,523**
DKB390 X DKB390+INOC	1	0,45ns	0,36ns	3,52ns
DKB310 X DKB310+INOC	1	0,77ns	0,03ns	28,02**
ERRO	39	1,91	3,18	3,37
CV		15,69	18,45	21,12
MEDIA		8,8	9,66	8,69

ns, **, não significativo, significativo a 1 e 5% respectivamente.

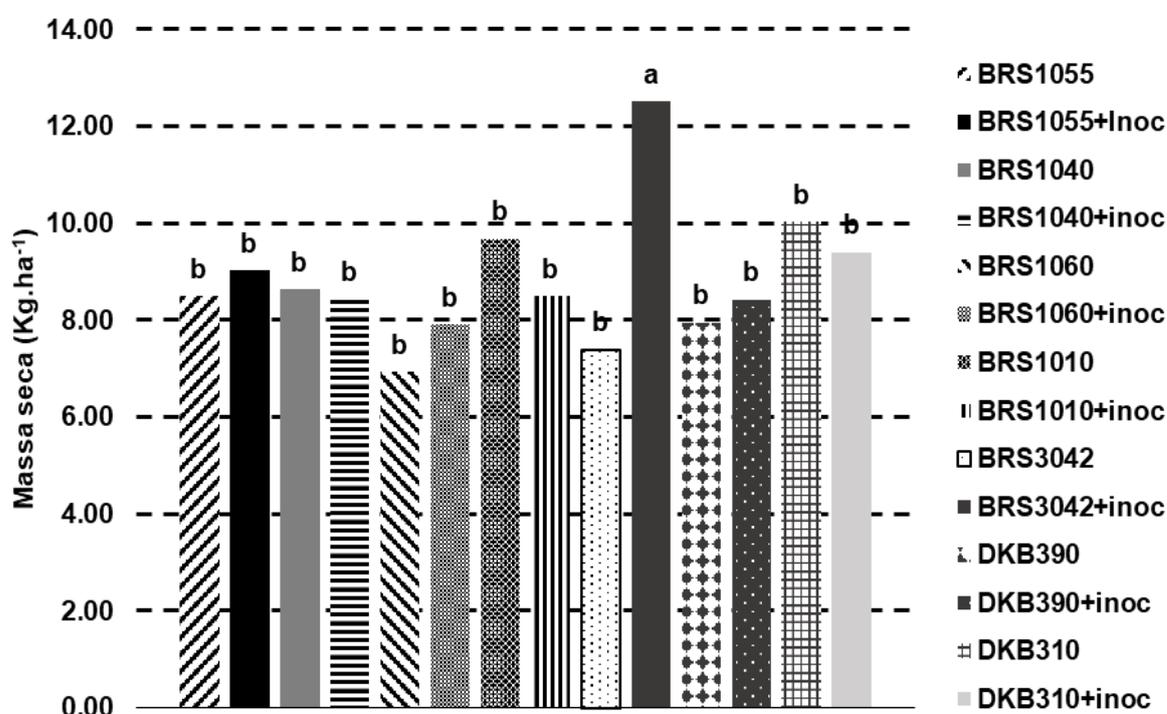


Figura 25- Massa seca (MASP) entre tratamentos - híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

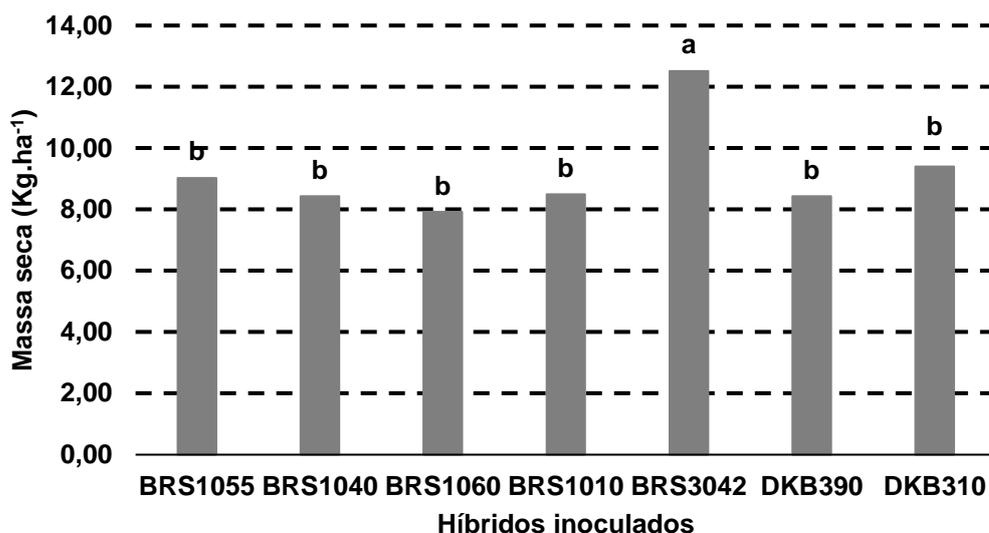


Figura 26- Massa seca (MASP) em híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

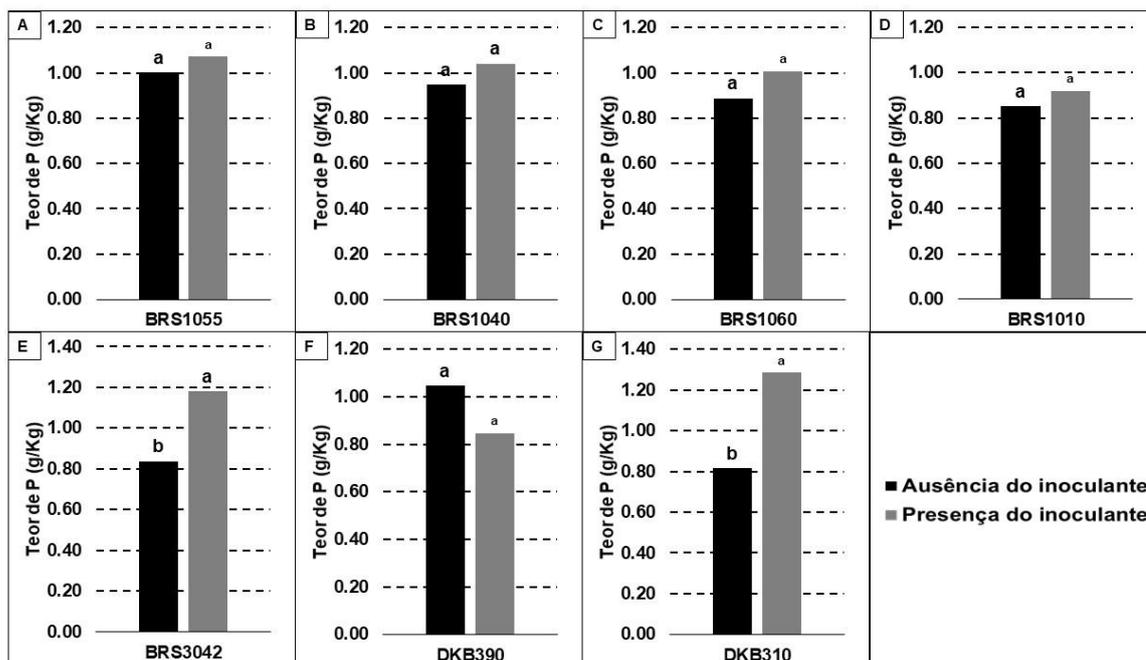


Figura 27- Massa seca (MASP) para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5%.

