



GLEYCE APARECIDA DOS SANTOS MOREIRA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *AZOSPIRILLUM* spp. PARA PROMOÇÃO
DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO**

**Sete Lagoas
2024**

GLEYCE APARECIDA DOS SANTOS MOREIRA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *AZOSPIRILLUM spp.* PARA PROMOÇÃO
DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Drº. Ivanildo Evódio Marriel

Coorientador: Drº. Francisco Adriano de Souza

**Sete Lagoas
2024**

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)

M838m MOREIRA, GLEYCE APARECIDA DOS SANTOS .
SELEÇÃO DE ESTIRPES DE AZOSPIRILLUM spp. PARA
PROMOÇÃO DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE
MILHO / GLEYCE APARECIDA DOS SANTOS MOREIRA ;
orientador Ivanildo Evódio MARRIEL; coorientador
Francisco Adriano de SOUZA. -- Sete Lagoas, 2024.
77 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Ciências Agrárias) -- Universidade Federal de São
João del-Rei, 2024.

1. MILHO. 2. BIOINSUMOS. 3. SEMENTES . 4.
AZOSPIRILLUM. 5. GERMINAÇÃO. I. MARRIEL, Ivanildo
Evódio , orient. II. SOUZA, Francisco Adriano de , co
orient. III. Título.

GLEYCE APARECIDA DOS SANTOS MOREIRA

**SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *AZOSPIRILLUM* spp. PARA PROMOÇÃO
DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, da Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Sete Lagoas, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias, na área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr^o. Ivanildo Evódio Marriel
Coorientador: Dr^o. Francisco Adriano de Souza

Sete Lagoas, 19 de julho de 2024.

Banca examinadora:

Dr^a. Denise Pacheco dos Reis - (Pós-doutoranda/EMBRAPA)

Prof^a. Dr^a. Nádia Nardely Lacerda Durães Parrella - (UFSJ)

Prof. Dr^o. Ivanildo Evódio Marriel
Orientador

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todo cuidado e por me permitir alcançar o objetivo de me tornar Mestre.

Ao meu marido Jairo, e às minhas filhas, Sarah e Bianca, por todo amor, e principalmente, por serem meu apoio, meu refúgio e minha inspiração no trilhar dessa caminhada. Sem vocês eu não conseguiria! Amo vocês!

Aos meus pais, Geraldo e Deusânia, e aos meus irmãos e às minhas irmãs, por serem meu alicerce e por me mostrarem que a caminhada é longa, mas a persistência nos faz superar todas as dificuldades! Amo vocês!

Ao meu orientador, Dr^o. Ivanildo Evódio Marriel, e ao meu coorientador, Dr^o. Francisco Adriano de Souza, pela orientação e pelo auxílio, e especialmente, pelo aprendizado proporcionado ao longo da execução deste trabalho.

À Dr^a. Denise Pacheco dos Reis e à Prof^a. Dr^a. Nádia Nardely Lacerda Durães Parrella, que compuseram minha banca examinadora, por terem aceito o convite e pelas valorosas contribuições à minha pesquisa.

Ao pessoal dos Laboratórios de Ecologia Microbiana, de Microbiologia dos Solos e dos Campos Experimentais, da Embrapa Milho e Sorgo, por toda ajuda na realização das atividades práticas, no desenvolvimento dos experimentos.

Às minhas amigas Rayanne, Júlia, Luana, Kamila, Denise, Laisla, Carol, e ao amigo Ricardo. Sem vocês seria impossível!

À UFSJ (Universidade Federal de São João del-Rei), e ao PPGCA (Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias), pela oportunidade de realização do curso de Mestrado e pelo conhecimento proporcionado.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), pela concessão da bolsa, que me proporcionou imenso aperfeiçoamento profissional/intelectual.

À EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, pelo o suporte para a realização dessa pesquisa.

Por fim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta, para que esse sonho se tornasse realidade, a minha eterna Gratidão!

SUMÁRIO

RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 A cultura do milho e o uso de fertilizantes minerais	10
2.2 Plano Nacional de Fertilizantes e Política Nacional dos Bioinsumos.....	11
2.3 Microrganismos promotores de crescimento de plantas - MPCP.....	13
2.4 Bactérias do gênero <i>Azospirillum</i>	14
2.4.1 Interações benéficas entre as plantas e a <i>Azospirillum</i>	14
2.4.2 A importância do uso da <i>Azospirillum</i> na agricultura.....	16
3 MATERIAS E METÓDOS	18
3.1 Seleção das estirpes de <i>Azospirillum spp.</i>	18
3.2 Extração de DNA.....	19
3.3 Caracterização das estirpes bacterianas	20
3.4 Caracterização filogenética das estirpes com os genes 16S rRNA e rpoD	21
3.5 Produção de auxinas (AIA) pelas treze estirpes de <i>Azospirillum spp.</i>	22
3.6 Produção de biofilme pelas treze estirpes <i>Azospirillum spp.</i>	23
3.7 Teste de Germinação para avaliação da eficiência dos inoculantes, com estirpes de <i>Azospirillum spp.</i> , no desenvolvimento inicial do milho	23
3.7.1 Preparo dos inóculos bacterianos	24
3.7.2 Desinfestação e inoculação das sementes germinadas em papel Germitest.....	25
3.8 Emergência do milho BRS Caimbé (canteiro e em campo), para avaliação da eficiência dos inoculantes bacterianos de <i>Azospirillum spp.</i>	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Caracterização das cepas bacterianas	30
4.2 Produção de auxinas (AIA) por estirpes de <i>Azospirillum spp.</i>	39
4.3 Produção de biofilme por estirpes de <i>Azospirillum spp.</i>	40
4.4 Análise de variância do Teste de Germinação do milho, variedade BRS Caimbé, inoculado com <i>Azospirillum spp.</i>	41
4.4.1 Resultado de germinação dos genótipos inoculados com <i>Azospirillum spp.</i>	41

4.4.3	Análise de variância do Teste de Germinação e das variáveis verificadas no milho híbrido DKB390RR2, inoculado com <i>Azospirillum spp.</i>	51
4.4.4	Análise conjunta dos experimentos.....	55
4.5	Análise de variância do Teste de Emergência, em canteiro e em campo, com o milho variedade BRS Caimbé, em resposta à inoculação com estirpes de <i>Azospirillum spp.</i> ..	58
5	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS	66

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *AZOSPIRILLUM* spp. PARA PROMOÇÃO DO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLÂNTULAS DE MILHO

RESUMO - O mercado de bioinsumos é crescente e movimenta anualmente, mais de R\$1 bilhão no Brasil. Este cenário reflete os avanços tecnológicos na área, a eficiência dos bioprodutos e a preocupação do setor com segurança ambiental, sustentabilidade e redução de custos de produção. Atualmente, recomenda-se a inoculação de sementes com diversos grupos de microrganismos. No entanto, é necessário selecionar microrganismos eficientes para promover o crescimento vegetal. Assim, o objetivo desse trabalho foi selecionar estirpes de *Azospirillum* spp., para promoção do desenvolvimento inicial de plântulas de milho, avaliando seus efeitos sobre a taxa de germinação de sementes e o desenvolvimento das plântulas de milho. Foram conduzidos 07 experimentos, sendo 5, em câmara de germinação de sementes, e 1, em canteiro, na Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, onde foram avaliadas 13 estirpes de *Azospirillum* spp. O sétimo experimento foi realizado na área de campo, da Universidade Federal de São João del-Rei (UFSJ), Sete Lagoas, MG, testando um mix composto por duas estirpes de *Azospirillum* spp. Foi utilizado o milho variedade BRS Caimbé. As variáveis analisadas foram a germinação, o comprimento da parte aérea e da raiz e a biomassa seca. As estirpes foram genotipadas através de perfis Box-PCR, e identificadas por filogenia baseada nos genes 16S rRNA e rpoD. As bactérias também foram avaliadas quanto à produção de Ácido-Indol-Acético (AIA) e à formação de biofilme. As estirpes de *Azospirillum* spp. apresentaram eficiência sobre a taxa de germinação de sementes, em todos os experimentos. A experimentação na câmara de germinação, apontou um aumento médio de 5,31% na taxa de germinação, independente da estirpe utilizada. Além disso, foram observadas respostas significativas nas variáveis de comprimento da parte aérea e da raiz, com destaque para as estirpes CMS 2153, CMS 1630, CMS 7, CMS 2142, CMS 2131 e CMS 11. Apenas os experimentos 1, 2 e 3 foram responsivos para a variável peso seco da parte aérea, e em relação à biomassa de raiz, nenhum experimento foi significativo. No ensaio em canteiro, o efeito da inoculação sobre a emergência das plântulas, variou de 1,11 a 7,78%, em relação ao tratamento controle. Contudo, para as demais variáveis, não houve diferença estatística significativa. O experimento em área de campo não apresentou resultados significativos para as variáveis testadas, porém houve uma diferença de 6,11% na taxa de emergência, entre o material inoculado e o não inoculado. Todas as bactérias avaliadas produziram AIA, e as com maior produção foram CMS 1630, CMS 2153 e CMS 11, produzindo respectivamente, 76µg/ml, 75,73 µg/ml e 63,86 µg/ml. No que tange à avaliação de formação de biofilme, não houve detecção com o protocolo testado. A genotipagem, através do perfil Box-PCR, contribuiu para diferenciação intraespecífica das estirpes, 11 estirpes sequenciadas com o gene 16S rRNA, identificadas em 05 espécies distintas de *Azospirillum* (*A. formosense*, *A. brasilense*, *A. sp.*, *A. argentinense* e *A. baldaniorum*), já para para o gene rpoD, 75% das 12 estirpes foram apontadas como *Azospirillum argentinense*. A análise conjunta dos experimentos 1, 2, 3 e 5 indicou que as estirpes CMS 1630, BDF 145.1, CMS 7 e CMS 11 tiveram a melhor performance.

Palavras-chave: Milho. Bioinsumos. Sementes. Germinação. *Azospirillum* spp

SELECTION OF AZOSPIRILLUM STRAINS *spp.* FOR PROMOTING EARLY DEVELOPMENT OF MAIZE SEEDLINGS

ABSTRACT - The bio-inputs market is growing and generates more than R\$1 billion annually in Brazil. This scenario reflects technological advances in the area, the efficiency of bioproducts and the sector's concern with environmental safety, sustainability and reducing production costs. Seed inoculation with various groups of microorganisms is currently recommended. However, it is necessary to select efficient microorganisms to promote plant growth. The aim of this study was to select strains of *Azospirillum spp.* to promote the initial development of maize seedlings, evaluating their effects on seed germination rates and the development of maize seedlings. A total of 07 experiments were carried out, 5 in a seed germination chamber and 1 in a seedbed, at Embrapa Maize and Sorghum, Sete Lagoas, MG, where 13 strains of *Azospirillum spp.* were evaluated. The seventh experiment was carried out in the field area of the Federal University of São João del-Rei (UFSJ), Sete Lagoas, MG, Brazil, testing a mix consisting of two strains of *Azospirillum spp.* The BRS Caimbé corn variety was used. The variables analyzed were germination, shoot and root length, and dry biomass. The strains were genotyped using Box-PCR profiles and identified by phylogeny based on the 16S rRNA and rpOD genes. The bacteria were also assessed for indole-acetic acid (IAA) production and biofilm formation. The *Azospirillum spp.* strains were effective at increasing seed germination rates in all the experiments. The germination chamber experiment showed an average increase of 5.31% in the germination rate, regardless of the strain used. In addition, significant responses were observed in the aerial part and root length variables, with the CMS 2153, CMS 1630, CMS 7, CMS 2142, CMS 2131 and CMS 11 strains standing out. Only experiments 1, 2 and 3 were responsive for the variable dry weight of the aerial part and in relation to root biomass no experiment was significant. In the seedbed trial, the effect of inoculation on seedling emergence ranged from 1.11 to 7.78% compared to the control treatment. However, for the other variables, there was no statistically significant difference. The experiment in the field showed no significant results for the variables tested, but there was a difference of 6.11% in the emergence rate in the field between the inoculated and non-inoculated material. All the bacteria evaluated produce EIA and those with the highest production were CMS 1630, CMS 2153 and CMS 11, producing 76µg/ml, 75.73 µg/ml and 63.86 µg/ml respectively. Regarding the evaluation of biofilm formation, there was no detection with the tested protocol. Genotyping using the Box-PCR profile contributed to the intraspecific differentiation of the strains, with 11 strains sequenced with the 16S rRNA gene identified as 05 distinct *Azospirillum* species (*A. formosense*, *A. brasilense*, *A. sp.*, *A. argentinense* and *A. baldaniorum*), and for the rpOD gene 75% of the 12 strains were identified as *Azospirillum argentinense*. The joint analysis of experiments 1, 2, 3 and 5 indicated that strains CMS 1630, BDF 145.1, CMS 7 and CMS 11 performed best.

Keywords: Corn. Bioinputs. Seeds. Sermination. *Azospirillum spp.*

1 INTRODUÇÃO

A produção sustentável de culturas agrícolas requer a manutenção da capacidade produtiva dos solos, através da reposição dos nutrientes exportados, aliada a técnicas de manejo agrícola que potencializem as fertilidades química, física e biológica dos solos. Para produzir, as plantas precisam extrair ou absorver quantidades específicas de determinados nutrientes do solo. Assim, um solo fértil é aquele que possui capacidade de fornecer esses elementos essenciais às plantas (macro e micronutrientes, principalmente), e essa condição deve ser mantida durante todo o ciclo de crescimento e de desenvolvimento das culturas (Batista *et al.*, 2018).

A reposição dos nutrientes através de fertilizações químicas, orgânicas ou adubos verdes é um dos fatores fundamentais para contribuir com a preservação da potencialidade produtiva dos solos. Por outro lado, por questões de sustentabilidade, acesso, disponibilidade e custos econômicos, o produtor rural tem tido restrições ao amplo uso desses insumos (Bonfim *et al.*, 2021).

De acordo com dados da Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária - CNA, em 2022, o uso de fertilizante chegou a representar até 30% do custo operacional total da produção agrícola. O alto consumo de fertilizantes químicos se justifica pela baixa fertilidade do solo brasileiro, e elevada exportação dos nutrientes pela produção agrícola. Então, para se alcançar altas produtividades, o agricultor necessita construir a fertilidade do solo, com correção do solo, fertilizações e elevação dos teores de matéria orgânica do solo. Um agravante para elevação dos custos de produção, é decorrente do aumento dos preços dos fertilizantes, principalmente os importados (CNA, 2022).

É importante salientar que o Brasil tem grande dependência de importação de fertilizantes, conforme dados da Associação Nacional para Difusão de Adubos - ANDA (2023), em 2022, 86% do volume utilizado de insumos foram importados. Essa vulnerabilidade brasileira, faz com que se tenha maior atenção e se busque alternativas para contornar esse problema. Neste contexto, pesquisas com microrganismos promotores de crescimento vegetal apontam caminhos para diminuir essa subordinação (Hungria *et al.*, 2022).

No Brasil, a inoculação com microrganismos, via bioinsumos, tem apresentado ganhos de produtividade, pois esses organismos são capazes de promover melhores crescimento e desenvolvimento das plantas, além disso, contribuem para substituição total ou parcial, de

fertilizantes químicos, reduzindo custos de produção e minimizando as contaminações do solo, da água e da atmosfera (Santos *et al.*, 2021; Hungria *et al.*, 2022). Em 2021, foi realizado um levantamento do mercado de bioinsumo no Brasil, pela empresa Korin Agricultura e Meio Ambiente, apontando que esse setor movimentava cerca de R\$ 1 bilhão por ano, colaborando com aproximadamente 50 milhões de hectares na produção agrícola, e a tendência é de que o crescimento continue de forma exponencial (Brasil, 2021).

A maioria dos produtos biotecnológicos são formulados à base de bactérias fixadoras de nitrogênio, de bactérias e de fungos solubilizadores-mineralizadores de fósforo, Promotores do Crescimento de Plantas (PCP), e de Fungos Micorrízicos Arbusculares (FMA), eficientes para sistemas de produção de grãos, como por exemplo, milho e soja (Bomfim *et al.*, 2021).

Assim, esses bioinsumos têm contribuído para melhorar a sustentabilidade da agricultura, uma vez que oferecem vantagens econômicas, ambientais e sociais. Recentemente, o uso desses compostos, formulados com diferentes microrganismos (co-inoculação), tem apresentado resultados promissores. Por exemplo, para a cana-de-açúcar, foram desenvolvidos bioinsumos compostos por cinco bactérias, para pastagem, em 2021, foi lançado um inoculante composto por 2 bactérias (*Azospirillum* e *Pseudomonas*) (Bomfim *et al.*, 2021).

Porém, a combinação de diferentes estirpes requer estudos focados na seleção de microrganismos compatíveis entre si, e para as culturas alvo. A prospecção pode ser feita através do isolamento de microrganismos, presentes no solo rizosférico ou de áreas internas das plantas, que são triados em laboratório, com aplicação de testes para identificar características desejáveis, tais como capacidade de fixar nitrogênio, produção de fitohormônios, resistência a estresses bióticos e abióticos (Bargaz *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2023).

As estirpes mais promissoras são testadas em casa de vegetação e em campo, simultaneamente são conduzidas análises moleculares, como sequenciamento genômico, para possibilitar a identificação das características genéticas das estirpes selecionadas. Com base nos resultados de todos os estudos, os microrganismos mais eficazes e estáveis na promoção de crescimento das plantas, são selecionados para formulação de bioinsumos (Rai *et al.*, 2022).

Nesse sentido, o objetivo dessa pesquisa consiste em selecionar estirpes eficientes de *Azospirillum spp.*, e avaliar seus efeitos sobre a taxa de germinação de sementes e o desenvolvimento inicial das plântulas de milho, varietal BRS Caimbé.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho e o uso de fertilizantes minerais

O milho é uma gramínea anual, pertencente à família Poaceae, é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, e o Brasil, destaca-se como o terceiro maior produtor da cultura. Na safra de 2022/2023, foram produzidos aproximadamente 131,9 milhões de toneladas de grãos, e para a safra de 2023/2024 a expectativa é que sejam produzidas 112,7 toneladas de grãos (Conab, 2024).

Esse cereal pode ser utilizado como base da alimentação humana e de animais, além de ser usado na indústria para a produção de: amido, óleo, álcool, alimentos e bebidas. No Brasil essa cultura desempenha grande importância econômica e social no setor agropecuário (Ponciano *et al.*, 2003).

As sementes de milho utilizadas para cultivo, são essenciais para iniciar o processo de crescimento das plantas, e a qualidade dessas sementes, como de qualquer outra espécie vegetal, é determinada por uma série de atributos que influenciam sua capacidade de germinar e produzir plantas saudáveis e produtivas. Esses atributos incluem características genéticas, fisiológicas, físicas e sanitárias (Marcos Filho, 2015).

A avaliação da qualidade das sementes de milho é realizada por meio de análises laboratoriais padronizadas, seguindo metodologias descritas nas Regras de Análises de Sementes do Brasil (RAS). Os ensaios utilizados incluem teste de germinação, teste de vigor, análise de pureza (para verificar a presença de outras sementes ou materiais indesejados), análise sanitária, dentre outros (Brasil, 2009).

Ao escolher as sementes, os agricultores procuram cultivares que sejam adequados para as condições específicas de sua região, e que atendam às suas necessidades de produção, seja para consumo humano, para ração animal ou para outras finalidades. Por isso, o uso de semente com qualidade é fundamental para o sucesso da produção agrícola, pois sementes de baixa qualidade podem resultar em baixo rendimento e aumento dos custos de produção devido à necessidade de replantio ou de controle de doenças. Assim, os agricultores investem em sementes certificadas para garantir êxito em seu cultivo (França-Neto *et al.*, 2016).

As exigências nutricionais de qualquer planta são estabelecidas pela quantidade de nutrientes extraídos durante todo o seu ciclo, para um dado potencial produtivo. Dessa forma, para

garantir uma boa produtividade é necessário disponibilizar os nutrientes em quantidade ideal para a cultura, sendo geralmente fornecidos através de adubações químicas (Malavolta, 2006).

Dentre os nutrientes essenciais ao crescimento e ao desenvolvimento das plantas de milho, destaca-se a importância do nitrogênio (N), pela sua participação nos processos bioquímicos da planta, como a biossíntese de proteínas e de clorofilas (Cancellier *et al.*, 2010). A formação dos grãos depende das proteínas na planta, e a produtividade da cultura está diretamente relacionada com o fornecimento de N (Okumura, 2011).

O fósforo (P) é outro elemento importante, e está envolvido em mecanismos vitais das células vegetais (Taiz et al, 2017). Ele participa ativamente, de processos como a fotossíntese, a respiração, a transferência e o transporte de energia, processos vitais que ficariam comprometidos com a sua ausência, assim, o fósforo torna-se fundamental para o crescimento e para o desenvolvimento do milho (Barra *et al.*, 2019).

Neste contexto, o adequado manejo da fertilidade do solo, incluindo, portanto, o nitrogênio (N) e o fósforo (P), são fatores decisivos para maximizar o potencial produtivo da cultura. Entretanto, os solos brasileiros são altamente intemperizados, apresentando baixa disponibilidade desses nutrientes, por serem solos ricos em ferro (Fe) e em alumínio (Al) que promovem a adsorção de P, elevando a aplicação de fertilizantes, principalmente fosfatados (Moreira e Siqueira, 2006).

A aplicação dos fertilizantes necessários são uma importante ferramenta para se alcançar elevados rendimentos, nas diferentes culturas. É importante mencionar que as reservas nacionais e mundiais de P são finitas, e cada vez mais, novas estratégias devem ser estudadas, apresentadas e aplicadas, visando à resolução de um problema existente (Withers *et al.*, 2018).

Outro ponto a destacar, é que essas novas tecnologias devem possibilitar que a agricultura brasileira não fique totalmente dependente de importações de fertilizantes, pois esta alta dependência torna o sistema da agricultura nacional muito vulnerável à escassez desse recurso não-renovável, que reflete diretamente nos custos de toda produção, elevando cada vez mais os produtos que impactam, principalmente ao consumidor final (Withers *et al.*, 2018).

2.2 Plano Nacional de Fertilizantes e Política Nacional dos Bioinsumos

No Brasil, existe uma grande dependência de importação de fertilizantes, atualmente, o país responde por 8% do consumo global de fertilizantes, ocupando a 4ª posição no ranking mundial,

sendo que 85% dos produtos são importados, e essa sujeição ocasiona à economia brasileira, uma grande vulnerabilidade às oscilações do mercado internacional de fertilizantes (Embrapa, 2022).

Em busca de reduzir essa dependência da importação de insumos, o governo lançou o Plano Nacional de Fertilizantes 2022-2050, oficializado por meio do Decreto nº 10.991, tendo como objetivos: diminuição da dependência externa; aumento da produção nacional; desenvolvimento de tecnologias apropriadas ao ambiente de produção brasileiro (tropical); formação de redes de apoio tecnológico ao produtor rural e aos técnicos; maior oferta tecnológica de produtos e tecnologias; e aumento de produtividade. Espera-se que até em 2050, se consiga diminuir essa dependência para 50% (Brasil, 2022).

Desde 1985, o RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão da Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola) padroniza metodologias para a seleção de estirpes eficientes de microrganismos. Desta maneira, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em parceria com a RELARE, empresas e instituições de ensino e pesquisa, apresentaram normas específicas para controlar a qualidade de inoculantes comercializados e utilizados na agricultura (Brasil, 2011).

O Programa Nacional de Bioinsumos (PNB), estabelecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foi instituído pelo Decreto nº 10.375/2020, com objetivo de estruturar o desenvolvimento e a regularização de produtos de origem biológica, ampliando a oferta, o acesso e o incentivo à adoção do uso correto desses produtos na agropecuária brasileira.

Assim, essa seleção proporciona a valoração da biodiversidade do país, reduzindo a dependência de insumos importados. O PNB traz algumas diretrizes importantes quanto à promoção da pesquisa e da tecnologia, visando à ampliação de conhecimento quanto a microrganismos que auxiliem na produção agrícola sustentável (Brasil, 2020).

Os inoculantes são uma grande alternativa para a redução da subordinação de importação de fertilizantes, pois esses produtos são insumos biológicos, contendo microrganismos promotores de crescimento (fungos e bactérias), que desempenham atividades benéficas e necessárias para o desenvolvimento das plantas (Brasil, 2004).

É obrigatório o registro do inoculante no Mapa para a sua produção, importação e comercialização, esse registro no órgão deve ser precedido da realização dos testes de viabilidade e de eficiência agrônômica, utilizando as orientações (protocolos/roteiros) expedidas por esse ministério, por meio da Instrução Normativa Mapa/SDA nº 13, de 2011 (Brasil, 2011).

O aumento do uso de inoculantes microbianos vem crescendo e despertando a atenção dos agricultores, com isso, as expectativas para a comercialização de novos produtos inoculantes são cada vez mais elevadas, tornando imprescindível a análise e o controle da qualidade e da eficiência desses produtos que chegam ao mercado.

A legislação brasileira exige que os inoculantes tenham uma concentração mínima de 1×10^9 formadoras de colônias (UFC), por grama ou mililitro de produto de células viáveis, mantendo a garantia registrada até a data de seu vencimento, e a ausência de microrganismos não especificados no fator de diluição 1×10^{-5} (Brasil, 2011).

2.3 Microrganismos promotores de crescimento de plantas - MPCP

No solo são encontrados diversos tipos de microrganismos que já foram identificados como promotores de crescimento de plantas (bactérias, fungos e protozoários), que colonizam tanto a rizosfera e/ou os tecidos das plantas (Gomes *et al.*, 2016). A presença desses microrganismos benéficos aos sistemas de cultivo, pode contribuir para um sistema de agricultura mais sustentável, por possibilitarem melhorias quanto à aquisição de nutrientes e de água; promoção de melhor crescimento e de desenvolvimento das plantas; estruturação do solo; maior resistência a estresses bióticos e abióticos inerentes à atividade agrícola (Gomes *et al.*, 2016).

Ao longo dos anos, os estudos das interações entre plantas e microrganismos vêm se intensificando, com intuito principal de entender os vários fatores e mecanismos envolvidos para a seleção de organismos eficientes, na promoção do crescimento e do desenvolvimento das culturas (Ferreira *et al.*, 2014).

De acordo com Santoyo (2022), em resposta à comunidade microbiana presente no solo, as plantas modulam formas de recrutamento para a composição de sua microbiota, sendo que essa dinâmica ocorre em dois estágios durante o desenvolvimento da planta. O primeiro estágio refere-se a antes do plantio, pois neste momento a diversidade do solo é alta, o desenvolvimento da semente promove o recrutamento de microrganismos benéficos, selecionando grupos específicos, que favorecerão ao pleno desenvolvimento das culturas.

O segundo estágio ocorre no fim da safra, neste momento o solo pode recuperar sua biodiversidade por meio de manejos culturais sustentáveis (adubação orgânica, plantas de cobertura, rotação de culturas, etc.) É importante salientar, que durante todo o ciclo de vida das plantas, os pontos que contribuem para a seleção da microbiota são: idade e genótipo da planta,

microbioma da semente, arquitetura da raiz, características e biodiversidade do solo, exsudatos liberados pelas raízes, condições ambientais do local, a resposta de defesa a algum ataque patógeno, enzimas, metabólitos microbianos, etc.. (Santoyo, 2022).

Assim, a correta seleção desses microrganismos representa para as plantas um melhor crescimento e desenvolvimento, alcançando excelentes resultados de produção.

2.4 Bactérias do gênero *Azospirillum*

As bactérias do gênero *Azospirillum* pertencem ao grupo das bactérias promotoras de crescimento (BPCP), são bactérias diazotróficas de vida livre, sendo encontradas em vários tipos de solo, sendo que alguns estudos também apresentam que essas espécies podem ser endofíticas facultativas (Döbereiner e Pedrosa, 1987; Huergo *et al.*, 2008).

Em 1978, foi proposta a reclassificação do gênero, que anteriormente era conhecida como *Spirillum lipoferum*, assim, a espécie passou a ser nominada como *Azospirillum*, na época com duas espécies, *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Hungria, 2011). Recentemente foi denominada como gênero da nova família *Azospirillaceae* (Hördt *et al.*, 2020).

Atualmente, o gênero *Azospirillum* é composto por 24 espécies com classificação validada, com ampla distribuição geográfica (Cassán *et al.*, 2020). Diferentes estirpes e espécies foram isoladas de vários países, incluindo Argentina, Brasil, China, Taiwan, Coréia, Rússia, Paquistão e Iraque, etc. (Cassán *et al.*, 2020).

As diferentes espécies de *Azospirillum* descritas, revelam uma diversidade de estratégias e um alto potencial adaptativo para o gênero (Cassán *et al.*, 2020; Maroniche *et al.*, 2017). Essas bactérias possuem metabolismo versátil de carbono e de nitrogênio, não formam esporos, apresentam formato semelhante a cistos (espirilos) com flagelos laterais, que permitem a locomoção (Lamm; Neyra, 2011). *Azospirillum* expressam um crescimento ótimo em condições de baixa aeração, caracterizando um metabolismo microaerófilo oxidativo (Alexandre, 2015).

2.4.1 Interações benéficas entre as plantas e a *Azospirillum*

As bactérias do gênero *Azospirillum* têm sido associadas a diversos mecanismos de promoção do crescimento vegetal, e muitos estudos têm evidenciado os efeitos benéficos da interação entre as plantas e esses microrganismos. A *Azospirillum* possui a capacidade de colonizar superfícies radiculares da rizosfera e da filosfera das plantas, além disso, estimulam o crescimento das plantas por meio de vários processos, incluindo a Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN), e a

produção de hormônios como auxina, citocinina e giberelina. Também promovem proteção quanto à doenças e à tolerância a estresses abióticos (Hungria, 2011).

Por serem diazotróficas de vida livre, essas bactérias são capazes de fixar, biologicamente, nitrogênio (FBN) atmosférico, em formas que as plantas podem utilizar, e ainda, elas se encontram em associações com gramíneas, e essa capacidade de fixação é especialmente benéfica quando as plantas estão crescendo em condições limitadas de nitrogênio, o que reflete na economia de aplicação de insumos nitrogenados (Baldani, 2005).

A FBN é promovida pelo complexo enzimático nitrogenase, pertencente a esse grupo de microrganismo. A enzima nitrogenase é responsável pela quebra da tripla ligação do nitrogênio atmosférico (N_2), reduzindo a moléculas de amônia, sendo assimilado pelas plantas (Hungria, 2011). Ela é extremamente sensível a elevadas concentrações de oxigênio, fazendo com que esses microrganismos desenvolvam estratégias para executar a FBN, longe de um ambiente de alta tensão de oxigênio (Boyd e Peters, 2013).

As bactérias *Azospirillum* colonizam plantas sem a formação de nódulos e para garantir que a fixação biológica de nitrogênio ocorra em baixas concentrações de oxigênio, ocorre um aumento da respiração e do consumo de oxigênio pela cadeia transportadora de elétrons na membrana celular, diminuindo a concentração intracelular de oxigênio, permitindo a efetiva FBN (Steenhoudt e Vandsreyden, 2000).

Ressalta-se que apenas uma parte do nitrogênio fixado, é transferido para a planta associada, por mecanismos ainda não conhecidos completamente, de maneira que a FBN, por essas bactérias, fornece somente uma pequena parte para suprir as necessidades das plantas, não sendo tão eficientes quanto à simbiose do rizóbio com leguminosas (Hungria, 2022).

Um outro mecanismo importante, é a produção de vários tipos de fitohormônios, por exemplo, a produção de ácido-3-indol acético (AIA) por *Azospirillum*, que ocorre através três vias metabólicas, duas dependentes de triptofano, denominadas indole-3-acetamida (IAM) e indole-3-piruvato (IpyA), e a terceira via, independente de presença de triptofano. Estudos evidenciam que essas substâncias atuam no crescimento radicular e no número de pelos radiculares (Döbbelaere *et al.*, 1999; Barbieri *et al.*, 1986).

Algumas bactérias possuem a capacidade de formação de biofilme, polímero de elevado peso molecular, constituído de resíduos de açúcares, DNA e proteínas, podendo ser disponibilizado

em diferentes frações, de acordo com as espécies bacterianas que a originaram (Flemming; Wingender, 2010).

A formação do biofilme é um mecanismo das bactérias para manter uma população microbiana em regiões específicas, por tempo suficiente, para desencadear interações benéficas e/ou antagônicas (Danhorn e Fuqua, 2007). A presença desse polímero promove o aumento da resistência aos estresses ambientais e à proteção contra patógenos (Rudrappa *et al.*, 2008), pois a sua formação pode ser desencadeada por sinais ambientais muito distintos, como por exemplo, ambiente escasso em nutrientes (Gou *et al.*, 2015).

O modo de ação das bactérias do gênero *Azospirillum* ainda é uma área ativa de pesquisa e não está completamente elucidado. Embora muitos aspectos tenham sido estudados e várias hipóteses tenham sido propostas, ainda não existe um consenso definitivo sobre todos os mecanismos pelos quais essas bactérias interagem com as plantas e influenciam seu crescimento.

2.4.2 A importância do uso da *Azospirillum* na agricultura

O mercado de inoculantes no Brasil tem apresentado um notável crescimento, desempenhando um papel crucial na agricultura brasileira. Os inoculantes são produtos que contêm microrganismos vivos, denominados promotores de crescimento vegetal, oferecendo uma abordagem sustentável para o manejo de nutrientes nas culturas, para a redução de custos de produção e para menor poluição ambiental (Dall’Agnol; Nogueira, 2020; Santos *et al.*, 2021).

Cassán e colaboradores (2020), apontam que inoculantes formulados à base de *Azospirillum* são amplamente adotados no Brasil devido à agricultura extensiva praticada no país. Atualmente esse gênero está presente em mais de 100 produtos agrícolas, evidenciando seu potencial agrônomo, principalmente em relação à sua contribuição para o fornecimento de nitrogênio às plantas.

A *Azospirillum* é uma bactéria benéfica que apresenta diversas vantagens para a agricultura. Sua presença possibilita a redução dos custos com adubação nitrogenada, pois a bactéria é capaz de fixar nitrogênio atmosférico, tornando-o disponível para as plantas. Além disso, a *Azospirillum* produz hormônios vegetais que estimulam o crescimento das plantas, resultando em plantas mais saudáveis e mais resistentes a estresses abióticos e bióticos, contribuindo significativamente, para o aumento da produtividade agrícola e para a diminuição da contaminação ambiental devido ao uso excessivo de insumos agrícolas (Hungria, 2010; Hungria, 2011).

Uma gama de trabalhos tem apresentado sucesso na utilização de *Azospirillum* na inoculação de espécies gramíneas, como por exemplo, o milho (Hungria *et al.*, 2010; Hungria 2011; Ferreira *et al.*, 2013), tendo ganhos em rendimento com a redução da aplicação de adubos nitrogenados, sem haver perdas em produtividade (Hungria , 2022).

A utilização de inoculantes à base de *Azospirillum*, em áreas de cultivo, aumentam em até 30%, o rendimento de grãos, e reduzem em até 25%, as necessidades de fertilização nitrogenada (Hungria, 2010; Hungria, 2011; Hungria, 2022). O estudo realizado por Fonseca (2014), investigou a influência das estirpes de *Azospirillum*, no acúmulo de nutrientes em plantas de milho, considerando diferentes níveis de nitrogênio, e os resultados obtidos foram divergentes, sugerindo que os efeitos das estirpes variam dependendo da estirpe utilizada, concluindo que há uma alta especificidade entre os genótipos das plantas de milho, e os inoculantes de *Azospirillum*.

Além disso, outras pesquisas apontaram que o uso das bactérias *Azospirillum* pode aumentar a atividade enzimática no solo. Isso é importante porque uma maior atividade enzimática pode contribuir para uma melhor ciclagem de nutrientes no sistema solo-planta. Em essência, isso significa que as bactérias do gênero *Azospirillum* têm o potencial de promover processos que favorecem a disponibilidade e a absorção de nutrientes pelas plantas de milho, o que pode ter implicações significativas para a agricultura e para a fertilidade do solo (Fonseca, 2014; Hungria, 2022).

Em síntese, o uso da *Azospirillum* na agricultura se mostra uma estratégia promissora para aumentar a produtividade das culturas, para melhorar a eficiência no uso de nutrientes, para economizar recursos e para promover a sustentabilidade ambiental dos sistemas de produção agrícola.

3 MATERIAS E METÓDOS

Seis experimentos foram conduzidos na Embrapa Milho e Sorgo, em Sete Lagoas, MG, destes cinco experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Ecologia Microbiana e de Microbiologia dos Solos e um em canteiro do Núcleo de Biologia Aplicada – NBA. O sétimo experimento, foi desenvolvido em área de campo da Universidade Federal de São João del-Rei - *Campus* Sete Lagoas, em Sete Lagoas, MG, no período de julho de 2022 a dezembro de 2023.

3.1 Seleção das estirpes de *Azospirillum spp.*

As estirpes dos microrganismos utilizadas para os experimentos foram provenientes da Coleção de Microrganismos Multifuncionais e Fitopatógenos (CMMF), da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG (Tabela 01). As estirpes foram reativadas em meio de cultura sólido Batata Malato, através do método de estrias, para obtenção de colônia pura dos isolados, e o material foi incubado em estufa regulada a $28 \pm 2^\circ\text{C}$, durante cinco dias.

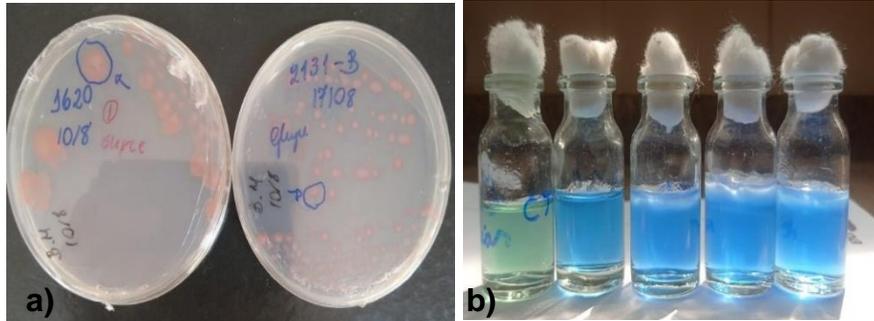
Tabela 01 - Estirpes bacterianas utilizadas no desenvolvimento da pesquisa.

Tratamentos	Identificação pesquisa	Código de acesso	Substrato	Método de identificação (meio de cultura)
T01	CMS 2131	BRM044313 (CMPC 1823)	Solo (plantio do milho), em Sete Lagoas, MG - 06/09/2013	Morfológico (Batata Malato)
T02	CMS 18	BRM 044320 (CMPC 1830)	Não informado, isolamento ocorreu em 10/01/1996	Morfológico (Batata Malato)
T03	CMS 2058	BRM 034862 (CMPC 122)	Raiz (milho), em Sete Lagoas, MG - 11/04/2013	Morfológico (NFB)
T04	BDF 12	BRM 051276 (CMPC 2249)	Raiz (capim- massai), em Sete Lagoas, MG - 02/01/2017	Morfológico (NFB)
T05	BDF 23	BRM 051287 (CMPC 2260)	Solo (rizosfera capim- massai), em Sete Lagoas, MG - 02/01/2017	Morfológico (NFB)
T06	CMS 5	BRM 044317 (CMPC 1827)	Não informado, isolamento ocorreu em 10/01/1996	Morfológico (Batata Malato) e DNA ribossomal
T07	CMS 2142	BRM 044314 (CMPC 1824)	Solo (plantio milho), em Sete Lagoas, MG - 18/02/2014	Morfológico (Batata Malato)
T08	CMS 2153	BRM 044316 (CMPC 1826)	Solo (plantio milho), em Sete Lagoas, MG - 18/02/2014	Morfológico (Batata Malato)
T09	CMS 1630	BRM 044312 (CMPC 1822)	Colmo (sorgo), em Sete Lagoas, MG - 01/12/2012	Morfológico (Batata Malato) e DNA ribossomal
T10	CMS 1626	BRM 044311 (CMPC 1821)	Colmo (sorgo), em Sete Lagoas, MG - 26/12/2011	Morfológico (Batata Malato) e DNA ribossomal
T11	BDF 145.1	BRM 063508 (CMPC 2472)	Raiz (capim- mombaça), em Sete Lagoas, MG - 02/01/2017	Morfológico (meio NFB)
T12	CMS 7	BRM 044318 (CMPC 1828)	Não informado, isolamento ocorreu em 10/01/1996	Morfológico (Batata Malato) e DNA ribossomal
T13	CMS 11	BRM 044319 (CMPC 1829)	Não informado, isolamento ocorreu em 10/01/1996	Morfológico (meio NFB)

Fonte: Alelo micro consultas (2021).

Para verificar a fixação biológica do nitrogênio, colônias isoladas das estirpes foram colocadas em frascos de vidro com 5 ml de meio de cultura NFb semi-sólido, sem a presença de nitrogênio, para avaliação da formação de película, confirmando que o microrganismo reativado é diazotrófico (Figura 01) (Döbereiner *et al.*, 1995).

Figura 01 - Detalhe da cultura de *Azospirillum spp.*, em meio sólido e em meio semi-sólido.
 Legenda - a) Estirpes de *Azospirillum spp.* reativadas, b) Teste de fixação biológica de nitrogênio, das estirpes em meio NFb semi-sólido.



Fonte: Acervo pessoal (MOREIRA, 2024).

3.2 Extração de DNA

Depois de verificada a fixação biológica de nitrogênio das estirpes reativadas, foi selecionada uma colônia isolada para cultivo em inóculo líquido, com objetivo de preparo de estoque do material biológico e de extração do DNA, conforme Hungria *et al.* (2008), com algumas adaptações.

O material foi adicionado em erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 ml do meio líquido comercial Trypic Soy Broth – TSB, sendo incubado sob agitação orbital de 100 rpm à 28°C ± 2, pelo período de 5 dias - incubadora TECNAL TE-421.

Após esse período foram feitas triplicatas para estoque das bactérias, estas foram preservadas em microtubos contendo glicerol a 50% (v/v), sendo armazenados no freezer a 80°C. O restante do inóculo foi centrifugado a 4.000 rpm, por 5 minutos, para formação de pellet bacteriano, a este material foi adicionado 800 µl de tampão CTAB a 2%, agitado no aparelho vórtex para completa homogeneização.

O material originado foi transferido para microtubos com capacidade de 2ml, iniciando o processo de choque térmico, onde os tubos foram submetidos ao congelamento imediato, com a imersão em nitrogênio líquido-N², por 5 minutos, e aquecimento por 10 minutos, em banho-maria a 65 °C , fechando 1 ciclo de choque térmico, sendo realizados 3 ciclos para cada amostra.