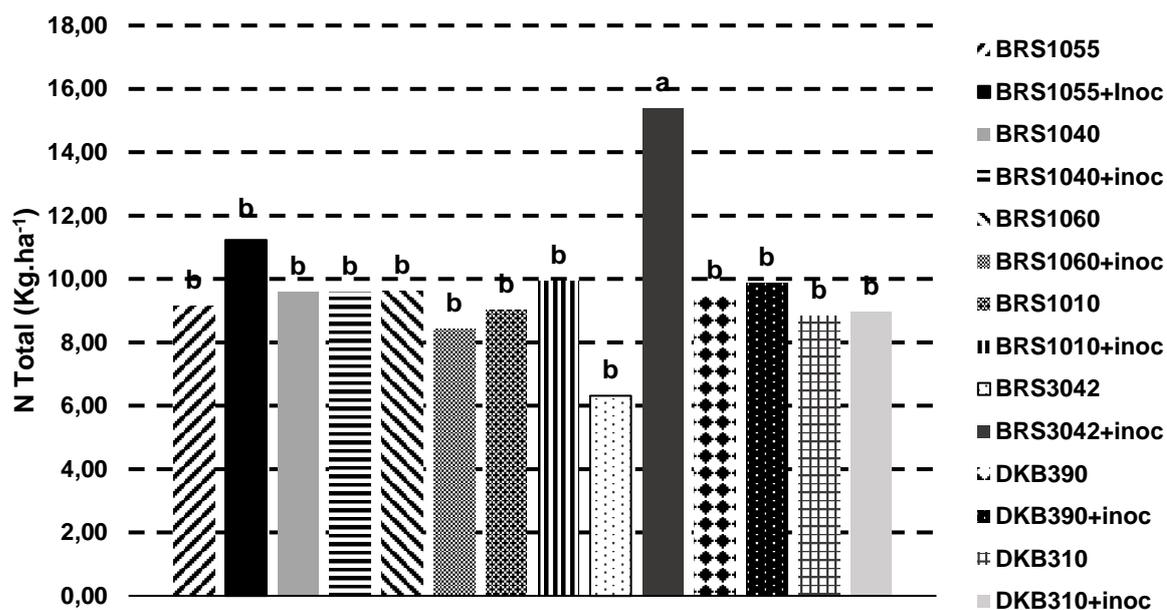


Figura 28- N-total entre tratamentos - híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