Posteriormente, adicionou-se 800 µl de solução de clorofórmio-octanol (24:1), as amostras foram agitadas por 15 minutos, no agitador por inversão. Em seguida, o material foi centrifugado a 14000 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante foi transferido para novo microtubo, acrescentou-se 1000 µl de isopropanol a -20°C, inverteu-se manualmente os tubos e estes foram acondicionados em freezer por 24 h (overnight).

Após essa etapa, o material foi centrifugado, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 200 µl de etanol 70%, a -20°C, e novamente foi feita a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet obtido foi seco ao ar, para completa evaporação do etanol. Após esse período, o pellet formado foi ressuscitado em 100 µl de TE pH 8.0 e 0,2 µl de RNase a 10mg/ml, e os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C, por um período de 10 minutos, para ativação da enzima.

A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), em tampão TAE 1X (10 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA; pH 8,0), corado com solução de GelRed (Biotium, EUA). As amostras foram visualizadas em transiluminador sob luz UV e fotografadas no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, EUA).

A quantificação do DNA foi realizada em espectrofotômetro ND-1000 UV/VIS (NanoDrop Technologies, EUA) e as amostras diluídas para a concentração de 20 ng/µL.

3.3 Caracterização das estirpes bacterianas

Os DNAs extraídos foram amplificados por reações de PCR, com o kit (PROMEGA, EUA), utilizando os primers BOX, (rpODF+rpODR2) e primers 27F e 1492R (gene 16S Rrna). Para cada reação foram utilizados 4,0 µL de 5X GoTaq® Flexi Buffer; 1,6 µL de dNTPs (2,5 nM); 1,6 µL de MgCl₂ (25 mM); 1,0 µL do primer (5 µM); 0,2 µL de (10 µg. µL⁻¹) Albumina de Soro Bovino (BSA); 0,1µl de GoTaq® (5 U/µL) DNA Polymerase; 3µL de DNA (30 ng/µl); e 8,2 µL de água Milli Q, esterilizada para um volume final de 20 µl.

O programa de amplificação foi determinado conforme relatado no trabalho de Versalovic *et al.*, (1994):

Primer Box: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C, por 7 minutos; 34 ciclos de desnaturação (1 minuto a 95°C); anelamento (1 minuto, a 52°C) e extensão (8 minutos, a 65°C); 1 ciclo de extensão final a 65°C (10 minutos); e manutenção a 4°C, até a retirada do material do equipamento.

Após a reação de amplificação, 20 µL dos produtos de PCR foram separados em gel de agarose (1,5% p/v), por 2,5 horas, a 80 V, e posteriormente foi corado com Gel Red™, sendo as

imagens foram capturadas digitalmente sob luz UV no equipamento Gel Logic 200 (KODAK Company, EUA).

Através dos perfis de bandas, gerados a partir do BOX-PCR, foi construída uma matriz binária ('0' = ausência de bandas e '1' = presença de bandas). As características geradas, para cada amplificação das estirpes, foram comparadas e as suas semelhanças estimadas pelo Índice de Jaccard, e as estirpes foram agrupadas e representadas, graficamente, por um dendrograma de similaridade com auxílio do Software PAST (Hammer *et al.*, 2001).

3.4 Caracterização filogenética das estirpes com os genes 16S rRNA e rpOD

A amplificação para os genes 16S rRNA e rpOD foram realizados conforme os trabalhos de Maroniche *et al.* (2017) e de Turner *et al.* (1999), diferindo apenas os tempos e a temperatura de acordo com o primer utilizado:

Primer (rpODF+rpODR2): 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C, por 2 min; 35 ciclos de desnaturação (54 segundos, a 95°C); anelamento (45 segundos, a 64°C) e extensão (1 minuto, a 72°C); 1 ciclo de extensão final a 72°C (5 minutos); e manutenção a 4°C (Maroniche *et al.* 2017).

Primer (27F + 1492R): 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 3 min; 30 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), anelamento (30 segundos a 54°C) e extensão (1 minutos a 72°C); 1 ciclo de extensão final a 72°C (10 minutos) e manutenção a 4°C (Turner *et al.*, 1999).

Após a reação de amplificação, 20 µL dos produtos de PCR foram separados em gel de agarose (1,5% p/v) por 2,5 horas a 80 V, que foi corado com Gel Red™, e as imagens foram capturadas digitalmente sob luz UV (Gel Logic 200 - KODAK Company).

Para obter material genético, com menos especificidade para o sequenciamento com o gene rpOD, foi realizado o corte das bandas amplificadas no gel de agarose, da reação de PCR com os primers rpOD, sendo o material purificado com a utilização “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Kit (Promega, Madison, USA)”, e também foi feita uma nova PCR utilizando as especificações para os primers rpOD.

As reações amplificadas por PCR dos primers (rpODF+rpODR2) e (27F + 1492R) foram purificadas e sequenciadas usando a tecnologia Sanger com o BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit em um ABI 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems™), segundo instruções do fabricante.

Uma vez obtidas as sequências de nucleotídeos, foi realizada uma análise e edição das sequências, utilizando software Bioedit Sequence Alignment Editor Versão 7.0.5.2. (Hall, 2011), e em seguida, foi feita uma busca de similaridade no banco de dados GenBank., comparando as sequências obtidas, com sequências presentes no banco de dados de outras bactérias do gênero (Ncbi,2024).

3.5 Produção de auxinas (AIA) pelas treze estirpes de *Azospirillum spp.*

As estirpes de *Azospirillum spp.* foram analisadas quanto à produção de auxinas (ácido-3-indol acético - AIA), seguindo a metodologia proposta por Bric *et al.* (1991), em que inóculos bacterianos foram crescidos em meio de cultura TSB líquido, a 28°C, sob agitação de 100 rpm, por 24 horas, logo após esse período, foram realizadas leituras da densidade óptica dos inóculos a 540nm, e todos foram ajustados para a concentração 1×10^8 UFC foi suplementado com DL-triptofano, principal precursor da produção de AIA (Patten & Glick, 1996). As amostras ficaram incubadas a 30°C, sob agitação a 100 rpm, e na ausência de luz, por 5 dias.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi centrifugado por 10 minutos, a 6000 rpm, e o sobrenadante obtido, utilizado para a quantificação da produção de AIA. Para a quantificação realizou-se uma mistura constituída de 100 µL de sobrenadante da cultura bacteriana, e 100 µL da solução de Salkoviski (500 µL da solução aquosa de $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ na concentração de 0,136 g/mL e de 24,5 mL, de solução aquosa de ácido perclórico 35% (v/v), adicionadas em placas de 96 micropoços código Costar 3799 da marca corning®, e mantidas à temperatura de $28^\circ\text{C} \pm 2$, sem luminosidade. Aguardou-se 20 minutos, e em seguida, a absorbância foi determinada a 530nm em leitor de ELISA (Thermo Scientific MultiSkan Spectrum). O meio líquido estéril, com ausência de bactéria, foi utilizado como controle negativo, sem que todas as amostras foram avaliadas com três repetições.

A curva padrão foi constituída com as concentrações aquosas de AIA iguais a 0; 10; 20; 40; 80 e 100 µg/mL, e o potencial de produção de AIA foi expresso em termos de µg/mL (Gordon e Weber, 1951). Os dados foram submetidos à análise de variância e às médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa SISVAR.

3.6 Produção de biofilme pelas treze estirpes *Azospirillum spp.*

Foi verificado a capacidade de formação de biofilme pelas trezes estirpes de *Azospirillum spp.* selecionadas, de acordo a metodologia proposta por Stepanović *et al.* (2007), com algumas modificações definidas no Laboratório de Microbiologia dos Solos, da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. Os inóculos bacterianos foram crescidos em meio de cultura TSB líquido, a 28°C, sob agitação de 100 rpm, por 24 horas. após esse período, foram realizadas leituras da densidade óptica dos inóculos a 540nm, e todos foram ajustados para a concentração 1×10^8 UFC.

Em microplaca de poliestireno, com capacidade para 96 amostras, foram pipetados em triplicata 2 μ l do inóculo bacteriano padronizado a 10^8 UFC ml^{-1} em 200 μ l de meio de cultivo TSB, suplementado com glicose 1% (m/v), e nos poços para amostra em branco, foram adicionados apenas o meio de cultura. Os tratamentos foram incubados em estufa a 30°C, por 48h. Posteriormente, foi removida a cultura por meio de inversão, e todos os poços da placa foram lavados três vezes, com 200 μ l de água deionizada, e no fim, a placa foi invertida sobre papel toalha para a drenagem completa da água.

Após secagem, foi adicionado em cada poço, 200 μ l de metanol para fixar o biofilme proveniente das estirpes, aguardou-se por 20 minutos, e novamente o líquido foi removido por inversão, e a placa ficou secando em temperatura ambiente. Em seguida, foi acondicionado em cada poço 200 μ l de solução Cristal Violeta 0,5%, e após 15 minutos de contato, o corante foi removido por inversão. A placa foi lavada com água deionizada por duas vezes, retirou-se o excesso de água. Após secagem, em temperatura ambiente, acrescentou-se 200 μ l de álcool etílico PA, e aguardado o tempo de 30 minutos, realizou-se a leitura da microplaca em espectrofotômetro UV/VIS (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Alemanha) a 570nm.

3.7 Teste de Germinação para avaliação da eficiência dos inoculantes, com estirpes de *Azospirillum spp.*, no desenvolvimento inicial do milho

Foram utilizadas treze estirpes bacterianas do gênero *Azospirillum spp.* (Tabela 01), todas pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais, da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, para avaliar o efeito desses microrganismos na germinação e na promoção do desenvolvimento inicial do milho. Para isso, adaptou-se o protocolo de Teste de Germinação de sementes em substrato de papel tipo Germitest (Brasil, 2009), através da inoculação das sementes.

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Ecologia Microbiana, da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, organizados através do Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com 14 tratamentos e 4 repetições por tratamento, totalizando 56 unidades experimentais (Tabela 02), sendo cada uma das repetições composta por 25 sementes de milho, germinadas em papel Germitest.

Para o milho varietal BRS Caimbé, foram realizados quatro ensaios, três experimentos utilizando sementes do lote de 2020/2021, e um experimento com sementes de BRS Caimbé do lote de 2009, que estava armazenado em câmara fria, e para o híbrido, apenas um ensaio. O tempo gasto em média para a montagem dos experimentos até a verificação dos resultados correspondem em média de quinze a 18 dias, dependendo do crescimento bacteriano.

Tabela 2 - Identificação dos tratamentos, das estirpes de *Azospirillum spp.*, utilizados nos experimentos

Tratamentos	Identificação
T01	CMS 2131
T02	CMS 18
T03	CMS 2058*
T04	BDF 12
T05	BDF 23
T06	CMS 5
T07	CMS 2142
T08	CMS 2153
T09	CMS 1630
T10	CMS 1626
T11	BDF 145.1
T12	CMS 7
T13	CMS 11
T14	CONTROLE

Fonte: Autor, 2024.

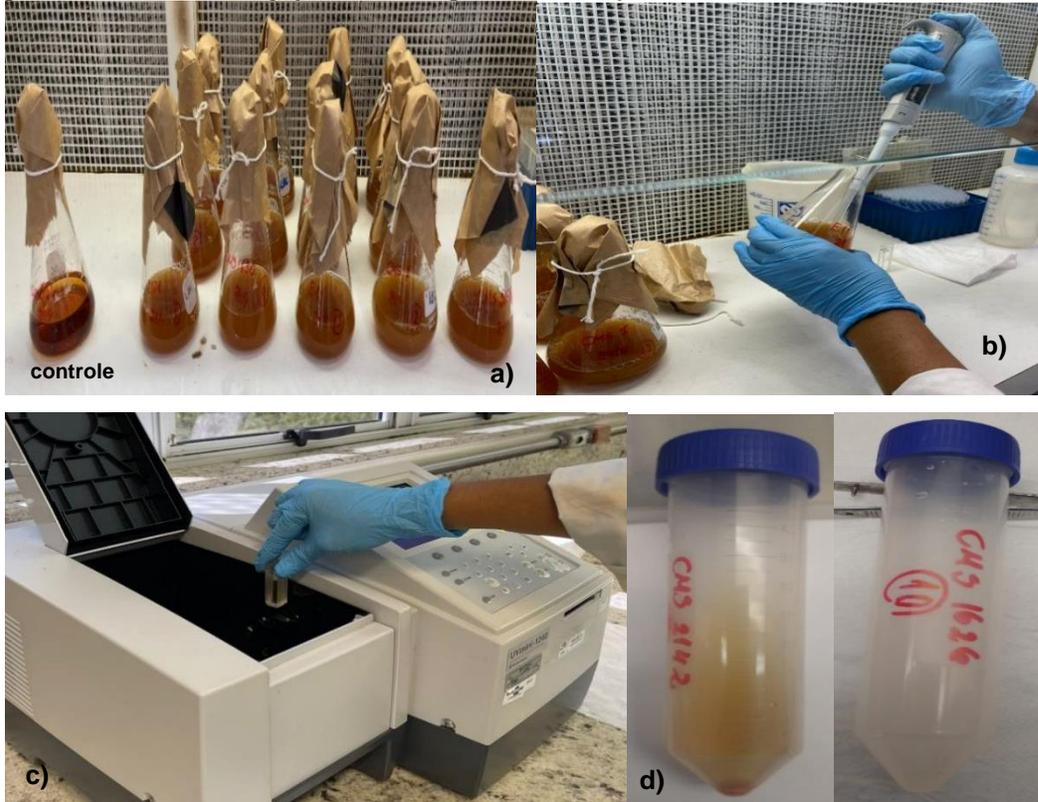
3.7.1 Preparo dos inóculos bacterianos

Para obtenção dos inoculantes, os microrganismos foram cultivados em meio de cultura líquido TSB (Trypticase Soy Broth), por 72 horas, a 28°C, sob agitação constante de 100 rpm. Após o período de incubação, foram realizadas leituras das concentrações dos inóculos no aparelho espectrofotômetro, com ajuste da densidade ótica a 540 nm. Conforme leitura da absorbância, foram realizadas diluições.

As suspensões bacterianas foram ajustadas à absorbância igual a 1, correspondente a uma densidade aproximada de 10^8 células mL^{-1} , de unidades formadoras de colônias, conforme determina a legislação para inoculantes à base de *Azospirillum* (Brasil, 2011).

Após ajuste de concentração, as culturas foram centrifugadas por 15 minutos, a 6000 rpm e ressuspensas em 10 ml de solução salina [0,85% (m/v) NaCl], Figura 02 (a, b, c e d).

Figura 02 (a,b,c e d) - Preparo do inóculo bacteriano com as estirpes de *Azospirillum spp.*
 Legenda - a) Preparo do inoculante líquido; b e c) leitura da absorvância do inóculo bacteriano; d) Formação de pellet através da centrifugação e da ressuspensão em solução salina.



Fonte: Acervo pessoal (MOREIRA, 2024).

3.7.2 Desinfestação e inoculação das sementes germinadas em papel Germitest

Separou-se 100 sementes das cultivares, para cada tratamento, que dentro do fluxo laminar foram desinfetadas com solução de hipoclorito de sódio com concentração de 2%, com adição de três gotas de detergente neutro, e mantidas por agitação por inversão por 5 minutos. Na sequência, procedeu-se o enxágue por três vezes, com água deionizada autoclavada, e o material foi mantido dentro do fluxo laminar sobre papel toalha autoclavado, para retirada do excesso de umidade.

Posteriormente, as sementes foram acondicionadas dentro de sacos plásticos e acrescentou-se o aditivo Biomafix, na quantidade recomendada pelo fabricante. Esse aditivo auxilia na aderência dos inóculos das estirpes de *Azospirillum spp.*, selecionadas para inoculação das sementes. Para o controle foi realizado o mesmo processo, sendo o inoculante substituído, em igual volume, por água deionizada esterilizada (Figura 03).

Realizou-se manualmente, o processo de homogeneização dos sacos plásticos contendo o material, e em seguida, as sementes foram distribuídas sobre o papel de germinação Germitest, previamente umedecidos com meio de cultura líquido MSR, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel seco (Figura 03). O rolo de germinação foi composto por duas folhas de papel Germitest como base, e uma folha para encobrimento, de acordo com as Regras de Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009).

Após a semeadura, os rolos de germinação preparados para cada tratamento, foram acondicionados dentro potes plásticos, adicionou-se 100 ml do meio MSR líquido, no fundo de cada recipiente, os rolos de germinação ficaram dispostos dentro de sacos plásticos com filtro respirável (Sun bag, transparent, Sigma modelo B702). Os tratamentos foram distribuídos aleatoriamente no aparelho Germinador de Sementes ELETROlab regulado a $27^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas, durante 07 dias (Figura 03).

Após sete dias de incubação, avaliou-se o potencial de desenvolvimento inicial das plântulas de milho, verificando o índice de germinação. Considerou-se germinadas, apenas as sementes que apresentaram as estruturas essenciais (o sistema radicular, o coleótilo e a parte aérea), sendo classificadas como normais, as anormais foram as plântulas deformadas, sem a presença de alguma estrutura essencial (Brasil, 2009).

As sementes que não apresentaram nenhum sinal de germinação, foram consideradas mortas, e os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais, segundo critérios descritos nas RAS (Brasil, 2009).

Foram feitas avaliações do comprimento total das plântulas, da parte aérea e do sistema radicular em centímetros, para cada tratamento, com auxílio de uma fita métrica com escala de 100 cm. Para a avaliação da massa seca da parte aérea e das raízes, as partes foram separadas por tratamento e por repetição, acondicionadas separadamente em saco de papel Kraft e levadas à estufa com circulação de ar à temperatura de 65°C , até atingirem peso constante, e depois foram pesadas em balança analítica e os resultados expressos em gramas.

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnovà, realizou-se análise de variância e teste de médias (Tukey a 5% de significância), com o auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2019).

Figura 03 - Etapas da montagem do experimento, para avaliar o efeito da inoculação de estirpes de *Azospirillum spp.*, sobre a germinação e o desenvolvimento inicial do milho - experimentos em papel Germitest.

Legenda - a) Processo de desinfestação e de enxágue das sementes do milho variedade BRS Caimbé; b) secagem das sementes dentro do fluxo laminar; c) adição do biomafix e do inóculo bacteriano; d) saco com sementes inoculadas; e, f) rolos de germinação com os tratamentos; g, h) material acondicionado dentro do aparelho germinador; i) sementes germinadas dos tratamentos inoculados, após sete dias de germinação.



Fonte: Acervo pessoal (MOREIRA, 2024).

3.8 Emergência do milho BRS Caimbé (canteiro e em campo), para avaliação da eficiência dos inoculantes bacterianos de *Azospirillum spp.*

O experimento em canteiro foi conduzido na área do NBA - Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, em agosto de 2023, sendo organizado através do Delineamento Blocos Casualizado (DBC), com 14 tratamentos e 04 repetições, totalizando 56 unidades experimentais (Figura 04). A semeadura foi realizada em sulcos de 1,22 m de comprimento, com 5 cm de profundidade, com utilização de 25 sementes por repetição, espaçadas com 4,5 cm entre si, e com espaçamento de 30 cm entre sulcos e de 75 cm entre blocos.

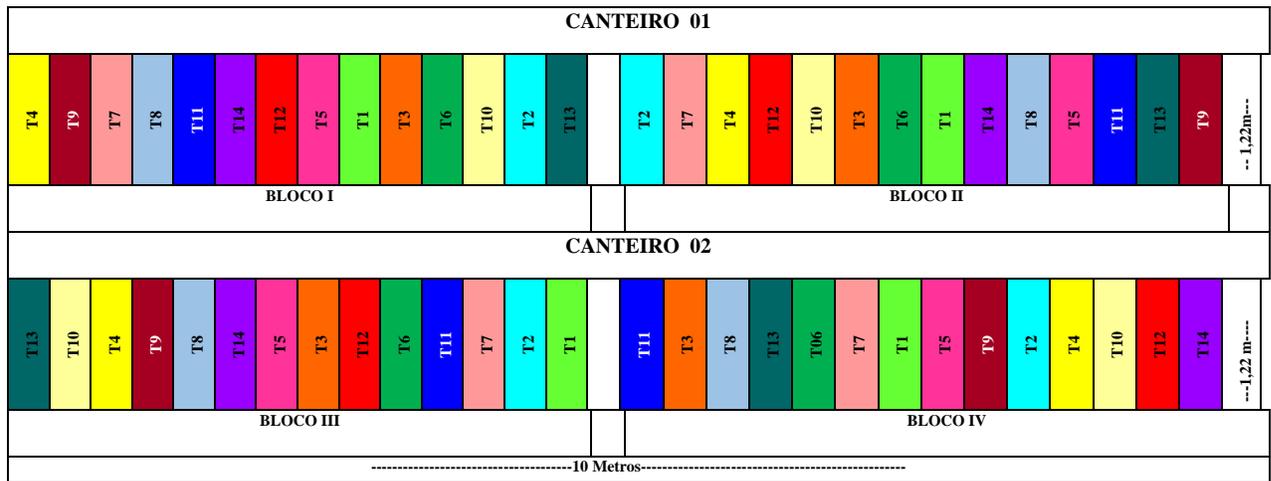
O experimento conduzido em campo, da UFSJ, *Campus* Sete Lagoas, MG, ocorreu em dezessete de novembro de 2023, e foi organizado também através DBC, com 02 tratamentos (T01, sementes inoculadas e T02, sem inoculação), e 3 repetições (Figura 05). Nesse ensaio utilizou-se um inóculo bacteriano contendo um mix de duas estirpes de *Azospirillum spp.*, CMS 2153 e CMS 1630. A semeadura foi realizada em 6 sulcos, com 6 m de comprimento por parcela, onde foram utilizadas 30 sementes por sulco, espaçadas com aproximadamente 16 cm entre si, sendo que ao todo, foram semeadas 180 sementes (Figura 05).

Diariamente, após a emergência inicial, foram realizadas leituras de emergência em ambos os experimentos, até a completa estabilização do estande, utilizando-se como critério o número de plântulas com plúmula exposta. Ao final da contagem, foi registrado o número total de plântulas emergidas, de acordo com as RAS (BRASIL, 2009). Verificou-se a porcentagem de Emergência em campo (RAS, 2009), Índice de Velocidade de Germinação (Maguire, 1962) e Tempo Médio de Emergência (TME), segundo expressão proposta por Labouriau (1983).

Após 18 dias de germinação, foram coletadas 10 plantas por sulco do experimento em canteiro, na Embrapa, e todas as plantas de uma linha de cada parcela do experimento, em campo, na UFSJ. Foram realizadas medidas do comprimento da parte aérea e determinação da massa seca da parte aérea e das raízes. O sistema radicular foi lavado em água corrente para retirada de excesso de solo, e tirou-se o excesso de umidade com papel toalha.

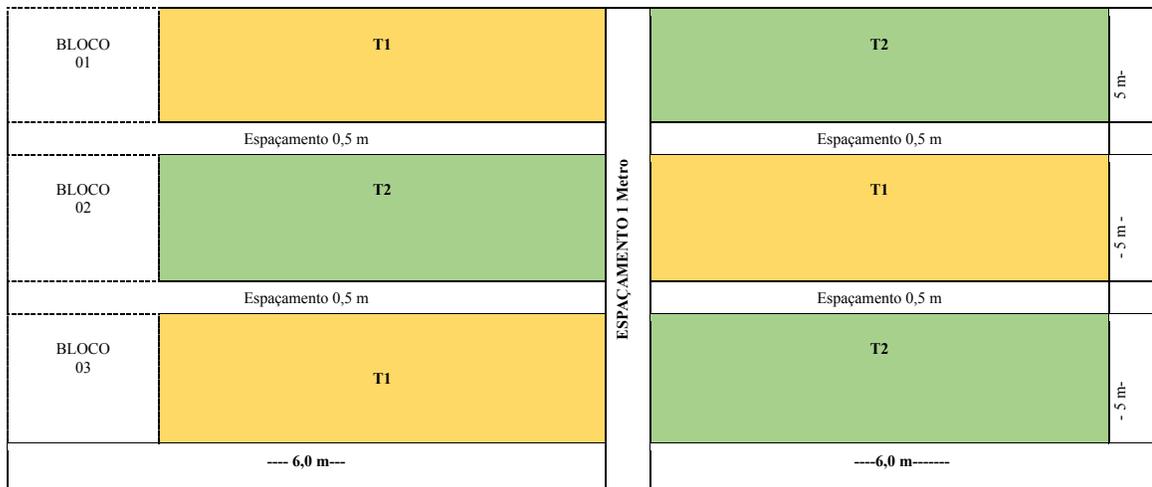
Em seguida, a parte aérea e o sistema radicular foram colocados separadamente, em saco de papel Kraft, e mantidos em estufa com circulação de ar à temperatura de 65°C, até atingirem peso constante. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnovà, à análise de variância e ao teste de médias (Tukey a 5% de significância), com o auxílio do software SISVAR (Ferreira, 2019).

Figura 04 - Croqui da distribuição dos experimentos, nos canteiros da Embrapa, com os respectivos blocos I, II, III e IV.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 05 - Croqui da distribuição do experimento na área experimental da UFSJ.



Fonte: Autor, 2024.

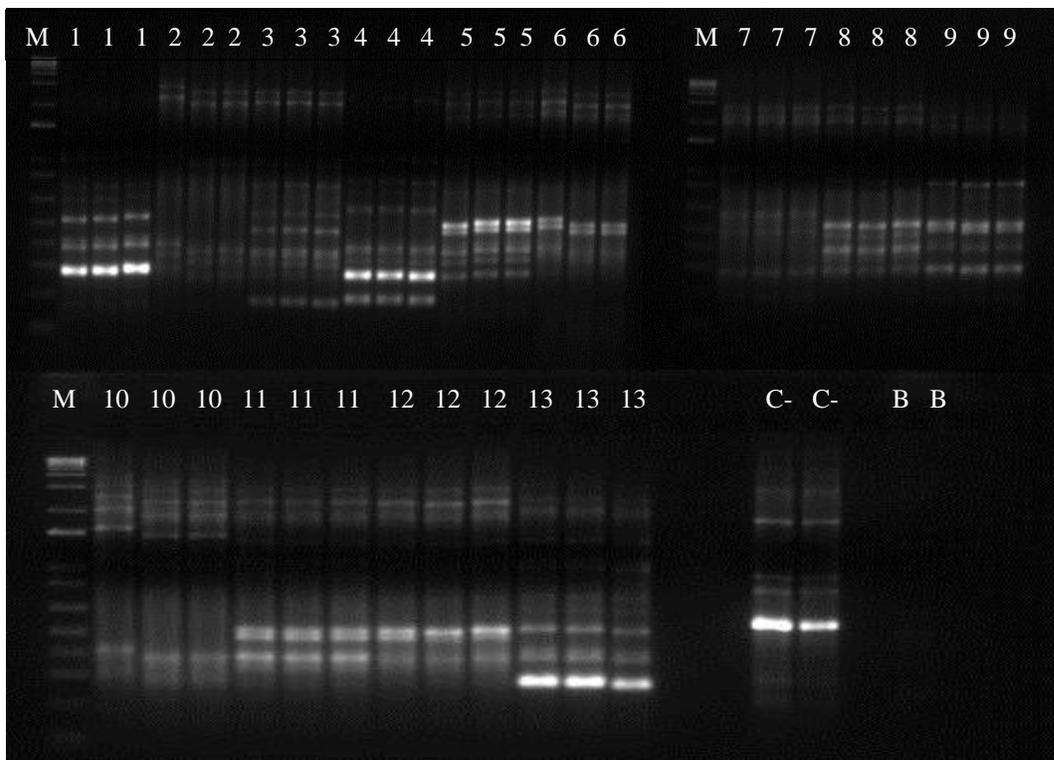
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização das cepas bacterianas

A diversidade genotípica das bactérias foi determinada com a análise de BOX-PCR (Figura 06), conforme descrito no trabalho de Versalovic *et al.* (1994). Com os resultados obtidos através dessa técnica foi possível observar dois pontos importantes. O primeiro, alta reprodutibilidade entre os padrões de bandas para uma mesma estirpe; segundo, um grande e diverso número de fragmentos entre os perfis das diferentes estirpes, o que possibilitou inferir similaridade/dissimilaridade entre os perfis das estirpes avaliadas.

Ferreira, Nogueira e Hungria (2024), apontam que a utilização do primer Box apresenta a amplificação que mais facilmente distingui estirpes, por resultar, na grande maioria das vezes, em perfis únicos requerendo um único primer. No entanto, se não for possível a diferenciação das estirpes com esse primer, outros primers rep-PCR poderão ser utilizados para esse fim.

Figura 06 - Padrões de bandas gerados por BOX-PCR, a partir de cepas de *Azospirillum spp.*
 Legenda - M: marcador molecular 1KB plus; Estirpes de *Azospirillum spp.*: 01: CMS 2131; 02: CMS 18; 03: CMS 2058; 04: BDF 12; 05: BDF 23; 06: CMS 05; 07: CMS 2142; 08: CMS 2153; 09: CMS 1630; 10: CMS 1626; 11: BDF 145.1; 12: CMS 07; 13: CMS 11. C-: controle negativo *Agro. Rhizogenes* 1601. B: branco.

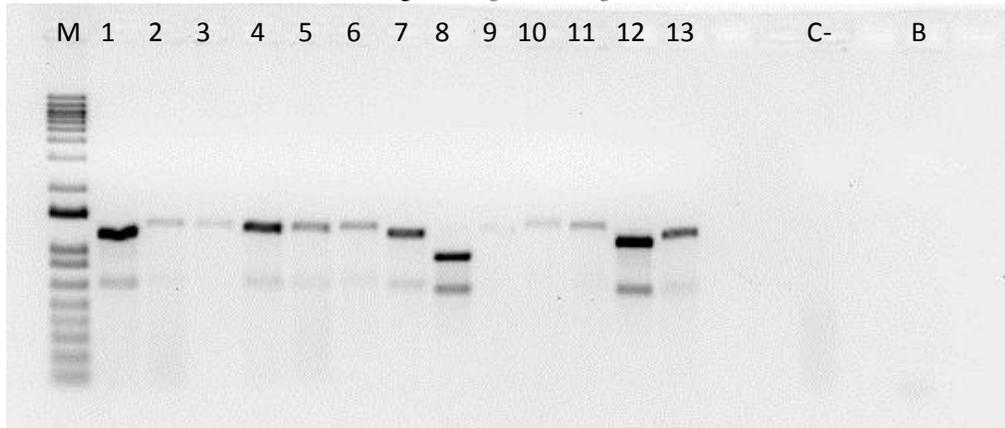


Fonte: Autor, 2024.

A amplificação do DNA pela reação de PCR, com os primers (rpODF+rpODR2), foi bem sucedida em todas as amostras (Figuras 07- a e b). Maroniche *et al.*, (2017), destacam a importância de métodos de tipagem rápidos, e viáveis para identificar novos isolados de microorganismos. Estes métodos foram projetados amplificar especificamente fragmentos de cerca de 870 e 1100 pb, respectivamente, de DNA genômico de diferentes espécies de *Azospirillum spp*

Figura 07a - Amplificação por PCR do gene rpOD, a partir de estirpes de *Azospirillum spp*.

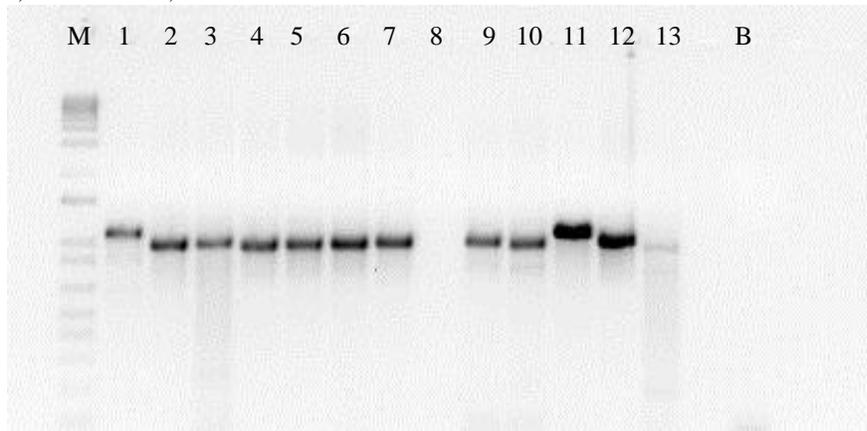
Legenda - M: marcador molecular 1KB plus; Estirpes de *Azospirillum spp*. 01: CMS 2131; 02: CMS 18; 03: CMS 2058; 04: BDF 12; 05: BDF 23; 06: CMS 05; 07: CMS 2142; 08: CMS 2153; 09: CMS 1630; 10: CMS 1626; 11: BDF 145.1; 12: CMS 07; 13: CMS 11. C-: controle negativo *Agro. Rhizogenes* 1601. B: branco.



Fonte: Autor, 2024.

Figura 07 b - Amplificação por PCR das bandas de gel purificadas da reação com os primers rpOD.

Legenda - M: marcador molecular 1KB plus; Estirpes de *Azospirillum spp*. 01: CMS 2131; 02: CMS 18; 03: CMS 2058; 04: BDF 12; 05: BDF 23; 06: CMS 05; 07: CMS 2142; 08: CMS 2153; 09: CMS 1630; 10: CMS 1626; 11: BDF 145.1; 12: CMS 07; 13: CMS 11.; B: branco.



Fonte: Autor, 2024.

A Figura 08, apresenta amplificação da reação com a utilização dos primers 27F e 1492R (gene 16S rRNA), sendo que todas as amostras amplificaram com esses primers.

Figura 08 - Amplificação por PCR do gene 16S rRNA, a partir de estirpes de *Azospirillum spp.*

Legenda - M: marcador molecular 1KB plus; Estirpes de *Azospirillum spp.* 01: CMS 2131; 02: CMS 18; 03: CMS 2058; 04: BDF 12; 05: BDF 23; 06: CMS 05; 07: CMS 2142; 08: CMS 2153; 09: CMS 1630; 10: CMS 1626; 11: BDF 145.1; 12: CMS 07; 13: CMS 11. C-: controle negativo *Agro. Rhizogenes* 1601. B: branco.



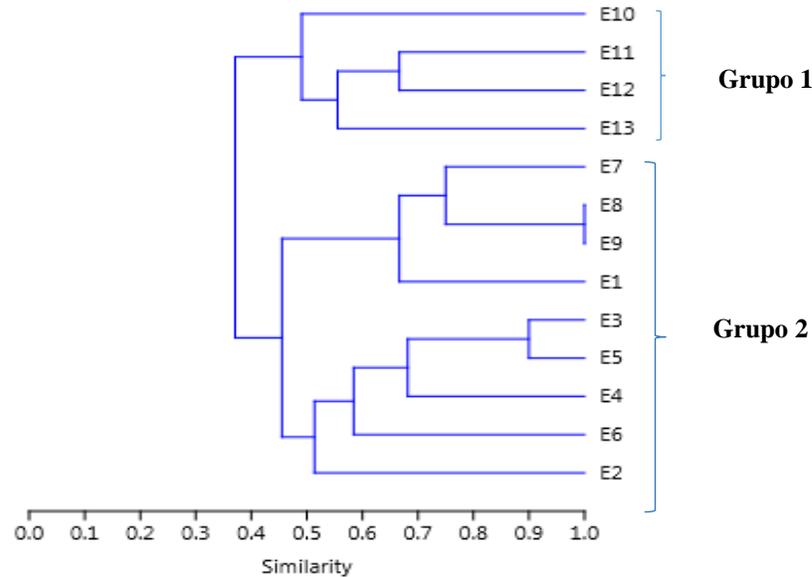
Fonte: Fonte: Autor, 2024.

O dendrograma de similaridade (Figura 09) revelou a formação de dois agrupamentos com 40% de similaridade. O primeiro é formado por quatro estirpes (CMS 1626, BDF 145.1, CMS 07 e CMS 11). A estirpe CMS 1626 é a mais divergente, as demais foram um grupamento interno com 55% de similaridade. As estirpes BDF 145.1 e CMS 07 apresentam 65% de similaridade entre si.

O segundo agrupamento é composto por 9 estirpes, em dois grupos com 45% de similaridade. O primeiro, formado por cinco estirpes (CMS 18, CMS 2058, BDF 12, BDF 23 e CMS 05) com similaridades variando de 50 a 90%, sendo as estirpes CMS 2058 e BDF 23 as mais similares (90%). O segundo, com quatro estirpes (CMS 2131, CMS 2142, CMS 2153 e CMS 1630), sendo a estirpe CMS 2131 a mais divergente, e as estirpes (CMS 2153) e E9 (CMS 1630) apresentaram 100% de similaridade (Figura 09).

A análise de agrupamento demonstrou que existe alta diversidade genética entre a maioria das estirpes. A técnica de genotipagem BOX-PCR é rápida de ser executada, apresenta baixo custo e os resultados obtidos em termos de reprodutibilidade, facilidade de obtenção e de interpretação dos dados, confirmaram que essa técnica pode ser utilizada para genotipagem de estirpes de *Azospirillum spp.*

Figura 09 - Dendrograma de genotipagem de estirpes de *Azospirillum spp* - agrupamento alcançado pelo coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtidas a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX.



Fonte: Autor, 2024.

As análises das sequências parciais do genoma, permitiram a identificação taxonômica de 11 estirpes para os genes 16S rRNA (Tabela 03), e 12 estirpes para o gene rpOD (Tabela 04). As análises de similaridade dos fragmentos do gene 16S rRNA, indicaram valores variando de 79 a 100% de similaridade, com sequências depositadas no banco de dados GenBank do NCBI.

A investigação filogenética utilizando as sequências do gene 16S rRNA, revelou a existência de cinco espécies, composta por *Azospirillum formosense*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum sp*, *Azospirillum argentinense* e *Azospirillum baldaniorum*, sendo que o gênero *Azospirillum brasilense* participou da identificação de cinco estirpes.

Das estirpes avaliadas com o gene rpOD, 12 foram identificadas como *A. brasilense* e *A. argentinense*. Notavelmente, 75% dessas estirpes foram determinadas como pertencentes à espécie *A. argentinense*. Esses resultados indicam uma diversidade interessante dentro do gênero *Azospirillum*, com múltiplas espécies presentes nas amostras analisadas, e uma predominância significativa da espécie *A. argentinense*, entre as estirpes com o gene rpOD sequenciado.

A espécie *A. argentinense* foi proposto uma reclassificação em 2022, utilizando a estirpe Az39, que foi isolada em 1982 das raízes de plantas de trigo na Argentina (Ferreira *et al.*, 2022). Através da análise filogenética do gene 16S rRNA, confirmou-se que essa estirpe pertence ao gênero *Azospirillum*, e possui estreita relação com as espécies de *A. baldaniorum* (estirpe Sp245), de *A. brasilense* (estirpe Sp7), e de *A. formosense* (estirpe CC-Nfb-7), mas ao analisar

características comuns, como por exemplo, proteínas, essa estirpe *A. argentinense* apresentou um agrupamento independente na avaliação filogenética. Essas bactérias são diazotróficas e produtoras de fitohormônios (Ferreira *et al.*, 2022).

A espécie *A. formosense* foi isolada de solo agrícola, no condado de Yunlin, Taiwan, e ao ser analisada com a sequência do gene 16S rRNA, mostrou-se com alta similaridade em relação à *A. brasilense* (97,4%), que são fixadoras de nitrogênio e possuem um alto potencial para utilização como biofertilizante (Lin *et al.*, 2012). Em 2020, algumas estirpes de *Azospirillum* (estirpes Sp245, Vi22 e BR12001) foram reclassificadas como *A. baldaniorum* sp.. Apesar das semelhanças fenotípicas e fisiológicas com algumas de *A. brasilense*, a estirpe Sp245 foi apontada como uma espécie distinta, com base em análises moleculares do DNA.

A estirpe Sp245 é fixadora de nitrogênio e produz grande número de reguladores de crescimento vegetal, como IAA e óxido nítrico. Essa bactéria tem sido amplamente estudada, especialmente considerando seu potencial como inoculante para promoção do crescimento de plantas (Ferreira *et al.*, 2020).

Hungria *et al.* (2018), ao avaliarem as sequências genômicas das cepas Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense*, que são utilizadas comercialmente na formulação de inoculantes para gramíneas e leguminosas no Brasil, identificaram genes relacionados à fixação biológica de nitrogênio e síntese de fitohormônios. Mesmo diferindo em propriedades fenotípicas, seus genomas são altamente semelhantes. Todas as espécies de *Azospirillum*, têm despertado interesse significativo na agricultura devido a seus benefícios já descritos, e um estudo mais aprofundado dos genomas, permitirá a formulação de estratégias mais eficazes no manejo agrícola e no uso sustentável de recursos naturais.

Tabela 03- Identificação por homologia da sequência, do gene **16S rRNA**, de cepas de *Azospirillum* spp., utilizando o banco de dados GenBank, através da ferramenta BLAST.

IDENTIFICAÇÃO DA ESTIRPE	IDENTIDADE	DESCRIÇÃO	E-VALUE	% DE COBERTURA	COMPRIMENTO DA CONSULTA	FILO/CLASSE	ACESSO
CMS 2131	100%	<i>Azospirillum formosense</i>	0	100%	881 PB	Proteobactéria/ Alpha	MK542977.1
	100%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	CP032322.1
	100%	<i>Azospirillum baldaniorum</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	CP022262.1
CMS18	89,83%	<i>Azospirillum sp</i>	0	99%	780 PB	Proteobactéria/ Alpha	MT302839.1
	89,83%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	99%		Proteobactéria/ Alpha	CP007794.1
	89,83%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	99%		Proteobactéria/ Alpha	CP007793.1
CMS 2058	87,52%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	99%	661 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP032343.1
	87,52%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	99%		Proteobactéria/ Alpha	CP032340.1
	87,52%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	99%		Proteobactéria/ Alpha	CP032339.1
BDF 12	90,77%	<i>Azospirillum sp.</i>	0	100%	830 PB	Proteobactéria/ Alpha	KX618468.1
	90,66%	<i>Azospirillum sp.</i>	0	98%		Proteobactéria/ Alpha	KX618467.1
	90,30%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	CP032343.1
BDF23	89,39%	<i>Azospirillum formosense</i>	0	99%	760 PB	Proteobactéria/ Alpha	MK543110.1
	89,39%	<i>Azospirillum formosense</i>	0	99%		Proteobactéria/ Alpha	MK543096.1
	89,39%	<i>Azospirillum formosense</i>	0	99%		Proteobactéria/ Alpha	MK542977.1
CMS2142	99,52%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	100%	1031 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP032348.1
	99,52%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	CP032346.1
	99,52%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	100%		Proteobactéria/Alpha	MK351296.1

Continua.

Tabela 03- Identificação por homologia da sequência, do gene **16S rRNA**, de cepas de *Azospirillum* spp., utilizando o banco de dados GenBank, através da ferramenta BLAST.