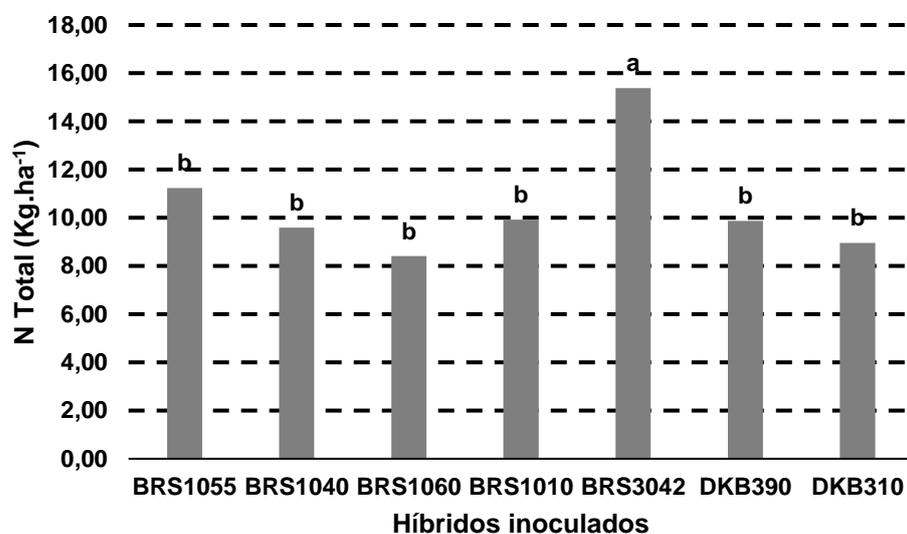


Figura 29- N-total em híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

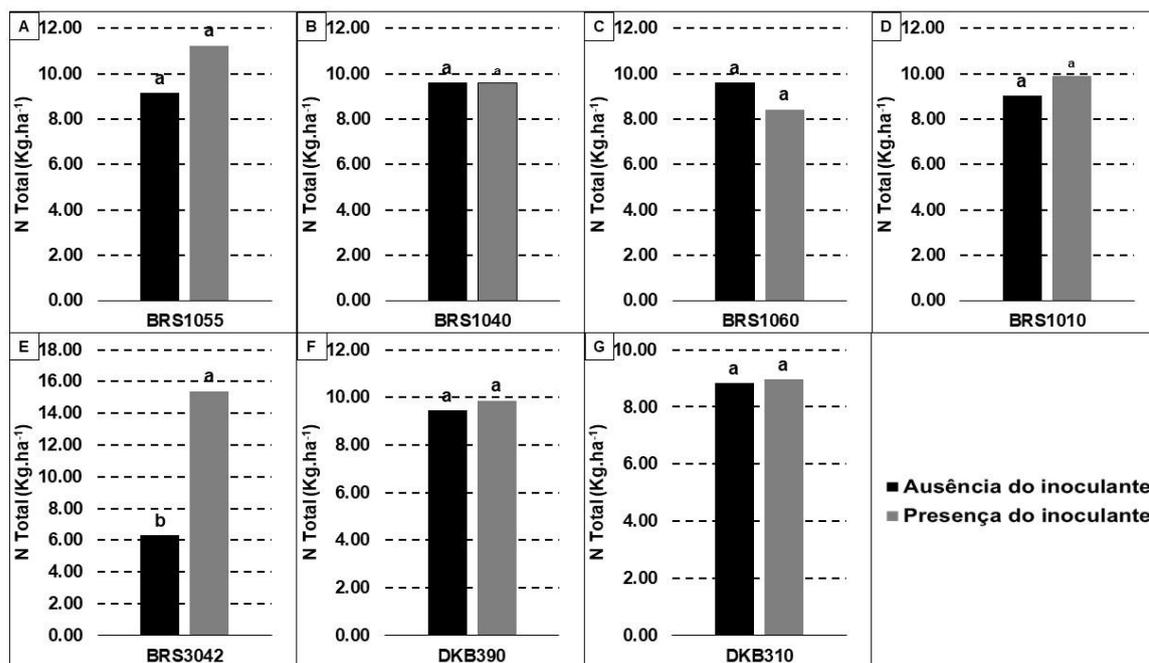


Figura 30- N-total para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

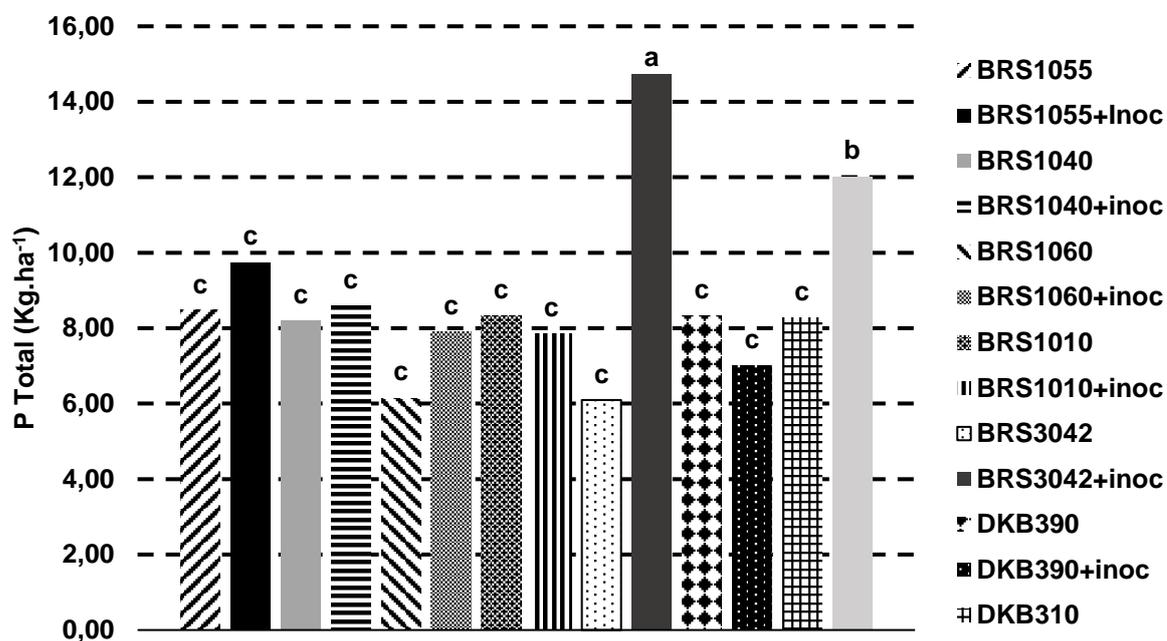


Figura 31- P-total entre tratamentos - híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

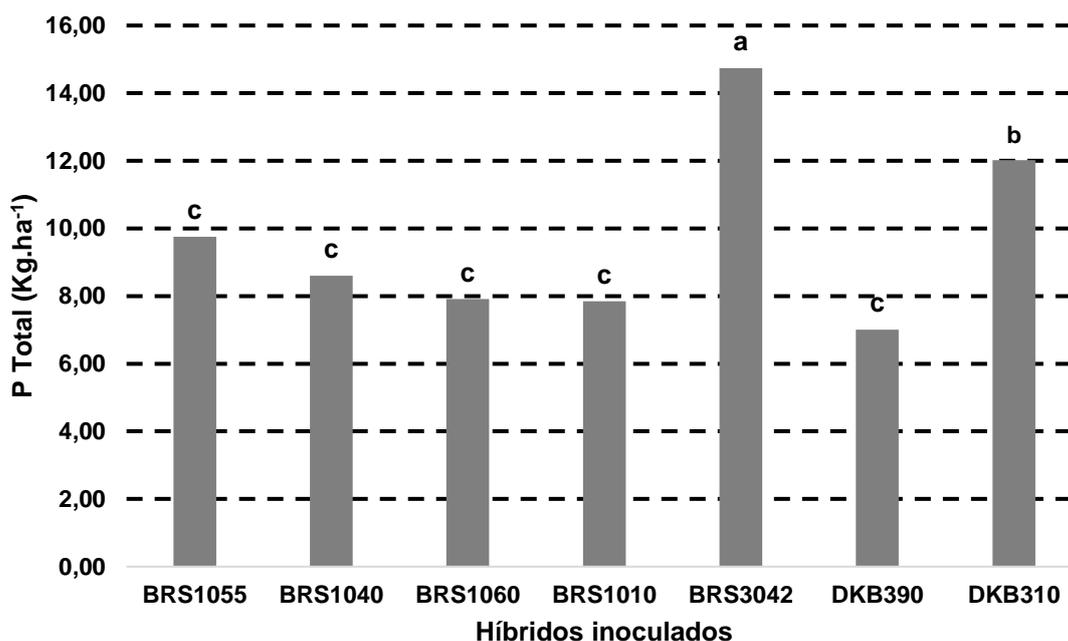


Figura 32- P-total em híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

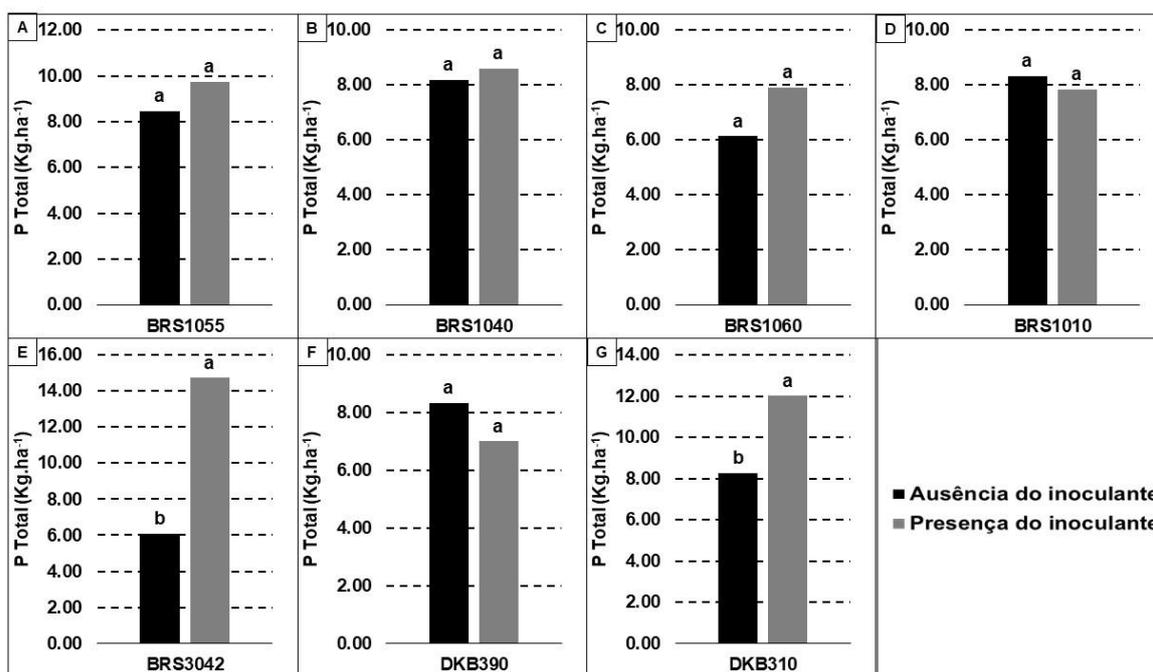


Figura 33- P-total para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5%.

Os resultados da análise de variância para as variáveis Potássio total e Produtividade de grãos podem ser vistos na Tabela 5. De acordo com o resumo da

análise, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para a fonte de variação tratamentos (P-Total e PG), híbridos sem inoculação (PG), híbridos com inoculação (P-Total) e para cada híbrido comparado na presença e ausência do inoculante para o BRS1055 (PG), BRS1010 (P-total) e BRS3042 (P-total e PG). A média de K-total foi de $9,48 \text{ Kg.ha}^{-1}$ e foi possível verificar que entre os tratamentos ocorreu a formação de três grupos (Figura 34), onde o BRS3042+Inoc destacou-se dos demais com $14,67 \text{ Kg.ha}^{-1}$ acúmulo de K nos tecidos vegetais, seguido por BRS1055+Inoc e BRS1040+Inoc e BRS1010 sem inoculante com $10,58$, $10,76$ e $12,19 \text{ Kg.ha}^{-1}$ de K-total. Os demais que formam o terceiro grupo variaram de $7,36$ a $9,07 \text{ Kg.ha}^{-1}$. Já para a fonte de variação híbridos com inoculante (Figura 35), o BRS3042 diferiu dos demais com $14,64 \text{ Kg.ha}^{-1}$ de acúmulo de K nos tecidos vegetais. A comparação de P-total para o híbrido na presença e ausência do inoculante (Figura 36) o híbrido BRS3042 apresentou melhor desempenho na presença do inoculante com $14,64 \text{ Kg.ha}^{-1}$ (Figura 36-E), o mesmo não foi observado no BRS1010 (Figura 36-D), que teve maior ganhos na ausência do inoculante com valores de $12,19 \text{ Kg.ha}^{-1}$.

Em relação a Produtividade de grãos a média dos tratamentos foi de $4,54 \text{ Kg.ha}^{-1}$ e foi possível verificar a separação de dois grupos (Figura 37), onde o grupo com maior produtividade ficaram os tratamentos BRS1055+Inoc, BRS1060+Inoc, BRS1010 e BRS1010+Inoc, BRS3042+Inoc, DKB390, DKB30+Inoc, DKB310 e DKB310+Inoc com $4,81$, $4,76$, $4,66$, $4,63$, $5,45$, $5,81$, $5,33$, $4,60$ e $5,22 \text{ Kg.ha}^{-1}$ de produtividade de grãos respectivamente. O outro grupo apresentou média com valores entre $2,64$ e $3,89 \text{ Kg.ha}^{-1}$. Para a fonte de variação híbridos não inoculados (Figura 38), observou-se quatro grupos com produtividade diferentes, com destaque para o DKB390 com $5,81 \text{ Kg.ha}^{-1}$, seguido dos tratamentos BRS1010 e DKB310 com $4,66$ e $4,60 \text{ Kg.ha}^{-1}$ respectivamente, em seguida os híbridos BRS1040, BRS1060 e BRS3042 com $3,66$, $3,86$ e $3,74 \text{ Kg.ha}^{-1}$ respectivamente. E por último o BRS1055 com $2,64 \text{ Kg.ha}^{-1}$. A comparação da produtividade na presença e ausência do inoculante (Figura 38) os Híbridos BRS1055 (Figura 38-A) e BRS3042 (Figura 39-E) apresentaram ganhos de produtividade na presença do inoculante.

A produtividade relativa de grãos (Figura 40) o híbrido BRS1055 respondeu a inoculação com ganho de 82% , seguido do híbrido BRS3042 com ganho de 46% e por último o BRS1060 com ganho de 23% .

Tabela 5- Resumo das análises de variância para as características K-Total (Kg.ha^{-1}) e P-total (Kg.ha^{-1}) e Produtividade (Kg.ha^{-1}) avaliados em híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*.

FV	GL	Quadrado Médio	
		K Total (Kg.ha^{-1})	Produtividade (Kg.ha^{-1})
BLOCO	3	5,64	0,407
TRATATEMENTOS	13	1,54**	2,94**
HIBRIDO SEM INOC	6	1,00ns	3,99**
HIBRIDO COM INOC	6	1,97*	1,12ns
BRS1055 X BRS1055+INOC	1	1,10ns	9,43**
BRS1040 X BRS1040+INOC	1	5,99ns	0,10ns
BRS1060 X BRS1060+INOC	1	1,08ns	1,61ns
BRS1010 X BRS1010+INOC	1	2,15*	0,001ns
BRS3042 X BRS3042+INOC	1	1,07**	5,84**
DKB390 X DKB390+INOC	1	1,16ns	0,46ns
DKB310 X DKB310+INOC	1	0,95ns	0,76ns
ERRO	39	5,12	0,67
CV		23,86	18,3
MEDIA		9,48	4,54

ns,*,**, não significativo, significativo a 1 e 5% respectivamente.

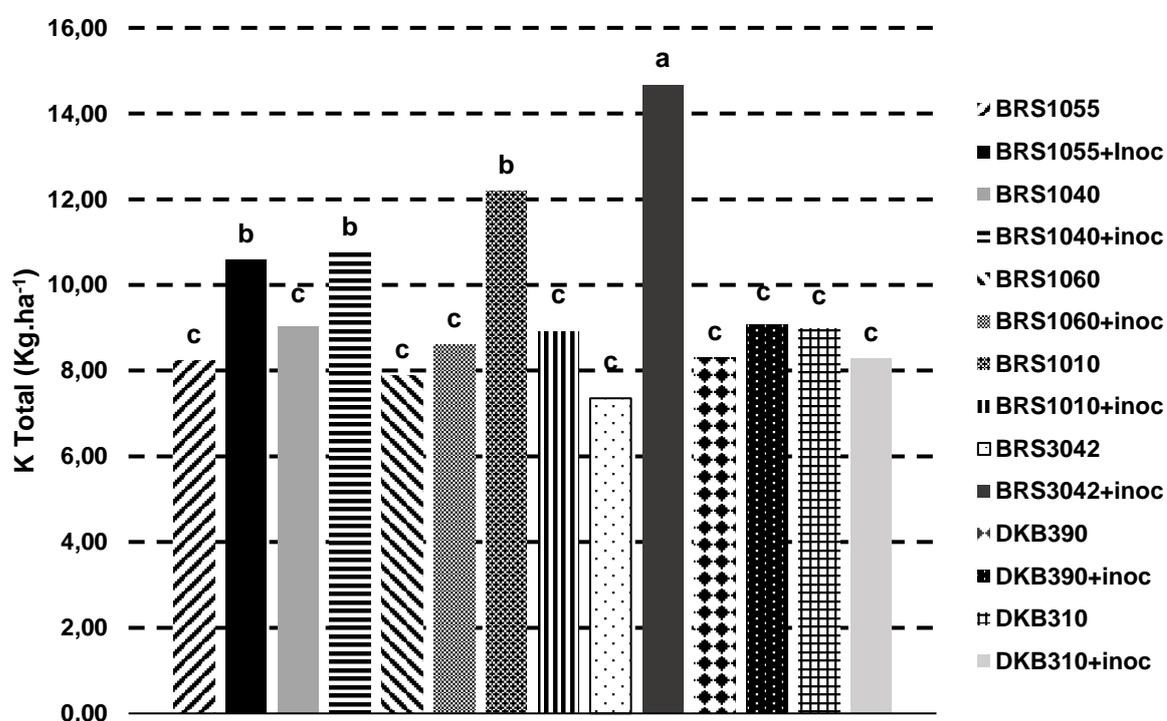


Figura 34- K-total entre tratamentos - híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