CMS2153	79,05%	<i>Azospirillum brasilense</i>	$1e^{-117}$	82%	781 PB	Proteobactéria/ Alpha	AB480699.1
	78,78%	<i>Azospirillum brasilense</i>	$5e^{-116}$	83%		Proteobactéria/ Alpha	MT993417.1
	78,80%	<i>Azospirillum brasilense</i>	$6e^{-115}$	82%		Proteobactéria/ Alpha	MK543093.1
CMS 1630	100%	<i>Azospirillum baldaniorum</i>	0	100%	1011 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP022262.1
	100%	<i>Azospirillum sp</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	KY399211.1
	100%	<i>Azospirillum sp</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	KY399208.1
CMS 1626	96,71%	<i>Azospirillum baldaniorum</i>	0	100%	911 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP022262.1
	96,71%	<i>Azospirillum sp</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	KY399211.1
	96,71%	<i>Azospirillum sp</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	KY399210.1
BDF145.1	99,58%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	100%	961 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP032348.1
	99,58%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	CP032332.1
	99,58%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	CP032331.1
CMS 11	99,13%	<i>Azospirillum formosense</i>	0	100%	801 PB	Proteobactéria/ Alpha	MK542977.1
	99,13%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	CP032322.1
	99,13%	<i>Azospirillum baldaniorum</i>	0	100%		Proteobactéria/ Alpha	CP022262.1

Fonte: Autor, 2024.

Tabela 04 - Identificação por homologia da sequência do gene **rpOD**, de cepas de *Azospirillum spp.*, utilizando o banco de dados GenBank, através da ferramenta BLAST.

IDENTIFICAÇÃO DA ESTIRPE	IDENTIDADE	DESCRIÇÃO	E-VALUE	% DE COBERTURA	COMPRIMENTO DA CONSULTA	FILO/CLASSE	ACESSO
CMS 2131	99,16%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	95%	1356 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP007793.1
	98,62%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	96%		Proteobactéria/ Alpha	CP032321.1
	98,55%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	96%		Proteobactéria/ Alpha	CP032330.1
CMS 18	99,39%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	98%	1333 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP007793.1
	98,78%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	98%		Proteobactéria/ Alpha	CP032330.1
	98,70%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	98%		Proteobactéria/ Alpha	CP032321.1
CMS2058	97,16%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	92%	1336 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP033318.1
	97,16%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	92%		Proteobactéria/ Alpha	CP033312.1
	97,16%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	92%		Proteobactéria/ Alpha	CP032339.1
BDF 12	99,39%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	97%	1337 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP033318.1
	99,39%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	97%		Proteobactéria/ Alpha	CP033312.1
	99,39%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	97%		Proteobactéria/ Alpha	CP032339.1
BDF 23	99,54%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	97%	1338 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP007793.1
	99,07%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	96%		Proteobactéria/ Alpha	CP032330.1
	99,54%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	96%		Proteobactéria/ Alpha	CP032321.1
CMS 05	99,23%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	97%	1335 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP007793.1
	99,00%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	96%		Proteobactéria/ Alpha	CP032330.1

Continua.

Tabela 04 - Identificação por homologia da sequência do gene **rpOD**, de cepas de *Azospirillum spp.*, utilizando o banco de dados GenBank, através da ferramenta BLAST.

CMS 2142	98,85%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	99%	1270 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP032345.1
	98,69%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	99%		Proteobactéria/ Alpha	CP032321.1
	98,61%	<i>Azospirillum brasilense</i>	0	99%		Proteobactéria/ Alpha	CP033318.1
CMS 1630	98,42%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	93%	1344 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP007793.1
	97,94%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	93%		Proteobactéria/ Alpha	CP032330.1
	97,86%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	93%		Proteobactéria/ Alpha	CP032321.1
CMS 1626	99,46%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	96%	1335 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP007793.1
	98,84%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	96%		Proteobactéria/ Alpha	CP032330.1
	98,76%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	96%		Proteobactéria/ Alpha	CP032321.1
BDF 145.1	99,44%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	98%	1273 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP007793.1
	98,81 %	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	98%		Proteobactéria/ Alpha	CP032330.1
	98,73%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	98%		Proteobactéria/ Alpha	CP032321.1
CMS 07	97,83%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	93%	1325 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP007793.1
	97,27%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	93%		Proteobactéria/ Alpha	CP032330.1
	97,18%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	93%		Proteobactéria/ Alpha	CP032321.1
CMS 11	99,31%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	98%	1331 PB	Proteobactéria/ Alpha	CP007793.1
	98,93%	<i>Azospirillum argentinense</i>	0	98%		Proteobactéria/ Alpha	CP032321.1

Fonte: Autor, 2024.

4.2 Produção de auxinas (AIA) por estirpes de *Azospirillum spp.*

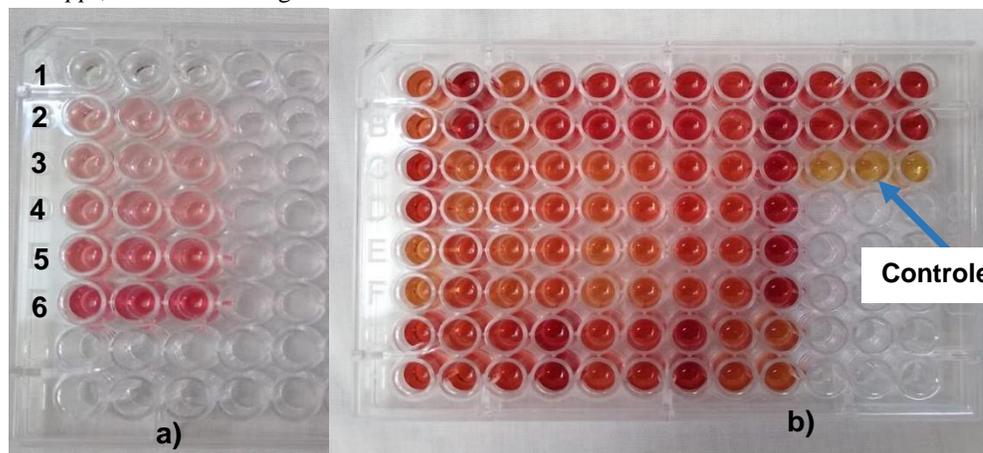
Todas as estirpes de *Azospirillum spp.* avaliadas, foram capazes de produzir o hormônio ácido indolacético (AIA), em meio de cultura TSB suplementado com DL-triptofano - Figura 10 (a, b).

A Figura 10 (a, b) apresenta o ensaio colorimétrico com o emprego da solução de Salkowski, para identificar e para quantificar as estirpes capazes de produzir auxinas pela manifestação da cor vermelha devido à oxidação de compostos indólicos, por sais férricos contidos no reagente Salkowski (Marchioro, 2005).

Como a intensidade da cor depende da concentração de AIA presente, foi possível observar, visualmente, uma variação da intensidade de cor entre as estirpes analisadas, variando da cor laranja ao vermelho intenso.

Figura 10 (a, b) - Teste colorimétrico da produção de AIA, nas trezes estirpes de *Azospirillum spp.*

Legenda - A - Padrões de concentrações de AIA comercial. 1: Controle negativo (apenas meio TSB e solução de Salkowski); 2: 10 µg mL; 3: 20 µg mL; 4: 40 µg mL; 5: 80 µg mL; 6: 100 µg mL. B - Quantificação de AIA das estirpes de *Azospirillum spp.*, utilizando o reagente de Salkowski.



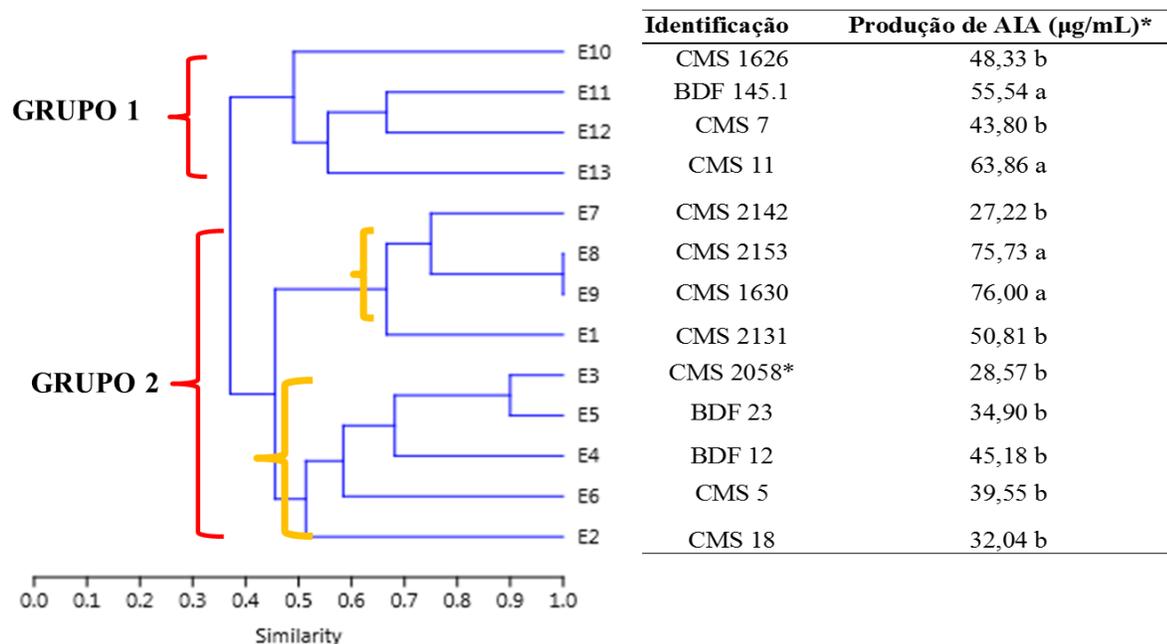
Fonte: Arquivo pessoal (MOREIRA, 2024)

Dentre as estirpes analisadas, foi observado valores de produção variando entre 27,22 µg/mL a 76,00 µg/mL. As estirpes CMS 1630, CMS 2153, CMS 11 e BDF 145.1 obtiveram os maiores valores de produção de AIA, sendo que a estirpe CMS 1630 se destacou com a maior produção (76,00 µg/mL), seguida da estirpe CMS 2153 com (75,73 µg/mL).

A Figura 11, mostra a relação das concentrações obtidas de AIA, com os resultados apresentados pelo Dendrograma de Similaridade, conforme Figura 09. Foi possível verificar que a concentração de AIA apresentada pelas estirpes, dentro dos grupos formados, demonstrou valores

aproximados, sendo as estirpes CMS 2153 e CMS 1630, as maiores produtoras de AIA, com 100% de similaridade.

Figura 11 - Relação da produção de ácido indolacético (AIA) pelas treze estirpes de *Azospirillum spp.*, com o Dendrograma de Similaridade, da genotipagem das estirpes de *Azospirillum spp.*, obtidas a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX.



*Médias seguidas de mesma letra, não diferem entre si pelo teste de média Scott-Knott ($p < 0,05$).

Fonte: Autor, 2024.

No trabalho de Ribeiro (2018), ao analisar a produção de AIA em duas estirpes de *A. brasilense* (2142 e 1626), em meio de cultura suplementado com DL-triptofano, obteve-se valor de produção, respectivamente, de 65,78 e de 52,10 µg/mL de AIA.

Nesse trabalho, o valor máximo determinado foi de 76 µg/mL de AIA, o que possivelmente indica o potencial dessas estirpes avaliadas na promoção de crescimento de plantas. A presença de auxina modifica a morfologia das raízes, aumentando o comprimento e o número de pelos radiculares, o que pode auxiliar na eficiência das plantas em absorver água e nutrientes (Barbieri *et al.*, 1986).

4.3 Produção de biofilme por estirpes de *Azospirillum spp.*

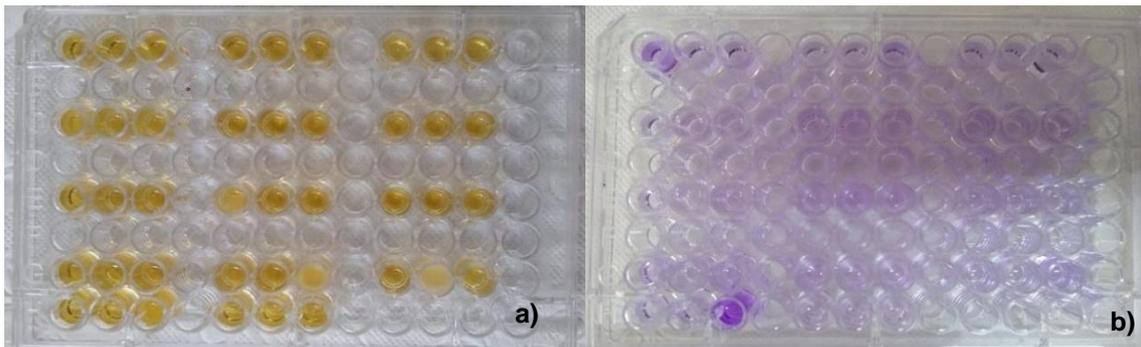
A Figura 12 (a, b), apresenta o resultado da análise de produção de biofilme, pelas bactérias estudadas, que demonstra que nessa experimentação, nenhuma das estirpes avaliadas foi identificada como produtora de biofilme, sendo a análise realizada através dos cálculos das

diferenças entre as leituras das amostras (LA) e o controle (LC), classificando as bactérias em não formadoras, fracamente, moderadamente e fortemente formadoras (Stepanović *et al.*, 2007).

A classificação das bactérias foi feita da seguinte forma: o material classificado como não formadoras, foi aquele que obteve densidade óptica da absorbância menor ou igual ao controle ($LA \leq LC$); o material classificado como fracamente formadoras foi aquele que possuiu leitura maior ou igual ao controle, ou menor ou igual duas vezes a leitura do controle ($LC \leq LA \leq 2x LC$); o material classificado como moderadamente formadoras ($2x LC < LA \leq 4x LC$) ou com fortemente formadores ($4x LC < LA$). Assim, através dessa diferenciação, todas as estirpes estudadas foram classificadas como não formadoras.

No estudo de Santos *et al.* (2017), foi utilizada uma metodologia proposta por Christensen *et al.* (1985), com algumas modificações, resultando em respostas positivas para formação do biofilme, já nessa pesquisa, este teste foi realizado duas vezes, com a metodologia adaptada de Stepanović *et al.* (2007), e em ambos a resposta foi negativa. Portanto, para futuros ensaios, considera-se que a metodologia a ser testada deve ser a proposta no estudo de Santos *et al.* (2017).

Figura 12 (a e b) - Teste colorimétrico da produção de biofilme pelas estirpes de *Azospirillum spp.*



Fonte: Arquivo pessoal (MOREIRA, 2024)

4.4 Análise de variância do Teste de Germinação do milho, variedade BRS Caimbé, inoculado com *Azospirillum spp.*

4.4.1 Resultado de germinação dos genótipos inoculados com *Azospirillum spp.*

A Tabela 05, demonstra a germinação das sementes em relação aos tratamentos de inoculação com estirpes de *Azospirillum spp.*, nos quatro experimentos com a variedade BRS Caimbé.

Tabela 5 - Efeito da inoculação sobre a taxa de germinação do milho BRS Caimbé, inoculado com as treze estirpes de *Azospirillum spp*, nos experimentos 01, 02, 03 e 04), após sete dias de tratamento.

Tratamentos	Germinação (%)			
	Experimento 01	Experimento 02	Experimento 03	Experimento 04
T01 - CMS 2131	96 b	89 f	93 f	80 ab
T02 - CMS 18	93 e	88 g	95 d	77 ab
T03 - CMS 2058*	96 b	94 b	98 a	82 ab
T04 - BDF 12	95 c	89 f	92 g	79 ab
T05 - BDF 23	93 e	93 c	95 d	80 ab
T06 - CMS 5	92 f	96 a	94 e	79 ab
T07 - CMS 2142	93 e	92 d	96 c	79 ab
T08 - CMS 2153	98 a	91 e	97 b	81 ab
T09- CMS 1630	96 b	92 d	98 a	83 a
T10 - CMS 1626	94 d	96 a	97 b	80 ab
T11 - BDF 145.1	96 b	94 b	94 e	80 ab
T12 - CMS 7	95 c	93 c	91 h	82 ab
T13 - CMS 11	93 e	88 g	96 c	85 a
T14 - CONTROLE	90 f	86 h	91 h	75 b

*Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de média Tukey (p<0,05).

Fonte: Autor, 2024.

Os experimentos 01, 02 e 03 foram conduzidos utilizando sementes BRS Caimbé, da safra de 2020/2021, e o experimento 04, conduzido com sementes BRS Caimbé do lote de 2009 (armazenadas em câmara fria), com objetivo de verificar a eficiência da inoculação dessas estirpes sobre o efeito da taxa de germinação, considerando a possibilidade de que essas sementes poderiam ter sua viabilidade comprometida.

O Teste de Germinação de milho, em substrato de papel, é um método acessível e eficiente para estudar o desenvolvimento inicial das plântulas. Segundo as RAS (Brasil, 2009), são necessárias 400 sementes para a realização desse teste. No entanto, nesse estudo, utilizou-se um número amostral equivalente a 1/4 do recomendado devido à limitação de espaço na câmara de germinação. Além disso, nos experimentos, as sementes foram germinadas na parte superior do papel Germitest, para permitir um melhor desenvolvimento das partes aérea e radicular, e todas foram avaliadas individualmente.

Em todos os experimentos com BRS Caimbé, a taxa de germinação das sementes inoculadas foi superior à das sementes não inoculadas, com variações significativas entre os experimentos. Esse resultado é bastante promissor, pois favorece o estabelecimento de estandes com menor número de falhas.

No entanto, ocorreu uma grande variação na performance das estirpes entre os experimentos. No primeiro experimento, a temperatura do germinador manteve-se com médias mínimas de 20,5°C (noite) e máximas de 28,5°C (dia); no segundo experimento, ocorreu queda de

energia no final de semana e isso ocasionou um desregulamento do aparelho germinador, com as temperaturas atingindo a mínima de 7,4°C e máxima de 23,3°C. Ao detectar o problema foi realizado o ajuste para continuação do teste.

Nos outros experimentos, as temperaturas seguiram o ajuste do equipamento. Quando comparado aos demais experimentos, o segundo foi prejudicado, pois as plântulas originadas do processo de germinação dele, apresentaram um menor desenvolvimento, refletindo no comprimento total, na parte aérea e no comprimento de raiz. Comparando esse experimento com os demais, a germinação foi 13% menor em relação às plântulas germinadas nos experimentos 01 e 03.

Um aspecto que influencia diretamente ao processo germinativo das sementes, é a temperatura, com grande ação sobre a velocidade, a porcentagem de germinação e a emergência devido a possíveis interferências nas reações bioquímicas que determinam o processo germinativo (Mayer; Poljakoff-Mayber, 1989).

Para sementes de milho, a temperatura ótima recomendada no Teste de Germinação é de 25°C (Brasil, 2009). Temperaturas muito acima ou muito abaixo desse valor ótimo, fazem com que a germinação fique mais lenta, e as sementes menos vigorosas, o que em muitos casos faz com essas sementes não resistem ao estresse imposto pelo calor.

Mesmo com a interferência de variação da temperatura, ocorrida com o segundo experimento, as sementes superaram o tratamento controle, o que possivelmente atribuiu-se à presença da bactéria, que auxiliou as plantas superarem o estresse no qual as sementes foram submetidas.

No quarto experimento, as sementes de BRS Caimbé germinadas, do lote de 2009, mostraram um bom desenvolvimento, embora mais modesto em comparação a materiais mais recentes. Baudet (2012), aponta que em relação à queda da germinação, de sementes armazenadas, um fator a ser considerado para compreender esta redução é a deterioração natural, um processo irreversível. A deterioração, apesar de ser inevitável, pode ser controlada, por meio de um armazenamento apropriado, o qual possibilitará a manutenção das características genéticas das sementes, até o momento da semeadura.

Os índices de germinação no experimento 04, variaram de 75% a 85%, sendo que todas as sementes inoculadas apresentaram resultados superiores ao tratamento controle. Os tratamentos

T13 e T09 diferiram estatisticamente dos demais. Além disso, o tratamento T09 também foi superior no experimento 03.

Embora os resultados tenham variado, especialmente em relação à temperatura, no segundo experimento, esses valores sugerem que essas bactérias podem ser exploradas para mitigar os efeitos das mudanças climáticas, que podem provocar alterações bruscas de temperatura.

A Figura 13 (a, b, c, d), demonstram que as sementes inoculadas, com as estirpes de *Azospirillum spp.*, aumentaram a porcentagem de germinação quando comparadas com as sementes não inoculadas. Isso evidencia que, independente da temperatura exposta, sementes inoculadas foram superiores quando comparadas com sementes com ausência da bactéria.

Analisando esses resultados, percebeu-se que algumas estirpes mantiveram um padrão consistente em todos os experimentos, por exemplo, a estirpe CMS2058* (T03) apresentou índices de aumento de germinação de 6,67; de 9,30; de 7,69; e de 9,33%, nos quatro experimentos, respectivamente. Outras bactérias que desempenharam semelhante papel foram a CMS2153 (T8) e CMS 1630 (T9), com bons percentuais de aumento de germinação em relação ao controle (Figura 13 - a, b, c e d).

Bullegon *et al.* (2014), em sua pesquisa, apontou que a diferença da germinação entre os tratamentos em relação ao controle pode ter ocorrido devido a decursos fisiológicos hormonais, nos quais a presença de *A. brasilense* pode facilitar, ou complementar a liberação dessas substâncias em virtude das características genéticas inerentes a cada material.