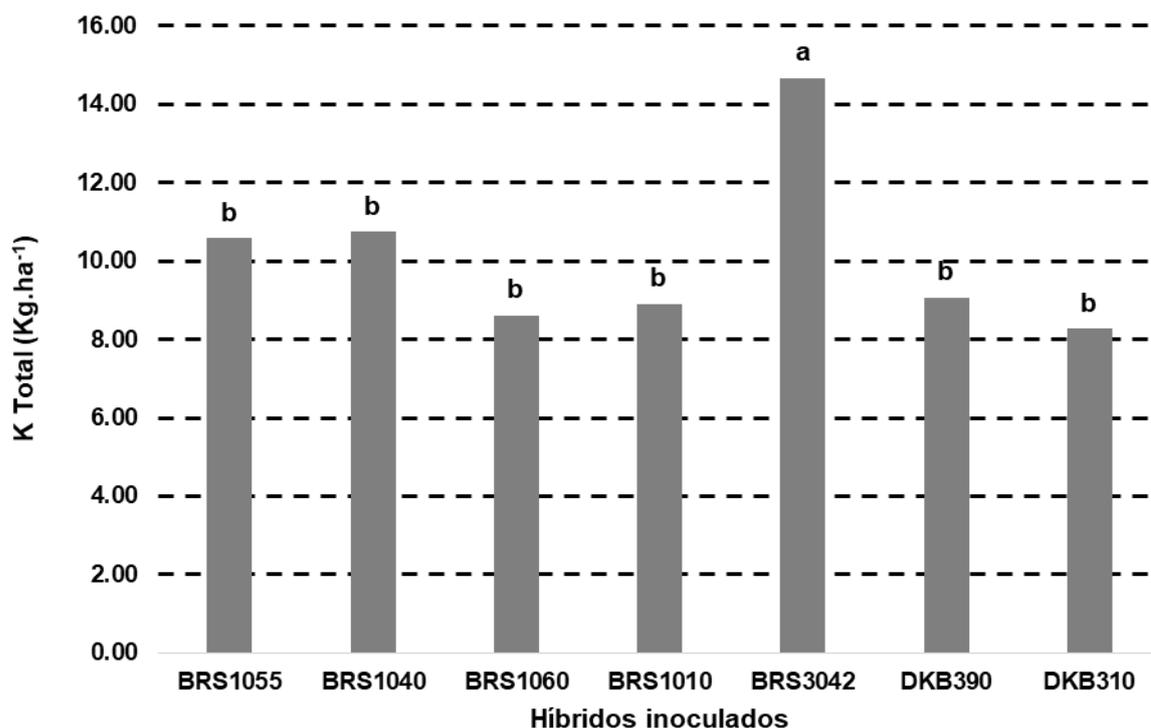


Figura 35- K-total em híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

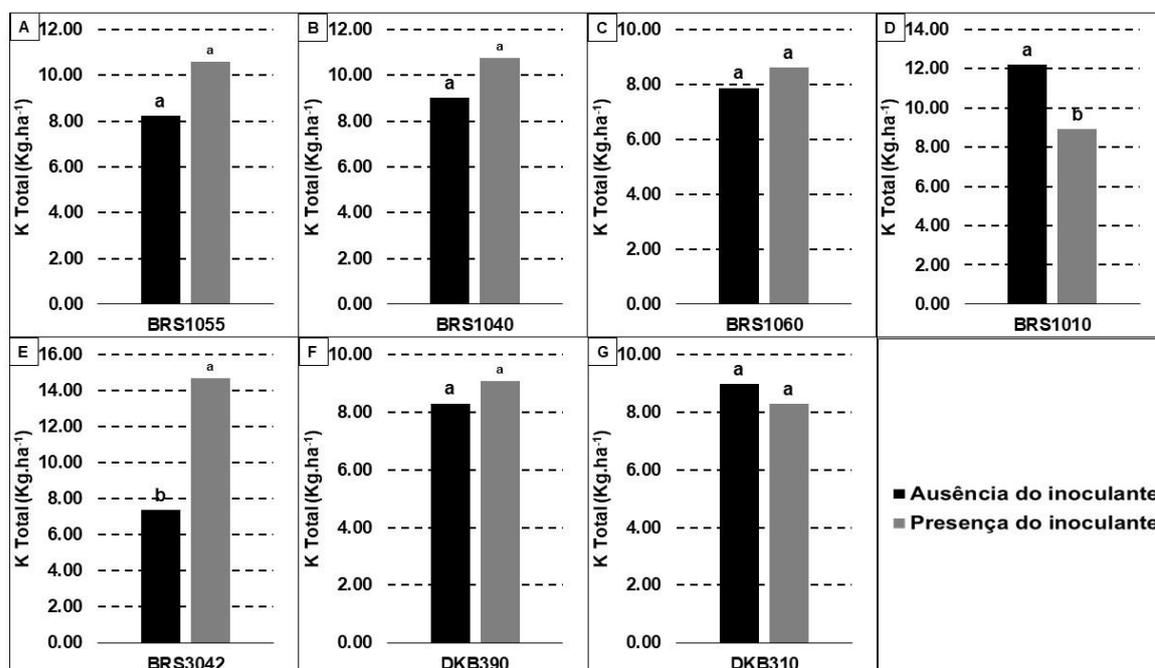


Figura 36- K-total para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5%.

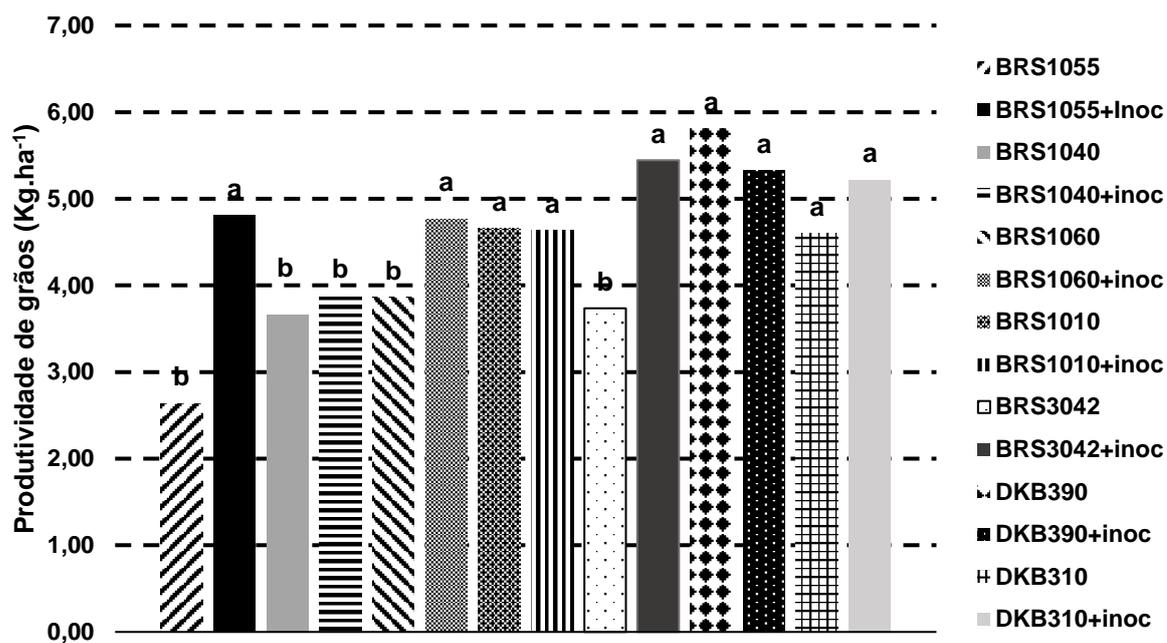


Figura 37- Produtividade de grãos entre tratamentos - híbridos de milho inoculados e não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

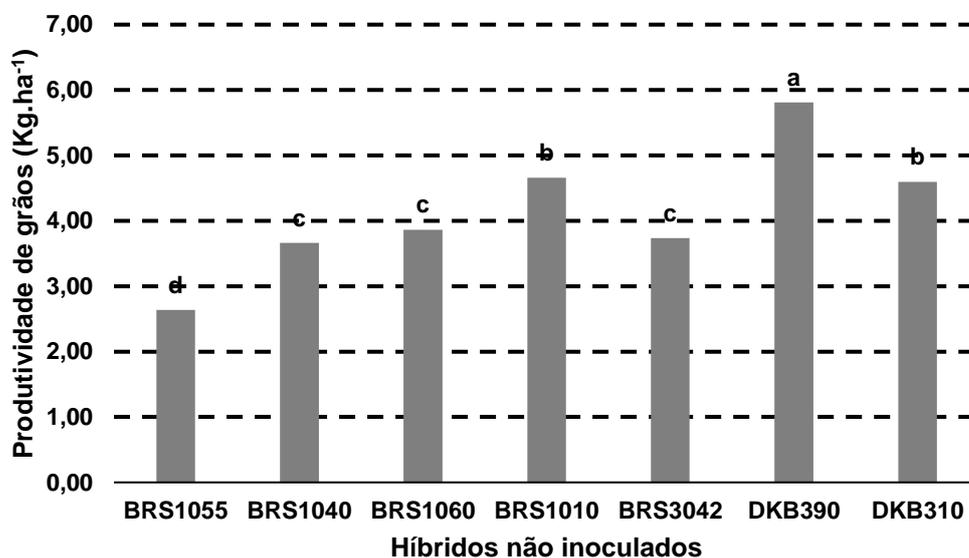


Figura 38- Produtividade de grãos em híbridos de milho não inoculados com *Azospirillum brasilense*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5% pelo teste de Scott Knott.

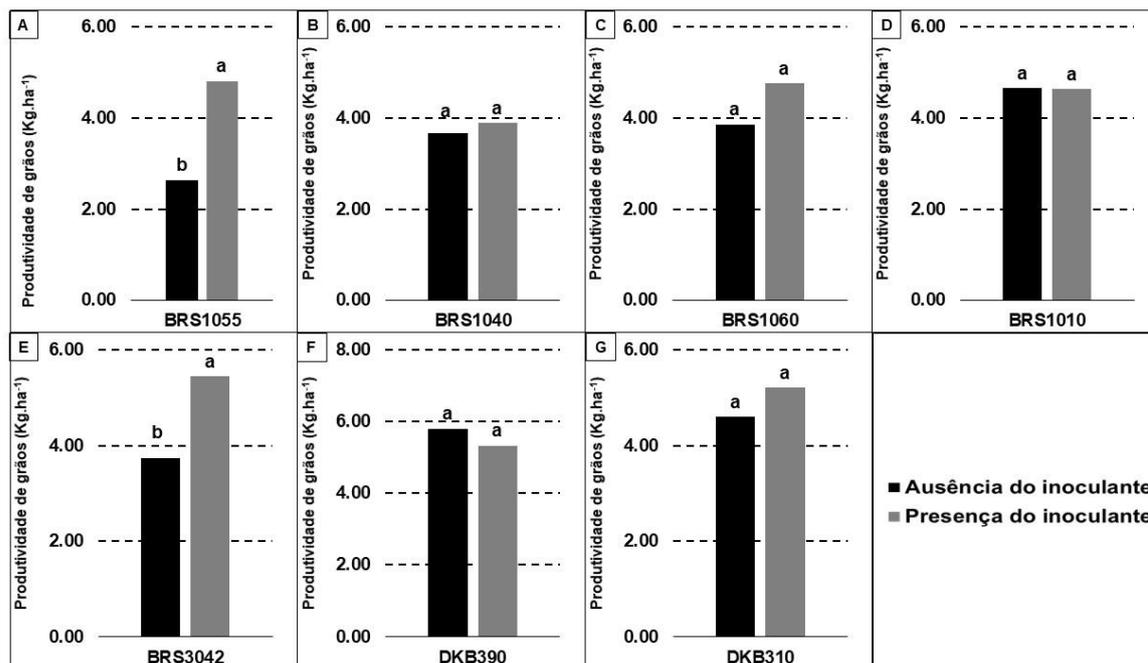


Figura 39- Produtividade de grãos para cada híbrido de milho na presença e ausência da inoculação com *Azospirillum* . Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si a 5%.