No trabalho de Dartora *et al.* (2013), ao avaliar a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de milho e de trigo, foi verificado um aumento dos índices de germinação, do vigor e do desenvolvimento radicular, em decorrência da produção de fitohormônios por *A. brasilense*.

Algumas pesquisas com *Azospirillum brasilense* apontam que essas bactérias promovem alterações no processo germinativo das sementes, mesmo em curto período de tempo, tendo efeitos diretos sobre a velocidade de germinação e o número de plântulas normais emergidas, devido à produção de fitohormônios vegetais, como por exemplo, auxina e giberelina, que participam de processos que desencadeiam a indução do alongamento celular; a estimulação do processo germinativo, com maior atividade de enzimas ligadas à degradação de carboidratos; e a translocação até o embrião (Hungria, 2011; Dartora *et al.*, 2016)

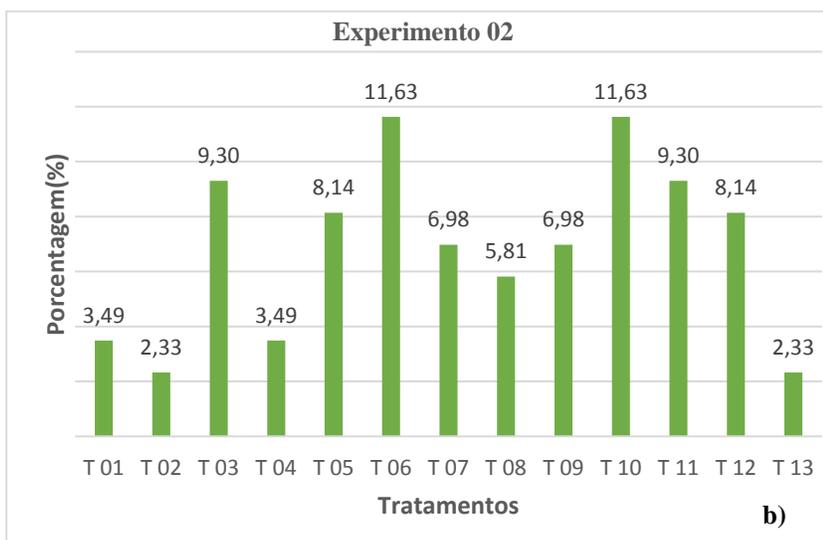
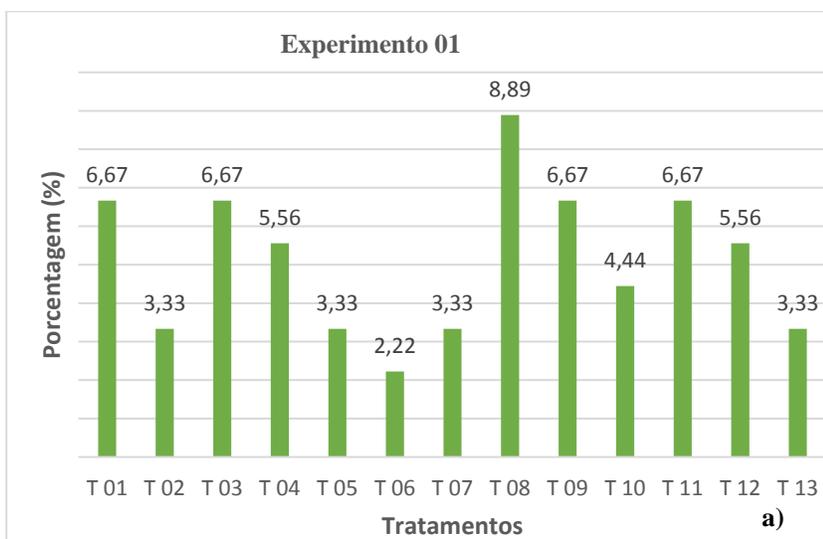
De acordo com a Instrução Normativa de nº 45 do MAPA, de 2013, que trata dos padrões para produção e para comercialização de sementes de grandes culturas, a germinação do milho

deve ser de no mínimo 75%, para sementes híbridas e variedades (Brasil, 2013). Notou-se com os experimentos realizados, que esse pressuposto foi atendido.

Nesse estudo ficou comprovado que a inoculação com estirpes de *Azospirillum spp.*, contribuiu para elevar os índices de germinação do milho BRS Caimbé, avaliados em relação ao tratamento controle (Figura 13 - a, b, c e d), e que esse método de análise possibilita uma economia de recurso e de tempo, pois permite verificar o efeito da inoculação na fase inicial da cultura, e selecionar os melhores microrganismos atuantes.

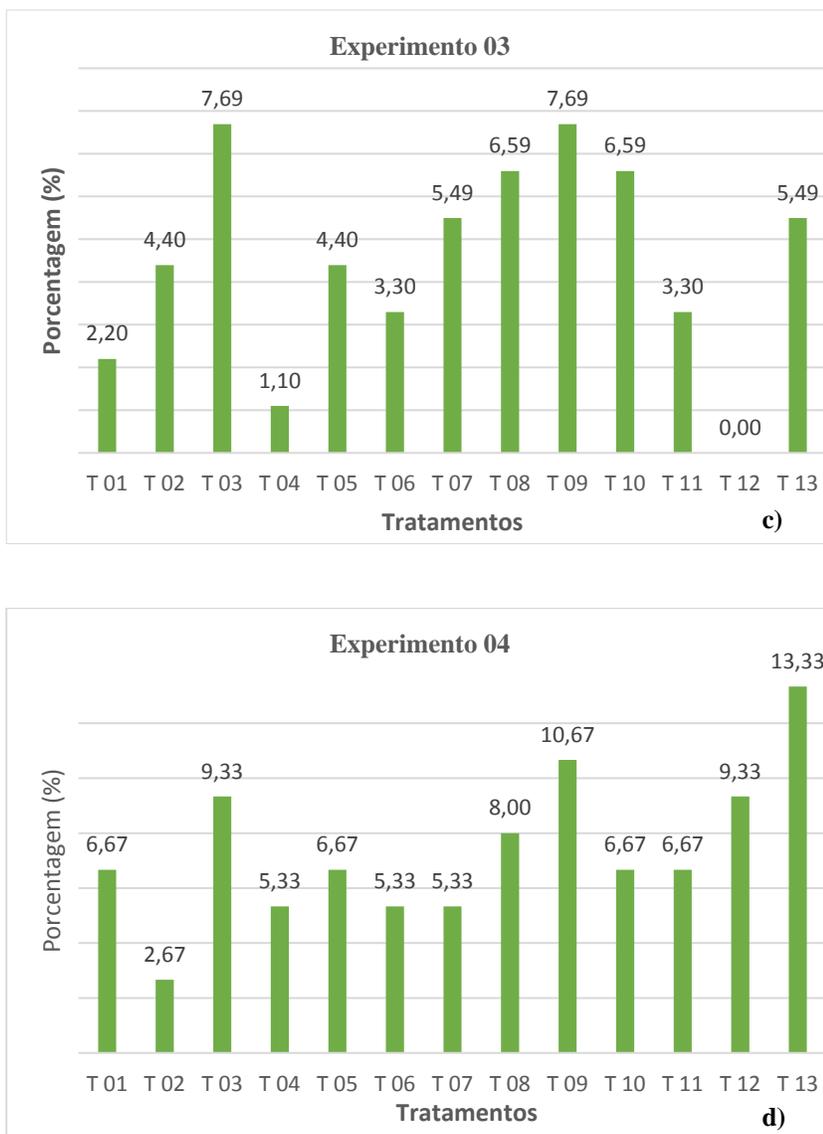
Figura 13 (a, b, c, d) - Efeito da inoculação de estirpes de *Azospirillum spp.*, sobre a taxa de germinação de sementes do BRS Caimbé, em papel Germitest.

Legenda - Tratamentos: T01:CMS 2131; T02: CMS 18; T03: CMS 2058; T 04: BDF 12; T05: BDF 23; T06: CMS 05; T07: CMS 2142; T08: CMS 2153; T09: CMS 1630;T10: CMS 1626; T11: BDF 145.1; T12: CMS 07;T13: CMS 11.



Continua.

Figura 13 (a, b, c, d) - Efeito da inoculação de estirpes de *Azospirillum spp.*, sobre a taxa de germinação de sementes do BRS Caimbé, em papel Germitest.



Fonte:Autor,2024.

4.4.2 Análise de variância individual do milho variedade BRS Caimbé, para avaliar o crescimento total, a parte aérea, a raiz, os pesos secos da parte aérea e das raízes, de plântulas de milho

Nos quatro experimentos com o milho variedade BRS Caimbé, verificou-se comportamento distinto em relação à resposta das estirpes testadas. Após serem testadas a homogeneidade dos dados, as análises de variância, para cada experimento (Tabela 06), foram realizadas para a

verificação dos parâmetros estudados: comprimento total da plântula (CT) (cm); parte aérea (cm); raiz (cm); pesos secos da parte aérea (PSPA) (g) e das raízes (PSR) (g).

Os resultados apontaram diferenças significativas entre os tratamentos para a maioria das variáveis analisadas, o que indicou desempenho diferenciado entre os tratamentos, nos quatro experimentos. Pode-se notar também, baixos valores para o coeficiente de variação (CV), dando maior confiabilidade aos dados obtidos.

Tabela 06 - Análise de variância individual para características de desenvolvimento: crescimento total (CT) (cm); parte aérea (cm); da raiz (cm); pesos secos da parte aérea (PSPA) (g) e das raízes (PSR) (g), de plântulas de milho, da cultivar BRS Caimbé, avaliadas sob efeito da inoculação com trezes estirpes de *Azospirillum spp.*, em cada experimento (experimento 01 - **E01**; experimento 02 - **E02**; e experimento 03 - **E03** e experimento 04 - **E04**), após sete dias de tratamento.

Causa Variação	GL	Quadrado Médio			
		CT E01	CT E02	CT E03	CT E04
Tratamento	13	139.771,53*	23.124,16*	30.264,83*	25703,40*
Resíduo	42	7706,61	4342,90	4490,78	2769,64
CV%		11,08	11,50	10,41	11,31
Média Geral		792,54	573,16	643,43	465,32
		PA E01	PA E02	PA E03	PA E04
Tratamento	13	8849,95*	2095,01*	2053,64*	2899,07*
Resíduo	42	1144,19	646,20	444,24	261,98
CV%		14,63	13,57	10,84	10,19
Média Geral		231,24	187,36	194,44	158,76
		R E01	R E02	R E03	R E04
Tratamento	13	84.665,7*	13.863,08*	20.871,66*	11764,80*
Resíduo	42	3911,9	2445,97	3202,15	1808,46
CV%		11,14	12,69	12,55	13,84
Média Geral		561,30	389,86	450,73	307,33
		PSPA E01	PSPA E02	PSPA E03	PSPA E04
Tratamento	13	0,092*	0,058*	0,041*	0,017 ^{ns}
Resíduo	42	0,018	0,017	0,016	0,008
CV%		4,07	4,25	4,01	3,18
Média Geral		3,35	3,12	3,15	2,85
		PSR E01	PSR E02	PSR E03	PSR E03
Tratamento	13	0,503 ^{NS}	0,024 ^{NS}	0,036 ^{NS}	0,011 ^{ns}
Resíduo	42	0,038	0,012	0,020	0,009
CV%		15,90	3,68	4,59	3,38
Média Geral		3,10	2,98	3,13	2,88

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste F. NS: Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Autor, 2024.

Em relação à variável peso seco das raízes, nos quatro experimentos, os resultados indicaram que não foram constatadas diferenças significativas, porém a média entre o peso seco do controle em relação aos tratamentos, variou de 2,92 a 3,31 gramas. Conforme relatado anteriormente devido a problemas técnicos com o aparelho germinador, o experimento 02

apresentou resultados divergentes em relação à todas as variáveis avaliadas, entretanto, esses dados foram suficientes para proporcionar diferenças significativas entre alguns tratamentos.

A Tabela 07, apresenta o resultado dos testes de comparação de médias Tukey ($P < 0,05$), para os parâmetros do crescimento total (CT), da parte aérea (PA), da raiz (R) e dos pesos secos da parte aérea (PSPA) e das raízes (PSR) (g).

Tabela 07 - Média dos valores das características do crescimento total das plântulas (cm), da parte aérea (cm), da raiz (cm), e dos pesos secos (g) da parte aérea e das raízes, do milho da cultivar BRS Caimbé, avaliado sob efeito da inoculação com as trezes estirpes de *Azospirillum spp.*, após sete dias de tratamento, nos quatro experimentos.

Tratamento	Crescimento Total (cm)			
	Experimento 01	Experimento 02	Experimento 03	Experimento 04
T01 - CMS 2131	750,10 bcde	608,75 abcd	560,62 de	590,50 a
T02 - CMS 18	614,87 de	564,00 bcd	766,25 ab	392,75 d
T03 - CMS 2058*	639,65 de	662,25 ab	644,37 bcde	383,12 d
T04 - BDF 12	916,00 abc	472,62 cd	696,12 abcd	390,50 d
T05 - BDF 23	885,87 abc	576,25 abcd	632,37 bcde	541,87 abc
T6 - CMS 5	550,85 ef	547,32 bcd	733,22 abc	416,87 bcd
T07 - CMS 2142	735,37 cde	505,87 bcd	834,25 a	410,12 cd
T08 - CMS 2153	1019,50 a	446,37 d	525,25 e	397,12 d
T09 - CMS 1630	1016,62 a	639,37 ab	583,62 cde	574,75 a
T10 - CMS 1626	956,70 ab	576,25 abcd	648,37 bcde	498,00 abcd
T11 - BDF 145.1	919,00 abc	612,87 abc	627,62 bcde	546,87 ab
T12 - CMS 7	826,00 abcd	732,62 a	583,00 cde	415,87 bcd
T13 - CMS 11	871,62 abc	560,62 bcd	609,87 bcde	555,12 a
T14 - CONTROLE	392,90 f	519,10 bcd	563,12 de	401,00 d

Tratamento	Parte Aérea (cm)			
	Experimento 01	Experimento 02	Experimento 03	Experimento 04
T01 - CMS 2131	237,30 abcd	177,37 ab	193,80 abc	193,50 a
T02 - CMS 18	186,17 de	182,17 ab	241,50 a	125,62 c
T03 - CMS 2058*	188,80 cde	217,50 ab	220,50 ab	143,37 bc
T04 - BDF 12	237,62 abc	154,37 b	205,37 abc	134,25 bc
T05 - BDF 23	239,85 abcd	173,95 b	202,37 abc	171,37 ab
T06 - CMS 5	181,75 de	179,45 ab	210,35 abc	135,50 bc
T07 - CMS 2142	227,05 bcde	161,75 b	207,00 abc	139,37 bc
T08 - CMS 2153	303,12 ab	162,12 b	182,12 bc	136,87 bc
T09 - CMS 1630	312,42 a	198,12 ab	182,62 bc	196,37 a
T10 - CMS 1626	263,57 abcd	194,92 ab	203,25 abc	172,75 ab
T11 - BDF 145.1	235,50 abcd	193,00 ab	168,75 bc	198,62 a
T12 - CMS 7	234,85 abcd	240,87 a	163,75 c	145,00 bc
T13 - CMS11	203,50 cde	198,37 ab	175,75 bc	190,12 a
T14 - CONTROLE	148,50 e	194,12 ab	165,00 c	140,00 bc

Tratamento	Raiz (cm)			
	Experimento 01	Experimento 02	Experimento 03	Experimento 04
T01 - CMS 2131	512,80 bcde	431,37 abc	366,82 cd	397,00 a
T02 - CMS 18	428,70 e	381,82 bcd	524,75 ab	268,75 cde
T3 - CMS 2058*	450,85 de	444,75 ab	423,87 bcd	242,00 e
T4 - BDF 12	642,87 abc	317,62 cd	489,25 abc	258,50 de
T5 - BDF 23	646,02 abc	404,55 abcd	431,87 bcd	370,37 abc
T6 - CMS 5	369,10 ef	367,87 bcd	522,87 ab	283,62 bcde
T7 - CMS 2142	508,32 cde	344,12 bcd	625,50 a	269,37 cde
T8 - CMS 2153	716,37 a	284,25 d	343,12 d	262,12 de

Continua.

Tabela 07 - Média dos valores das características do crescimento total das plântulas (cm), da parte aérea (cm), da raiz (cm), e dos pesos secos (g) da parte aérea e das raízes, do milho da cultivar BRS Caimbé, avaliado sob efeito da inoculação com as trezes estirpes de *Azospirillum spp.*, após sete dias de tratamento, nos quatro experimentos.

T9- CMS 1630	703,20 a	441,25 abc	401,00 bcd	378,37 ab
T10 -CMS 1626	693,12 a	388,82 abcd	445,12 bcd	325,25 abcde
T11- BDF 145.1	683,50 a	425,50 abc	468,12 bcd	350,50 abcd
T12 -CMS 7	591,22 abcd	512,00 a	421,87 bcd	270,87 cde
T13- CMS 11	668,12 ab	364,75 bcd	434,12 bcd	365,00 abcd
T14 -CONTROLE	244,05 f	349,47 bcd	411,87 bcd	262,12 de
Peso Seco da Parte Aérea (g)				
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
T1 - CMS 2131	3,35 abcd	3,15 bcd	3,03 ab	2,94 a
T2- CMS 18	3,26 bcd	3,15 bcd	3,34 a	2,80 a
T3- CMS 2058*	3,26 bcd	3,29 b	3,12 ab	2,80 a
T4- BDF 12	3,44 abc	2,87 d	3,31 ab	2,80 a
T5- BDF 23	3,44 abc	3,09 bcd	3,15 ab	2,85 a
T6- CMS 5	3,21 cd	3,15 bcd	3,27 ab	2,79 a
T7 -CMS 2142	3,30 abcd	3,06 bcd	3,21 ab	2,77 a
T8-CMS 2153	3,59 ab	2,95 cd	3,16 ab	2,84 a
T9- CMS 1630	3,64 a	3,23 bc	3,12 ab	2,93 a
T10 -CMS 1626	3,36 abcd	3,11 bcd	3,16 ab	2,91 a
T11- BDF 145.1	3,39 abcd	3,05 bcd	3,10 ab	2,95 a
T12 -CMS 7	3,45 abc	3,22 bc	3,09 ab	2,86 a
T13- CMS 11	3,20 cd	3,31 a	3,03 ab	2,94 a
T14 -CONTROLE	3,09 d	3,10 bcd	3,02 b	2,80 a
Peso Seco das Raízes (g)				
	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
T1 - CMS 2131	3,24 a	3,00 a	3,05 a	2,88 a
T2- CMS 18	3,06 a	2,98 a	3,21 a	2,75 a
T3- CMS 2058*	2,31 a	3,06 a	3,05 a	2,73 a
T4- BDF 12	2,51 a	2,97 a	3,21 a	2,77 a
T5- BDF 23	3,43 a	2,99 a	3,13 a	2,91 a
T6- CMS 5	2,91 a	2,97 a	3,09 a	2,81 a
T7 -CMS 2142	3,14 a	2,92 a	3,30 a	2,79 a
T8-CMS 2153	3,59 a	2,85 a	3,08 a	2,82 a
T9- CMS 1630	3,54 a	3,01 a	3,13 a	2,87 a
T10 -CMS 1626	3,26 a	2,97 a	3,08 a	2,80 a
T11- BDF 145.1	3,29 a	3,11 a	3,03 a	2,85 a
T12 -CMS 7	3,25 a	3,09 a	3,05 a	2,78 a
T13- CMS 11	3,18 a	2,86 a	3,27 a	2,84 a
T14 -CONTROLE	2,84 a	2,89 a	3,04 a	2,77 a

*Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de média Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autor, 2024.

Na primeira experimentação, todos os tratamentos apresentaram maior crescimento total do que o controle (não inoculado), sendo que a diferença entre o melhor tratamento (T08) e o controle (T14) foi de 61,47%, no experimento 02, apenas um tratamento (T12) diferiu estatisticamente do controle, com diferença de 29,14%, e o tratamento T08 foi estaticamente igual ao controle,

diferindo-se do experimento 01, que apresentou uma das melhores respostas dessa variável para inoculação, e também uma das estirpes que mais produziram AIA.

O experimento 03 apontou que três tratamentos (T07, T06 e T02) apresentaram diferenças em relação ao T14, o que representou uma diferença média de 27,84%, e os tratamentos T01 e T08 apresentaram médias inferiores ao controle. No quarto experimento, os tratamentos T01, T09 e T13 foram superiores a todos os tratamentos, dois tratamentos tiveram médias inferiores em relação ao controle com exceção dos tratamentos T01, T09 e T13, T05 e do T11, todos os restantes foram estaticamente iguais.

Para a variável parte aérea (PA), novamente ocorreram respostas diversas dos tratamentos nos experimentos, para o experimento 01 obteve-se que dos quatorze tratamentos, apenas oito tratamentos (T01, T04, T05, T08, T09, T10, T11 e T12) diferiram estatisticamente do controle, as médias apresentadas, por estes cinco tratamentos que não diferiram, foram respectivamente, (186,17; 188,90; 181,75; 227,05; 203,50 cm) e o controle (148,50 cm), o que evidencia um bom crescimento do sistema aéreo do material inoculado.