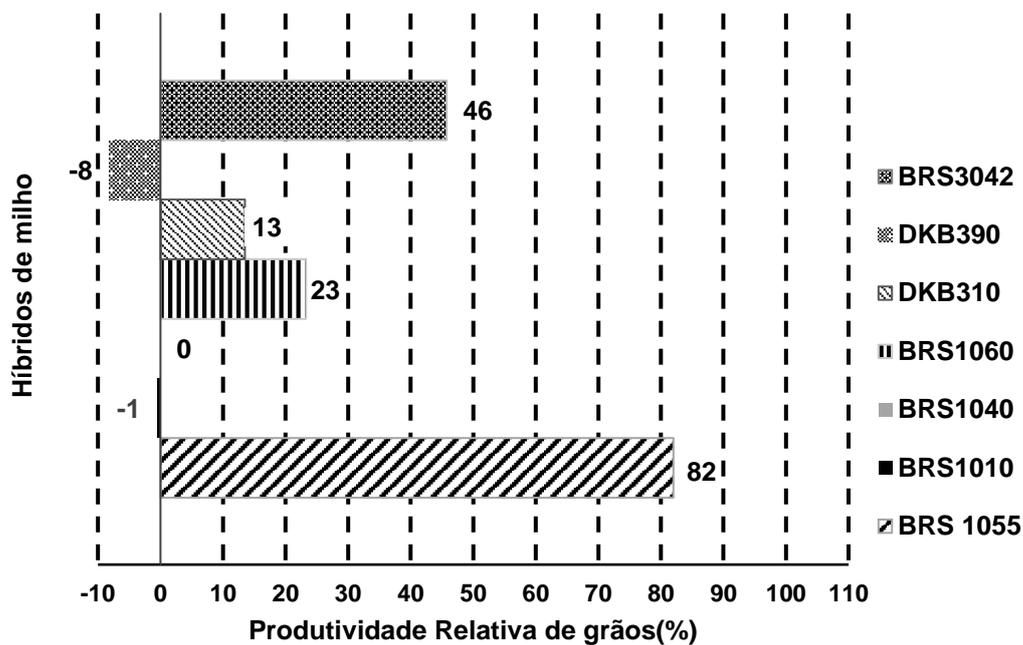


Figura 40- Produtividade relativa de grãos em relação a tratamentos inoculados e não inoculados.

4.5. DISCUSSÃO

A busca por tecnologias sustentáveis que sejam eficientes para suprir a demanda agrícola e manter padrões de produções é crescente. Assim é importante o uso de biotecnologias que apresentem benefícios ao desenvolvimento e crescimento da planta, como é o caso de inoculante a base de *A. brasilense*. A utilização de microrganismos fixadores de nitrogênio e solubilizadores de nutrientes do solo pode viabilizar a diminuição significativa na aplicação de fertilizantes industriais (Good & Beatty 2011).

Nesse trabalho, observou-se alterações pela inoculação de diferentes parâmetros avaliados, onde nem todas apresentaram diferenças significativas. Para as características de AP e AE, os resultados assemelham-se aos encontrados por Cordeiro (2017), onde não ocorreu influência da inoculação para ambas as características em milho inoculado com bactérias promotoras de crescimento. O que também foi constatado em relação a inoculação com *Azospirillum* e a associação de adubação nitrogenada (Lana *et al.* 2012). Entretanto, vários trabalhos demonstram que a inoculação de *Azospirillum* promove alteração na morfologia das raízes das plantas, devido a produção de fitormônios, fazendo com que ocorra aumento da superfície radicular, resultando em uma maior absorção de água e nutrientes , principal fator de crescimento de plantas (Spolaor *et al.* 2016).

Os resultados de índice de SPAD apresentou diferenças apenas entre os híbridos inoculados. Diferenças nessa característica já foi relatado por Araújo (2014) que encontrou aumentos nessa característica em função da inoculação com *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em plantas de milho. O SPAD mede a concentração de cor verde presente nas plantas que está diretamente relacionado ao pigmento da clorofila. O teor de clorofila pode sofrer influência de diversos fatores bióticos e abióticos, encontrando-se diretamente relacionado com a capacidade de atividade fotossintética das plantas (Taiz & Zeiger 2013).

Os teores de N, P e K aqui encontrados apresentaram diferenças entre os tratamentos analisados, com respostas de aumentos em alguns tratamentos em função do *Azospirillum* e também entre híbridos não inoculados para N e P. Aumento nos teores de N, P e K foi verificado na presença de inoculante e também doses de

N (Araújo 2014). Em estudo realizado por Quadros *et al.*, (2014), também foi constatado aumento do teor de N em plantas de milho em função do inoculante.

Os resultados de massa seca apresentaram diferenças significativas, em função do inoculante. Resultados semelhantes foram encontrados por Fonseca (2014) e Rosa (2017). Essa característica já foi relatada com ganhos de 24,7% na combinação de inoculação e adubação nitrogenadas (Hungria *et al.* 2016). O aumento da massa seca da parte aérea é um dos benefícios que podem ocorrer na cultura uma vez que, quando há uma maior produção de biomassa espera-se uma maior produtividade (Quadros, 2009).

O acúmulo de nutrientes analisados neste trabalho N, P e K que apresentaram diferenças entre algumas fontes de variação em função do inoculante a base de *Azospirillum* em plantas de milho, já foram relatados em estudo realizado por Rosa (2017) e para N e K por Fonseca em milho (2014). A absorção de nutrientes N, P e K em grandes proporções pode ocorrer devido a produção de substâncias promotoras de crescimento pela bactéria (Baldani & Baldani 2005), como giberelinas, auxinas e a citocininas esta última no caso, faz a movimentação de N e K da raiz para as folhas (Guerreiro 2008).

Todos esses componentes agrônômicos de massa seca e teores de nutrientes nos tecidos vegetais, são influenciados por *Azospirillum*, indicando que o uso dessa biotecnologia tem potencial para aumento no rendimento de grãos (Biari *et al.* 2008). Este fato se confirma neste trabalho, uma vez que em alguns genótipos foram observados ganhos de produtividade sob influência do uso de inoculantes, de maneira que PRG, teve seu valor mais elevado com 82%. Esse valor elevado pode estar relacionado à escolha da estirpe utilizada que é fundamental para o êxito da inoculação com *Azospirillum* (Hungria *et al.* 2010). Sendo que os ganhos de produção relacionados não apenas a fixação biológica de nitrogênio, mas também a fitormônios (Biari *et al.* 2008)

Efeitos positivos sobre a produtividade de grãos promovidas pela inoculação com *A. brasilense*, já foram descritos por diferentes autores (Hungria *et al.* 2010; Lana *et al.* 2012). Em estudo realizado com milho e diferentes estirpes de bactérias Hungria *et al.* (2010) encontraram aumentos de até 30%, quando comparado com o tratamento controle. Lana *et al.*, (2012) encontrou aumentos de 7 a 14% e 29% em estudos na região do cerrado.

O fertilizante industrial não deve ser totalmente substituído pelo inoculante em gramíneas, devido ao fato da fixação biológica de nitrogênio pelos microrganismos contribuir apenas com pequenas porções (Fukami *et al.* 2016). O arranjo de todas as funções do *Azospirillum* para a promoção do crescimento vegetal pode ter como resultado plantas com maior capacidade de absorção de nutrientes e água do solo, melhorando a nutrição e o crescimento (Bashan & De-Bashan 2010; Hungria *et al.* 2015; Kouchebagh *et al.* 2012). Outro fator importante é que o uso de inoculantes a base de *Azospirillum brasilense* pode gerar uma economia, em torno, de U\$\$ 2 bilhões em fertilizantes industriais, possibilitando reduzir despesas de transporte e poluição pela produção e aplicação de fertilizantes minerais (Hungria *et al.* 2010).