No experimento 02, não houve diferença estatística entre os tratamentos, e alguns apresentaram crescimento inferior da parte aérea comparado ao não inoculado. No experimento 03, somente dois tratamentos foram superiores ao controle (T02 e T03), e o T12 exibiu média inferior ao T14. Na quarta experimentação, os tratamentos T01, T09, T11 e T13 diferiram do controle, e os tratamentos T02, T04, T06 e T07 apresentaram médias inferiores ao tratamento controle.

A comparação das médias para a raiz (R), no experimento 01, apontou que todas as médias dos tratamentos são maiores do que a testemunha. Nos experimentos 02 e 03, apenas o T12 e o T07 foram superiores. Já no experimento 04, o tratamento 01 foi superior aos demais tratamentos. Estudos que utilizaram bactérias *Azospirillum spp.* em culturas importantes, como o milho, mostraram que a inoculação altera a morfologia das raízes, aumentando o número de raízes laterais e melhorando a absorção de nutrientes (Hungria, 2010).

Para o peso seco da parte aérea (PSPA), no experimento 01, cinco tratamentos foram melhores do que o material não inoculado, resultados que coincidem com dados já mencionados para variável comprimento da parte aérea. Os tratamentos T01, T10 e T11 não foram significativos estatisticamente, apresentando médias de 3,35g; 3,36g e 3,39g, respectivamente, enquanto que o controle teve média de 3,09 g. Para o experimento 02, apenas o T13 foi superior em relação ao tratamento T14, o mesmo ocorreu no experimento 03, porém com um tratamento diferente, o T02.

No experimento 04, mesmo não havendo diferença estatística entre todos os tratamentos para a variável do peso seco da parte aérea, os tratamentos T01, T09, T11 e T13 apresentaram maiores valores representando uma diferença de aproximadamente de 5,35 % de biomassa em relação ao tratamento não inoculado. A variável peso seco de raiz não evidenciou diferença significativa em nenhum dos quatro experimentos (dados não mostrados), porém ao avaliar-se os valores encontrados no experimento 01, os tratamentos T08 e T09 tiveram uma diferença de 26,4% de massa seca em relação ao controle. Nos demais experimentos, a diferença de biomassa variou de 6,9% (experimento 02), 8,5% (experimento 03) e 2,8% (experimento 04).

As estirpes CMS 11 e CMS 1630 apresentaram bons índices na maioria dos experimentos, ressalta-se que essas bactérias, na análise de AIA (auxina), foram uma das quais que mais produziram. Esse fitohormônio está diretamente relacionado ao desenvolvimento radicular, favorecendo o crescimento e a proliferação de pelos radiculares, o que permite uma maior exploração do solo, com melhoria da absorção de água e de nutrientes resultando em um melhor crescimento das plantas (Hungria, 2011).

4.4.3 Análise de variância do Teste de Germinação e das variáveis verificadas no milho híbrido DKB390RR2, inoculado com *Azospirillum spp.*

O resumo da análise de variância com o milho híbrido DKB390RR2, é demonstrado na Tabela 09, em que houve significância dos parâmetros crescimento total (CT) das plântulas, comprimento da parte aérea e da raiz, porém, as variáveis pesos secos da parte aérea e das raízes não foram significativos. Os coeficientes de variação foram baixos para todas as variáveis, indicando boa precisão no desenvolvimento do experimento. Com esse material, as estirpes foram testadas uma única vez, necessitando de mais experimentos para possibilitar inferir sobre a reprodutibilidade dos dados.

Tabela 08 - Análise de variância para as características de desenvolvimento: crescimento total (CT) (cm) das plântulas; da parte aérea (PA) (cm); da raiz (R) (cm); dos pesos secos da parte aérea (PSPA) (g) e das raízes (PSR) (g), do milho híbrido DKB390RR2, avaliado sob efeito da inoculação com as treze estirpes de *Azospirillum spp.*, após sete dias de tratamento.

Causa Variação	GL	Quadrado Médio				
		CT	PA	R	PSPA	PSR
Tratamento	13	11338,01*	2435,37*	8286,43*	0,022 ^{ns}	0,0173 ^{ns}
Resíduo	42	4731,11	574,28	2992,55	0,0098	0,024
CV%		7,59	9,96	8,19	2,96	4,40
Média Geral		906,78	240,51	668,11	3,34	3,58

*significativo e NS: Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte: Autor, 2024.

A Tabela 09, demonstra o resultado dos testes de comparação de médias Tukey ($P < 0,05$) para os parâmetros avaliados.

Tabela 09 – Média dos valores das características do crescimento total (CT), das plântulas, da parte aérea (PA), da raiz @, do milho híbrido DKB390RR2, avaliado sob efeito da inoculação com as trezes estirpes de *Azospirillum spp.*, após sete dias de tratamento.

Tratamentos	G (%)	CT (cm)	PA (cm)	R(cm)
T01 – CMS 2131	97 d	919,25 ab	225,62 b	692,37 ab
T02 – CMS 18	100 a	850,62 ab	228,00 b	622,62 ab
T03 – CMS 2058*	99 b	855,25 ab	224,75 b	630,50 ab
T04 – BDF 12	100 a	951,25 ab	222,87 b	728,37 a
T05 - BDF 23	95 e	795,62 b	218,12 b	579,62 b
T06 – CMS 5	98 c	899,37 ab	233,75 b	705,00 ab
T07 – CMS 2142	100 a	949,37 ab	228,37 b	719,00 a
T08 – CMS 2153	97 d	959,12 ab	248,50 b	710,62 ab
T09 – CMS 1630	97 d	899,37 ab	242,25 b	657,12 ab
T10 – CMS 1626	98 c	855,87 ab	231,12 b	624,75 ab
T11 – BDF 145.1	98 c	915,62 ab	253,75 b	657,50 ab
T12 – CMS 7	95 e	955,00 ab	255,12 b	721,87 a
T13 – CMS 11	98 c	976,25 a	316,25 a	660,00 ab
T14 – CONTROLE	95 e	873,62 ab	238,75 b	644,25 ab

*Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de média Tukey ($p < 0,05$).

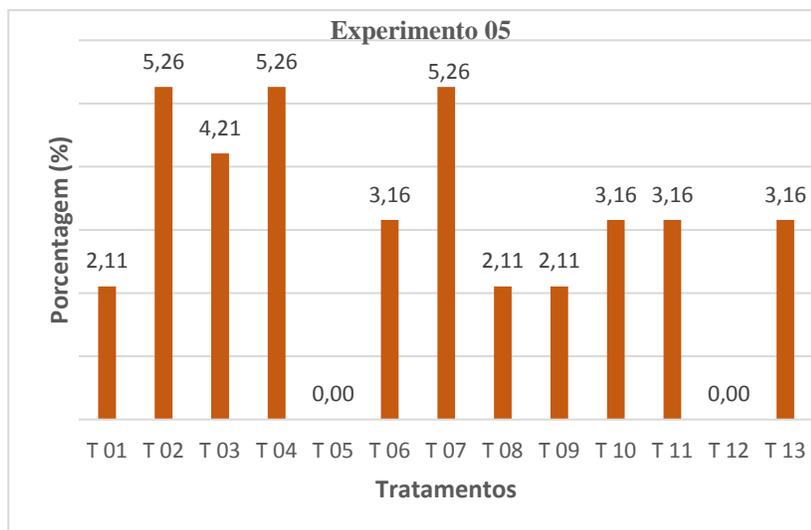
Fonte: Autor, 2024.

O estudo comparativo entre as médias dos tratamentos, revelou que no experimento 05, realizado com o híbrido DKB390RR2, a maioria do material inoculado apresentou índices de germinação superiores a 95%. Apenas os tratamentos T05 e T12 não diferiram estatisticamente do controle.

A Figura 14, apresenta o efeito da inoculação em comparação ao controle, em que as estirpes CMS18, BDF12 e CMS2142 tiveram um aumento de 5,26% de germinação, as outras estirpes variaram entre 2,11 a 4,21 % em relação ao controle, e apenas duas estirpes apresentaram o mesmo índice de germinação do controle.

Figura 14 - Efeito da inoculação de estirpes de *Azospirillum spp.*, sobre a taxa de germinação de sementes do híbrido DKB390RR2, em papel Germitest.

Legenda - Tratamentos: T01:CMS 2131; T02: CMS 18; T03: CMS 2058; T 04: BDF 12; T05: BDF 23; T06: CMS 05; T 07: CMS 2142; T08: CMS 2153; T09: CMS 1630; T10: CMS 1626; T11: BDF 145.1; T12: CMS 07;T13: CMS 11.



Fonte:Autor,2024.

Em relação à variável crescimento total, doze dos trezes tratamentos não diferiram estatisticamente, do tratamento controle (não inoculado), e o tratamento 05 apresentou médias menores do que o do controle. Avaliando a maior média em relação ao crescimento total, (T13) em comparação ao controle obteve uma diferença de 10,5%, o que pode representar no campo, plantas melhores desenvolvidas, com maior capacidade de absorção de água e de nutrientes, e esse resultado alinha-se à avaliação da parte aérea, pois apenas o tratamento 13 diferiu estaticamente do controle, representando uma diferença de 24,5 % entre as médias, porém não apresentou a mesma resposta na avaliação da raiz.

Referente ao comprimento da raiz, os tratamentos T04, T07 e T12 distinguiram-se da testemunha, os demais tratamentos foram estatisticamente iguais, e a diferença da maior média para o controle foi de 11,5%. No trabalho de Kuss *et al.* (2008), foram obtidos resultados semelhantes na cultura do arroz, onde, na avaliação de três cultivares, as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum* não afetaram o comprimento da raiz.

Alguns desses efeitos negativos podem ser em razão de que algumas estirpes proporcionaram um aumento do sistema radicular, em contrapartida, ocasionaram um menor desenvolvimento da parte aérea, principalmente porque um dos benefícios proporcionados por

esses microrganismos, em gramíneas, é a produção de fitohormônios que auxiliam no desenvolvimento radicular (Dobbelaere *et al.*, 2003; Sala *et al.*, 2007).

Estudos com o gênero *Azospirillum* demonstram a biossíntese de fitohormônios, sobretudo auxinas, giberelinas e citocininas, e este aspecto fitoestimulante pode favorecer o crescimento e o desenvolvimento das plantas (Martínez-Morales *et al.*, 2003). Porém o desbalanço entre auxina e citocinina, na planta como um todo, pode desfavorecer o crescimento total da planta, assim, com a maior concentração de auxinas há indução ao crescimento radicular, ao passo que, a maior concentração de citocinina favorece o crescimento da parte aérea (Spaepen *et al.*, 2007).

Contudo, a performance analisada refere-se às condições controladas, alguns autores corroboram que mesmo em condições controladas, algumas pesquisas têm apresentado respostas discrepantes em relação à associação de milho e à bactérias diazotróficas, fator que, provavelmente, tem limitado a consolidação de muitos inoculantes comerciais (Dobbelaere *et al.*, 2001).

Pesquisas apontam que são comuns respostas contraditórias de inoculação com bactérias diazotróficas endofíticas em culturas de espécies de gramíneas, o que justifica investimentos em estudos para aprimorar a tecnologia desses inoculantes (Sala *et al.*, 2007).

No trabalho de Araújo *et al.* (2013), 35 genótipos de milho (híbridos simples, triplos, duplos e variedades) foram testados na ausência e na presença de inoculação das sementes, com *Herbaspirillum seropedicae* (bactéria diazotrófica), com o objetivo de verificar se a amplitude genética influencia na interação do milho com bactérias.

Os resultados apresentaram que alguns cultivares responderam positivamente ao inoculante, e outra parte negativamente, ou seja, houve incremento de matéria seca e crescimento para a maioria dos híbridos, enquanto que para milho variedade BRS Caimbé, esses resultados não foram tão expressivos.

Na pesquisa de Jales *et al.* (2021), ao avaliarem o crescimento do milho inoculado com estirpes de *Azospirillum brasilense*, submetido a dois níveis de N, e em duas condições hídricas, não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos, a inoculação não alterou a morfofisiologia e o crescimento inicial do milho, independentemente dos níveis de N, das condições hídricas e das estirpes testadas, neste trabalho os autores Jales *et al.* (2021) lidaram com as estirpes CMS11 e CMS1626.

Um ponto a salientar, é que para cada experimento são preparados inóculos novos. Isso significa que uma colônia isolada é selecionada e utilizada para preparar o inóculo, em meio

líquido, o qual é ativado a 28°C. No entanto, ao final, todos os inóculos são ajustados para uma densidade óptica (OD) de 1×10^8 UFC (unidades formadoras de colônia), de acordo com a recomendação técnica para inoculantes da Legislação Brasileira, ou seja, a cada experimentação foi utilizado um novo inoculante, o que pode ter contribuído para variação de respostas à inoculação. É importante ressaltar, que diferentes cepas de *Azospirillum* podem ter diferentes níveis de eficácia na promoção do crescimento das plantas (Hungria, 2011).

Portanto, resultados divergentes da inoculação do milho, com variadas estirpes de *Azospirillum*, podem ser atribuídos à diferentes características genéticas e fisiológicas desses microrganismos, bem como às interações complexas entre as bactérias e as plantas hospedeiras. Essas diferenças destacam a importância de selecionar cuidadosamente as cepas de *Azospirillum*, para maximizar os benefícios da inoculação no crescimento e no desenvolvimento das plantas, levando em consideração as condições específicas do solo e da cultura (Hungria, 2011).

4.4.4 Análise conjunta dos experimentos

Para a realização da análise de variância conjunta, é preciso que os experimentos possam ser agrupados sem dificuldades, assim, é necessário que os quadrados médios residuais obtidos na análise individual dos experimentos não sejam muito diferentes entre si, ou seja, que tenham suas variâncias dos erros experimentais homogêneas, atendendo a pressuposição para a realização da análise de variância conjunta (Pimentel Gomes, 2000).

Dessa maneira, foi aplicado o Teste F- máximo de Hartley, o qual consiste em dividir o maior valor do Quadrado Médio do Resíduo (QMR), pelo menor valor do QMR. Se o valor calculado (F_c) obtido for menor que F tabelado, conclui-se que os erros são homogêneos, podendo-se realizar a análise conjunta (Banzatto e Kronka, 2006).

O teste da relação dos QMR, dos quatro experimentos, revelou variâncias homogêneas ($1,12 < 3,16$), permitindo assim, a análise conjunta dos experimentos do milho BRS Caimbé, e do híbrido DKB390RR2. A Tabela 10, apresenta o resumo da análise de variância conjunta, para os quatro experimentos, onde houve efeitos significativos a 5% para os fatores isolados, não ocorrendo interação significativa entre os fatores genótipos e os tratamentos. O agrupamento das médias das variáveis verificadas, na análise conjunta, pelo teste de Tukey, está apresentado na Tabela 11.

Tabela 10 - Análise de variância conjunta para características: crescimento total (CT); parte aérea (PA); raiz (R) (cm); e, pesos secos da parte aérea e das raízes (PSPA) (PSR), (g), de plântulas de milho BRS Caimbé e híbrido DKB 390 avaliadas sob efeito da inoculação com estirpes de *Azospirillum spp.*, nos quatro experimentos.

C.V.	GL	QM				
		CT	PA	R	PSPA	PSR
Tratamento	13	43.072,90*	2262,31 ^{ns}	26.450,07*	0,039 ^{ns}	0,057*
Genótipo	1	2.300.496*	5507,05*	1.648.459*	0,764*	9,106*
T x G	13	17.753,35 ^{ns}	2755,38 ^{ns}	13.849,70 ^{ns}	0,025 ^{ns}	0,032 ^{ns}
Resíduo	191	21.378,08	1609,00	12813,38	0,0033	0,034
CV%		19,9	18,7	21,76	5,62	5,72
Média Geral		731,92	213,46	520,09	3,24	3,23

Número de observações: 219

*significativo a 5% de probabilidade pelo teste F, NS: Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte:Autor,2024.

Ao analisar o crescimento total das plântulas, notou-se que as melhores respostas foram as dos tratamentos T09, T11, T12 e T13, e o genótipo mais responsivo à inoculação foi o do híbrido. Para a comparação das médias do parâmetro comprimento da parte aérea, verificou-se que não houve diferenças significativas entre os tratamentos, porém o milho híbrido apresentou médias superiores em relação ao milho variedade (Tabela 11).

Em relação à variável comprimento das raízes, os tratamentos T11, T12 e T13 se destacaram dos demais, apresentando médias de 558,65, 569,20 e 562,7 cm, respectivamente. O tratamento controle apresentou média de 415,1cm, representando uma diferença de aproximadamente 25,6% em relação a esses tratamentos. Os demais tratamentos não diferiram do material não inoculado.

Para a variável peso seco da parte aérea, todos os tratamentos foram estatisticamente iguais, sendo que a análise do peso seco da raiz, apontou que o tratamento mais responsivo foi o T9 (Tabela 11). O genótipo DKB390RR2 respondeu melhor em todas as variáveis testadas.

Diante do exposto, o resultado da análise conjunta dos experimentos 01,02, 03 e 05, demonstraram que a presença das bactérias foi capaz de incrementar significativamente, as variáveis avaliadas, na fase inicial do desenvolvimento das plântulas de milho. No entanto, são necessários novos experimentos para obter respostas conclusivas quanto à eficiência das condições experimentais (incubadora), sobre a resposta da inoculação, e determinação dentre esse grupo de estirpes de *Azospirillum spp.* avaliadas, quais são as mais promissoras para o desenvolvimento de bioinsumos.

Tabela 11 - Média dos valores das características: crescimento total (CT); parte aérea (PA); raiz (R); e, pesos secos da parte aérea (PSPA) e das raízes (PSR), dos genótipos de milho (BRS Caimbé e híbrido DKB390RR2), inoculados com as estirpes de *Azospirillum spp.*

Crescimento Total															
-----cm-----															
Cultivar	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	T11	T12	T13	T14	Média
Variedade	639,82	648,37	648,75	695,08	698,16	610,46	691,83	663,70	746,54	727,10	719,83	711,68	718,30	485,06	671,85B
Híbrido	919,25	850,62	855,25	951,25	795,62	938,75	949,37	959,12	899,37	885,87	915,62	955,00	976,25	873,62	906,78A
Média	709,8ab	698,9ab	700,38ab	759,1ab	722,5ab	692,5ab	692,5ab	737,5ab	784,7a	759,3ab	768,7a	781,2a	792,0a	588,6b	
Parte Aérea															
-----cm-----															
Cultivar	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	T11	T12	T13	T14	Média
Variedade	202,82	203,28	208,93	211,12	205,39	190,51	198,60	215,79	213,39	220,58	199,08	204,54	194,45	167,17	204,16B
Híbrido	225,62	228,0	224,75	22,87	218,12	233,75	228,37	248,50	242,25	231,12	253,75	255,1	316,25	237,75	240,51A
Média	208,5a	209,4a	212,8 a	214,0a	208,5a	201,3a	206,0a	223,9a	234,1a	223,2a	212,7a	218,9a	229,2a	186,2a	
Raiz															
-----cm-----															
Cultivar	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	T11	T12	T13	T14	Média
Variedade	437,00	445,09	439,82	483,25	494,15	419,95	492,65	447,91	515,15	509,02	525,70	508,19	523,85	331,80	469,24B
Híbrido	692,37	622,62	630,50	728,37	579,62	705,00	719,00	710,62	657,12	624,75	657,50	721,87	660,00	644,25	668,11A
Média	500,8ab	489,4ab	487,4ab	544,5ab	515,5ab	491,2ab	549,2ab	513,5ab	550,6ab	537,9ab	558,65a	569,2a	562,7a	415,1b	
Peso Seco da Parte Aérea															
-----g-----															
Cultivar	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	T11	T12	T13	T14	Média
Variedade	3,17	3,25	3,22	3,20	3,23	3,21	3,19	3,23	3,33	3,21	3,18	3,26	3,16	3,06	3,21B
Híbrido	3,30	3,30	3,25	3,31	3,47	3,23	3,28	3,23	3,38	3,37	3,34	3,43	3,48	3,34	3,34A
Média	3,20a	3,26a	3,23a	3,23a	3,29a	3,24a	3,21a	3,23a	3,34a	3,25a	3,22a	3,31a	3,25a	3,13a	
Peso Seco das Raízes															
-----g-----															
Cultivar	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	T11	T12	T13	T14	Média
Variedade	3,10	3,10	3,06	3,20	3,18	2,99	3,12	3,14	3,22	3,10	3,14	3,13	3,13	2,92	3,11B
Híbrido	3,56	3,57	3,62	3,60	3,46	3,63	3,69	3,60	3,58	3,57	3,46	3,59	3,64	3,51	3,58A
Média	3,21ab	3,22ab	3,20ab	3,30ab	3,25ab	3,15ab	3,26ab	3,25ab	3,31a	3,22ab	3,22ab	3,26ab	3,27ab	3,07b	

Legenda - Tratamentos:T1: CMS 2131; T2: CMS 18; T3: CMS 2058; T4: BDF 12; T5: BDF 23; T6: CMS 05; T7: CMS 2142; T8: CMS 2153; T9: CMS 1630; T10: CMS 1626; T11: BDF 145.1; T12: CMS 07;T13: CMS 11 e T14: Controle.

*Valores de médias seguidos de letras distintas, minúscula na coluna e maiúscula na linha, diferem entre si pelo teste de média Tukey ($p < 0,05$)

Fonte:Autor,2024.