Apesar dos estudos que vêm sendo realizados acerca da relação do *Azospirillum* com a cultura do milho, ainda é necessário que mais estudos sejam realizados para elucidação desta complexa interação entre a bactéria e a planta, principalmente quanto a variação da resposta em relação ao genótipo de milho. Este tipo de estudo pode contribuir para a escolha de culturas em função desta resposta a inoculação para obtenção de ganhos de produtividade e redução da fertilização nitrogenada com ganhos ambientais.

4.6. CONCLUSÃO

A inoculação proporcionou aumentos de produtividade de grãos em milho, dependendo do híbrido utilizado.

Os benefícios da inoculação não se limitam ao suprimento de nitrogênio e inclui a aquisição de P e K.

O híbrido BRS1055 com inoculação foi o que apresentou a melhor resposta à inoculação, dentro dos materiais testados.

4.7. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E.O. (2014). Quantificação da contribuição de bactérias diazotróficas na absorção de nitrogênio pela cultura do milho. 160f. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados-MS.
- ARAÚJO, L.S. (2017). Aplicação de *Azospirillum brasilense* associado a reguladores de crescimento e micronutrientes na cultura do milho. 49f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agronomia). Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia-MG.
- BALDANI, J.I. & V.L.D. BALDANI (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* 77: 549–579.
- BASHAN, Y. & L.E. DE-BASHAN (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. In: Elsevier (Ed), *Advances in Agronomy*, p. 77–136.
- BIARI, A.; GHOLAMI, A.; RAHMANI, H. A. (2008). Growth promotion and enhanced nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria in Arid region of Iran. *Journal of Biological Sciences* 8: 1015–1020.
- CONAB: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (2018): Acompanhamento da safra brasileira. : 1–142. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/gaos/boletim-da-safra-de-gaos>> Acesso em Dez de 2018
- CORDEIRO, J.E.B. (2017). Desempenho agrônômico do milho em resposta à inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.
- DIAS, V.C.; PELUZIO, J.M.; LIMA, M.D. (2018). Effects of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen dose on oil content of corn grains. *Brazilian*

Journal of Agriculture 93: 299–312.

FERREIRA, D.F. (2011). SISVAR: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)* 35: 1036–1042.

FONSECA, L.M.F. da (2014). Inoculação com estirpes de *Azospirillum* e adubação nitrogenada no acúmulo de nutrientes e produtividade de milho. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) Universidade Federal de São João del Rei. Sete Lagoas-MG.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO R.S.; HUNGRIA, M. (2016). Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express* 6: 1–13.

GOOD, A.G. & BEATTY, P.H. (2011). Fertilizing nature: A tragedy of excess in the commons. *Plos Biology* 9: 1–9.

GUERREIRO, R.T. (2008). Selecao de *Bacillus* spp Promotores de Crescimento de Milho. 59f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) Universidade do Oeste Paulista. Presidente Prudente-SP.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO R.S. (2016). Inoculation of *Brachiaria* spp . with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: aenvironment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 221: 125–131.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F.O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil* 331: 413–425.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO R.S. (2015). Soybean seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: a new biotechnological tool to improve yield and sustainability. *American Journal of Plant Sciences* 06: 811–817.

- KOUCHEBAGH, S.B.; MIRSHEKARI, B.; FARAHVASH, F. (2012). Improvement of corn yield by seed biofertilization and urea application. *World Applied Sciences Journal* 16: 1239–1242.
- LANA, M. do C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J.E. (2012). Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. *Revista Ceres* 59: 399–405.
- SANTOS, D.S.; MONTEIRO, S.S.; PEREIRA, E.M.; MARINI, F.S.; VASCONCELLOS, A.; LIMA, J.F. (2018). Composição centesimal de milho Crioulo coletado em localidades do estado da Paraíba. *Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 13: 308–312
- MORAIS, M.; AMARAL, H.F.; NUNES, M.P.(2018). Desenvolvimento e assimilação de nutrientes da cultura de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* e diferentes doses de nitrogênio e potássio. *Revista Terra & Cultura: Cadernos de Ensino e Pesquisa* 134: 160–176.
- NUNES, F.S.; RAIMONDI, A.C.; NIEDWIESKI, A.C. (2003). Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Quimica Nova* 26: 872–879.
- OLIVEIRA, C.A.; MARRIEL, I.E.; GOMES, E.A.; MATTOS, B.B.; SANTOS, F. C.; OLIVEIRA, M.C.; ALVES, V.M.C. (2013). Metodologia de aplicação de microrganismos solubilizadores de fósforo em sementes visando melhor aproveitamento deste nutriente pelas plantas. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 88. *Comunicado técnico* 88: 1–29.
- PINTO, A.A.; SANTANA, L.D.; DAMACENO, Y.R.P.; SANTOS, S.L.L. DOS & CAMARA, F.T. DA (2017). Produção de espigas verdes por diferentes cultivares comerciais de milho em função da adubação NPK de semeadura. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo* 16: 414–425.
- QUADROS, P.D. de (2009). Inoculação de *Azospirillum* spp. em sementes de

genótipos de milho cultivados no rio grande do sul. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS.

QUADROS, P.D. de, L.F.W. ROESCH, P.R.F. da SILVA, V.M. VIEIRA, D.D. ROEHRS & F.A. de O. CAMARGO (2014). Desempenho agrônômico a campo de híbridos de milho inoculados. *Revista Ceres* 61: 209–218.

ROSA, P.A.L. (2017). Acúmulo de matéria seca e extração de nutrientes por híbridos de milho inoculados com *Azospirillum brasilense* no cerrado.101f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista. Ilha Solteira-SP.

SANTINI, J.M.K. (2018). Consórcio do milho com capim-xaraés, inoculação de *Azospirillum brasilense*, doses nitrogênio e efeito residual na soja.136f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista. Ilha Solteira-SP.

SANTOS, F.L. dos (2018). Inoculação e coinoculação de rizobactérias promotoras de crescimento em plantas de arroz, milho e trigo. 28f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS.

SCHAEFER, P.E.; MARTIN, T.N.; PIZZANI, R. & SCHAEFER, E.L. (2018). Inoculation with *Azospirillum brasilense* on corn yield and yield components in an integrated crop-livestock system. *Acta Scientiarum. Agronomy* 41: 39481.

SPOLAOR, L.T.; GONÇALVES, L.S.A.; SANTOS, O.J.A.P.; OLIVEIRA, A.L.M.; SCAPIM, C.A.; BERTAGNA, F.A.B. & KUKI, M.C. (2016) (2016). Bactérias promotoras de crescimento associadas a adubação nitrogenada de cobertura no desempenho agrônômico de milho pipoca. *Bragantia* 75: 33–4033

TAIZ, L. & ZEIGER, E. (2013). Fisiologia Vegetal. Porto Alegre. 5ed. Porto Alegre: Artmed.

VALDERRAMA, M.; BUZETTI, S.; BENETT, C.G.S.; ANDREOTTI, M.; ARF, O. & SÁ, M.E. DE (2009). Fontes e doses de nitrogênio e fósforo em feijoeiro no sistema plantio direto. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 39: 191–196.