4.5 Análise de variância do Teste de Emergência, em canteiro e em campo, com o milho variedade BRS Caimbé, em resposta à inoculação com estirpes de *Azospirillum spp.*

Os resultados do experimento em canteiro, conduzido na unidade da Embrapa e do experimento realizado na área de campo da UFSJ, mostraram, através da análise de variância, que não houve diferenças significativas entre as médias das variáveis avaliadas (conforme apresentado nas Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 - Resumo da Análise de variância para as características: parte aérea (PA) (cm); peso seco da parte aérea (PSPA) (g) e das raízes (PSR) (g); emergência de plântulas (EP) (%); índice de velocidade de emergência (IVE); e, tempo de emergência (TE), das plantas de milho da variedade BRS Caimbé, avaliado sob efeito da inoculação com estirpes de *Azospirillum spp.*, após 20 dias de tratamento.

Causa Variação	GL	Quadrado Médio					
		PA (cm)	PSPA (g)	PSR (g)	EP -----(%)-----	IVE	TE
Tratamento	13	824,96 ^{ns}	0,944 ^{ns}	0,004 ^{ns}	23,49*	2,90 ^{ns}	0,008 ^{ns}
Bloco	04	7295	76,14	0,549	244,09	23,13	0,015
Resíduo	39	455,62	0,534	0,040	23,37	3,12	0,006
Média Geral		392,84	12,28	3,83	93,21	26,03	8,31

NS: Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte:Autor,2024.

Tabela 13 - Resumo da Análise de variância para características: parte aérea (PA) (cm); peso seco da parte aérea (PSPA) (g) e das raízes (PSR) (g); emergência de plântulas (EP) (%); índice de velocidade de emergência (IVE); e, tempo de emergência (TE), das plantas de milho da variedade BRS Caimbé, avaliado sob efeito da inoculação com estirpes de *Azospirillum spp.*, após 20 dias de tratamento, no plantio sistema orgânico.

Causa Variação	GL	Quadrado Médio					
		PA (cm)	PSPA (g)	PSR (g)	EP (%)	IVE	TE
Tratamento	01	2400,00 ^{ns}	12,47 ^{ns}	0,96 ^{ns}	56,05 ^{ns}	1,83 ^{ns}	0,007 ^{ns}
Bloco	01	195,87	1,48	0,79	60,84	15,20	0,041
Resíduo	02	24291,3	46,16	4,17	3,85	0,36	0,002
Média Geral		628,00	11,39	3,33	82,68	25,08	8,51

NS: Não significativo a 5% de probabilidade pelo teste F.

Fonte:Autor,2024.

Na avaliação de emergência de plântulas em canteiro, para o índice de velocidade de emergência e o tempo de emergência, não foram obtidas diferenças entre os tratamentos testados. A emergência de plântulas no canteiro, teve média de 93%, valor muito próximo à média de germinação em condições ideais, que foi de 95 %. Nesse experimento, todos os tratamentos inoculados aumentaram significativamente a taxa de emergência de plântulas, em relação ao controle (Tabela 12).

Os aumentos foram da ordem de 1,11 a 7,78%, superiores ao tratamento controle (Figura 15). Esses resultados são expressivos, dada a importância do ambiente na condição experimental em canteiro, e corroboram com os dados obtidos no Teste de Germinação, em papel Germitest (Figura 13 - a, b, c e d). Não é recomendado o uso de lotes de sementes de milho com taxa de germinação inferior a 90% (Andreoli *et al.*, 2002).

No tratamento controle a taxa de germinação estava dentro da recomendação com base na Regra de Análises de Sementes (Brasil, 2009). Porém com a inoculação esse percentual chegou a 97% em três tratamentos (T03, T08 e T11 - Tabela14).

Tabela 14 - Efeito da inoculação de treze estirpes de *Azospirillum spp.*, sobre a taxa de emergência, em canteiro, do milho variedade BRS Caimbé, avaliado após dez dias do plantio.

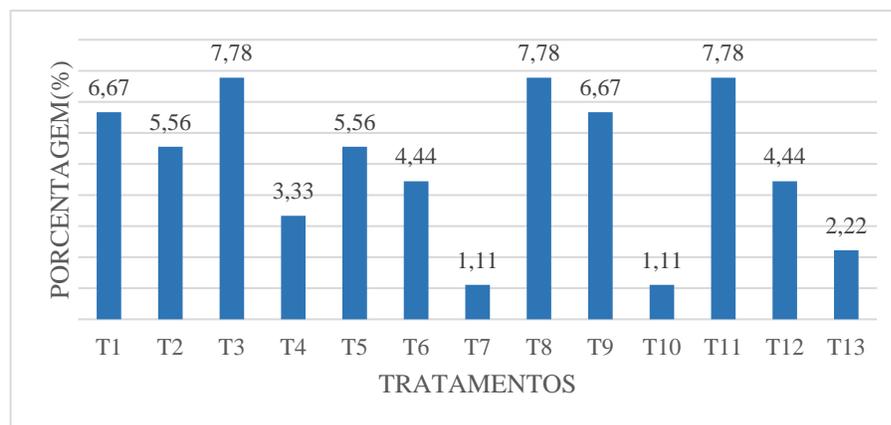
Tratamento	Estirpes	Emergência de plântula %
T01	CMS 2131	96 b
T02	CMS 18	95 c
T03	CMS 2058	97 a
T04	BDF 12	93 e
T05	BDF 23	95 d
T06	CMS 5	94 c
T07	CMS 2142	91 g
T08	CMS 2153	97 a
T09	CMS 1630	96 b
T10	CMS 1626	91 g
T11	BDF 145.1	97 a
T12	CMS 7	94 d
T13	CMS 11	92 f
T 14	CONTROLE	90 h

*Valores seguidos de mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de média Tukey ($p < 0,05$).

Fonte:Autor,2024.

Figura 15 - Efeito da inoculação de estirpes de *Azospirillum spp.*, sobre a taxa de emergência de plântulas de milho variedade BRS Caimbé, em canteiro.

Legenda - Tratamentos: T01: CMS 2131; T02: CMS 18; T03: CMS 2058; T 04: BDF 12; T05: BDF 23; T06: CMS 05; T07: CMS 2142; T08: CMS 2153; T09: CMS 1630;T10: CMS 1626; T11: BDF 145.1; T12: CMS 07;T13: CMS 11.



Fonte:Autor,2024.

Embora não tenha sido verificada diferença estatística significativa, para as variáveis analisadas, o desenvolvimento das plântulas, no experimento em canteiro, evidenciou diferenças de 11,8 % do comprimento da parte aérea em relação ao controle.

Magalhães e Durães (2002), apontam que em condições ideais de temperatura e de umidade relativa do ar, a emergência das plantas ocorre geralmente entre 4 e 5 dias, após a semeadura. Nesse trabalho o material avaliado iniciou a emergência a partir do quarto dia, após a semeadura em ambos os experimentos.

O tempo de emergência no canteiro teve média de 8,3 dias, e a média do índice de velocidade de emergência foi de 26,03. O índice de velocidade de emergência é um parâmetro utilizado na avaliação da qualidade das sementes e no desempenho das plantas, durante o processo de germinação e de emergência no campo. Por meio dessa avaliação, é possível conhecer a rapidez e a uniformidade com que as plântulas emergem, após o plantio, concedendo aos agricultores dados fundamentais sobre o desenvolvimento das culturas (Marcos Filho, 2015).

Os tratamentos T01, T02, T03, T04, T05, T06, T08, T09, T10, T11, T12 e T13, através do IVE, foram classificados como mais vigorosos, enquanto os tratamentos T07 e T14, com baixo vigor (dados não mostrados). Plantas mais vigorosas podem competir de forma mais eficiente, especialmente em condições de estresse, o que influencia diretamente o estabelecimento da cultura.

Outro aspecto relevante a ser mencionado, é que não foram realizadas análises químicas dos solos, dos dois canteiros utilizados para montagem do experimento. Segundo informações levantadas com o setor responsável pela manutenção da área, trinta dias antes da montagem do experimento, os canteiros passaram por um processo de calagem, e o solo do canteiro 01 era proveniente de solos retirados de vasos, que haviam sido adubados em outros experimentos. Já o solo do canteiro 02, não foi renovado, estando sem plantio há aproximadamente um ano.

Em relação à avaliação dos parâmetros na fase inicial, do experimento orgânico, na área de campo da UFSJ, mesmo que as variáveis não tenham apresentado diferenças estatísticas significativas, na avaliação de emergência em campo, a média do tratamento inoculado (T01: 85,74%) foi superior a do material não inoculado (T02: 79,63%).

O tratamento inoculado apresentou índice de velocidade de emergência de plântula de 25,64, enquanto que o tratamento não inoculado foi de 24,53, podendo T01 ser considerado mais vigoroso do que o tratamento não inoculado, mesmo que essa diferença seja pequena, no campo,

poderia expressar uma maior produtividade. O tempo de emergência do tratamento T01 foi de 8,5 dias, e T2 8,4 dias, estatisticamente iguais.

Os sulcos abertos para a semeadura dos tratamentos, não apresentavam uma profundidade padronizada, e o solo continha numerosos agregados volumosos, o que provavelmente contribuiu para a elevação da profundidade de semeadura, e resultou no aumento do tempo médio de emergência, pois quanto mais profunda for a camada para plantio, maior será a resistência do solo à completa emergência da plântula, conseqüentemente, retardando o processo.

Outra interferência nos resultados de alguns parâmetros, refere-se à presença de formigueiros, e outros insetos, que fizeram o corte de muitas plântulas que haviam germinado. Entretanto, na composição das análises foram mantidas as leituras antecedentes aos episódios de interferência.

Para os valores de massa seca radicular e de parte aérea, as médias observadas, de massa seca para o sistema radicular, para T01 e T02, variaram entre 2,93 a 3,73 g, e para a parte aérea, 9,95 a 12,83 g, respectivamente. Esses resultados demonstram que mesmo não havendo diferenças significativas para estas variáveis, o tratamento não inoculado foi superior ao inoculado.

Nas observações diárias, pôde-se notar que os blocos 1 e 3 (que receberam inoculação) foram levemente afetados por sombreamento, em metade da área da parcela, até às 10:30 horas. Após esse horário, todas as parcelas tinham as mesmas condições experimentais. No entanto, esse fato pode ser um indicativo que houve prejuízo na emergência das plântulas e no desenvolvimento das mesmas.

Barbosa *et al.* (2022), realizaram um trabalho de pesquisa de meta-análise, onde avaliaram 60 estudos publicados, utilizando duas linhagens de *A. brasilense*, em 103 ensaios de campo, em 54 localidades no Brasil. A pesquisa apresentou resultados que reafirmam os benefícios da inoculação do milho, sendo que o uso das estirpes de *Azospirillum brasilense* gerou aumento médio de 5,4% na produtividade de grãos, além de aumentar: 4,3% no teor de N, na folha; 3,6% de N, nos grãos; e 12,1%, no crescimento das raízes das plantas.

Os maiores benefícios da inoculação de *Azospirillum brasilense*, em milho, ocorrem na faixa de produtividade de grãos de até 3000 kg/ha (+21%), nas faixas acima de 3000 a 12000 kg/ha a resposta é da ordem de +1,5 à + 6,2%, respectivamente. E essa resposta varia com a dose de N utilizada, com a forma de inoculação e com a formulação, entre outros fatores (Barbosa *et al.*, 2022).

Nos experimentos não foram utilizadas nenhuma forma de adubação, todo processo ocorreu com a reserva de macro e micronutrientes já existentes no solo, o que pode ter contribuído para a ausência de diferenças significativas entre os tratamentos, uma vez que, os teores dos nutrientes presentes no solo, foram suficientes para inibir a interação entre planta e bactéria.

Hungria *et al.* (2022), estudaram os efeitos da inoculação com estirpes Ab-V5 e Ab-V6, de *A. brasilense* e seus metabólitos, em características de raízes de milho. Foram avaliados resultados de 30 experimentos de campo, montados em 13 locais diferentes, por um período de 10 anos, visando investigar a viabilidade de substituir parcialmente o fertilizante nitrogenado, recomendado para a cultura do milho, sendo as respostas da inoculação positivas.

Segundo os autores, a inoculação de plantas que receberam 75% de fertilizante N, aumentaram significativamente o rendimento de grãos de milho, em torno de 4,6%, em comparação com ao material não inoculado. Embora não tenha havido diferença estatística, dos tratamentos inoculados com 75% de fertilizante, em relação aos não inoculados, que receberam o fornecimento total de 90 kg ha⁻¹ de N, os resultados indicaram a viabilidade de redução de 25% de fertilizante N devido aos efeitos, principalmente, na melhoria na arquitetura do sistema radicular devido aos fitohormônios, aumentando a eficiência do uso do fertilizante N (Hungria *et al.*, 2022).

Foi avaliado o pH do solo, dos canteiros 1 e 2, utilizados no experimento na Embrapa, em solução de cloreto de cálcio (CaCl₂ 0,01 mol/l). Os resultados apresentaram pH de 6,91 e de 6,99 respectivamente, e em água, o pH foi de 7,8 para ambos os canteiros. Salienta-se que a faixa ideal de pH para desenvolvimento de alguns microrganismos, se encontram entre 5,0 e 5,5, e valores muito acima ou abaixo prejudicam a sobrevivência desses microrganismos, podendo afetar consideravelmente a interação entre eles e as plantas (Wei *et al.*, 2020).

Alguns trabalhos, apontam que algumas estirpes de *Azospirillum spp.* são prejudicadas por elevada temperatura de exposição, e o sucesso da interação entre bactéria e planta depende de sua sobrevivência no solo, além da compatibilidade com a cultura inoculada. Ressalta-se que no experimento de campo, na UFSJ, a semeadura foi realizada pela manhã, porém a irrigação só foi estabelecida à tarde, e o solo no momento do plantio, estava com baixa umidade (seco). Condições ambientais como incidência solar, altas temperaturas, tipo de manejo, pH, presença de macro e micronutrientes, e teor de matéria orgânica, influenciam no êxito da inoculação (Martinez-Viveros *et al.*, 2010).

Reis (2007), aponta que essas variações de resultados em pesquisas com *Azospirillum spp.*,

estão ligadas às interações edafoclimáticas e à interações com a biota do solo, além de fatores ligados à bactéria, como por exemplo, o número ideal de células por semente, e a fisiologia da semente. A contagem do número de células, por planta, é um fator essencial, pois um resultado menos expressivo é indicativo de que possa estar ocorrendo uma falta de desenvolvimento das bactérias.

Além disso, nos solos, a capacidade competitiva das bactérias diazotróficas com outras bactérias da microbiota, somente é alta quando as condições são de baixa disponibilidade de N no ambiente (Hungria,2011). Isso ocorre porque a enzima nitrogenase é inibida na presença de formas combinadas de N (nitrato e amônia). Portanto, em solos que tenham a presença desses nutrientes, a inoculação pode ter respostas negativas da interação entre as bactérias e os genótipos (Döbbelaere *et al.*, 2003 apud Bergamaschi, 2006).

Uma possível explicação para esses resultados, nas duas experimentações, baseia-se na hipótese de que devido à grande oferta de nutrientes no solo, houve prejuízo na associação entre a planta e a bactéria, não ocorrendo fixação biológica e nem sequer, produção de fitohormônios (Hungria., 2011).

De acordo com Skonieski *et al.* (2017), a colonização de *Azospirillum spp.* é significativamente influenciada pelas condições ambientais e pela competição com outras estirpes e com microrganismos nativos do solo. Esses fatores podem explicar porque não foram observados efeitos significativos no desenvolvimento inicial das plantas de milho, dos experimentos de campo desse estudo.

Devido aos inúmeros benefícios proporcionados às plantas de milho, através da inoculação com bactérias de *Azospirillum spp.*, que é um microrganismo promotor de crescimento, é preciso avançar no conhecimento das relações de interações entre os microrganismos que se relacionam na rizosfera da planta hospedeira e seus impactos positivos sobre essas (Adesemoye *et al.* 2009).

Técnicas moleculares desempenham um papel crucial na formulação de inoculantes, por várias razões, pois auxiliam na identificação precisa dos microrganismos através do sequenciamento de DNA e da análise genômica. Assim, é possível selecionar microrganismos eficazes, de acordo com suas diversidades genética e funcional, e principalmente, é possível investigar as interações específicas entre os microrganismos e as plantas hospedeiras, resultando em um produto considerado fundamental para promover práticas agrícolas mais sustentáveis, produtivas e eficientes, reduzindo principalmente o impacto ambiental.

5 CONCLUSÕES

A inoculação, com as estirpes de *Azospirillum spp.*, proporcionou efeitos positivos sobre a taxa de germinação das sementes inoculadas, em todos os experimentos.

Para a variável crescimento total das plântulas de milho, na fase inicial, as melhores respostas foram obtidas com as estirpes CMS 2153 e CMS 1630 (experimento 01), CMS 7 (experimento 02), CMS 2142 (experimento 03) e CMS 11, CMS 1630 e CMS 2131 (experimento 04).

Na avaliação do comprimento da parte aérea, os melhores resultados nos Experimentos 01, 02 e 03 com o milho BRS Caimbé, foram respectivamente, CMS 1630, CMS 7, CMS 18, e no quarto experimento, as estirpes CMS 11 e CMS 1630, BDF 145.1 e CMS 2131.

Para comprimento de raízes, as estirpes mais responsivas foram, CMS 2153, CMS 1630, CMS 1626, BDF 145.1, CMS 7, CMS2142 E CMS 2131. E para produção de biomassa seca da parte aérea, foram as estirpes CMS1630, CMS 11 e CMS 18.

Na avaliação dos efeitos da inoculação, em sementes híbridas, a estirpe CMS 11 foi responsável pelos melhores resultados em relação a comprimento total das plântulas e comprimento da parte aérea, já para o desenvolvimento radicular, as estirpes BDF 12, CMS 2142 e CMS 7 foram as mais responsáveis. A análise conjunta dos quatro experimentos revelou que para todos os parâmetros avaliados, o genótipo híbrido foi o mais responsivo aos tratamentos, e as estirpes CMS 1630, BDF 145.1, CMS 7 e CMS 11, promoveram um melhor crescimento total das plântulas de milho, na fase inicial de crescimento.

A análise do dendrograma demonstrou que existe uma alta similaridade das bactérias, pois houve a formação de dois grandes grupos principais, e as estirpes CMS 2153 e CMS 1630 possuem máxima semelhança fenotípica.

Com base na análise de pesquisa BLAST-N, a identificação das sequências dos genes 16S rRNA e rpOD revelou o seguinte: para o sequenciamento com o gene 16S rRNA, as 11 estirpes avaliadas foram identificadas em cinco espécies distintas de *Azospirillum* (*Azospirillum formosense*, *Azospirillum brasilense*, *Azospirillum sp*, *Azospirillum argentinense* e *Azospirillum baldaniorum*).

As 12 estirpes avaliadas com o gene *rpOD*, foram identificadas como *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum argentinense*, e 75% desse material foi determinado como pertencente à espécie *Azospirillum argentinense*.

Todas as trezes estirpes de *Azospirillum spp.* produziram AIA, em meio de cultura suplementado com DL-triptofano, e as estirpes CMS 1630, CMS 2153, CMS 11 e BDF 145.1, foram as mais eficientes, respectivamente, quando comparadas às demais.

Não foi detectado formação de biofilme pelas estirpes testadas.

No ensaio realizado em canteiro, na Embrapa, e na área de campo da UFSJ, com genótipo variedade BRS Caimbé inoculado com as bactérias, não foram observados efeitos significativos para nenhuma variável testada, exceto para a emergência em campo.

REFERÊNCIAS

- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOPPER, J. W. (2009). Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 921-929.
- ALELO MICRO CONSULTAS. (2021); Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa); Seção "Linhagem"; Disponível em <https://am.cenargen.embrapa.br/amconsulta/linhagem?id=71423>; Acesso em 26/09/2024.
- ALEXANDRE, G. Chemotaxis in *Azospirillum*. Em: CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (Eds.). Handbook for *Azospirillum*: Technical Issues and Protocols. Knoxville: Springer, 2015.
- ANDREOLI, C; ANDRADE; R. V.; ZAMORA, S. A; GORDON, M. (2002). Influência da germinação da semente e da densidade de semeadura no estabelecimento do estande e na produtividade de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 24, nº 2, p. 1-5. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbs/a/79Z7Ng8vhvz687WYmxHYRsR/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em 16/10/2023.
- ANDA - Associação Nacional para Difusão de Adubos. (2023). Disponível em: https://anda.org.br/pesquisa_setorial/ Acesso:10/09/2023.
- ARAÚJO, F. F. *et al.* (2013). Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1043–1054, 2013. DOI: 10.5433/1679-0359.2013v34n3p1043. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/5c11/342ffc3e16f895a24c4006b99626dee3404c.pdf>. Acesso em: 03/09/2023.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. (2005). History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 77, n. 3, p. 549-579, 2005.
- BANZATTO, D.A.; KRONKA, S.N. (2006). **Experimentação agrícola. 4ª ed.** Jaboticabal: FUNEP, 237 p.
- BARBIERI, Paola; ZANELLI, Tiziano; GALLI, Enrica; ZANETTI, Giuliana. (1986) Wheat inoculation with *Azospirillum brasilense Sp6* and some mutants altered in nitrogen fixation and indole-3-acetic acid production. **FEMS Microbiology Letters**, 36: 87-90, 1986.
- BARBOSA, J. Z.; ROBERTO, L. A.; HUNGRIA, M.; CORRÊA, R. S.; MAGRI, E., & CORREIA, T. D. (2022). Meta-analysis of maize responses to *Azospirillum brasilense* inoculation in Brazil: Benefits and lessons to improve inoculation efficiency. **Applied Soil Ecology**, 170, 104276. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104276>
- BARGAZ, A., LYAMLOULI, K., CHTOUKI, M., ZEROUAL, Y., AND DHIBA, D. (2018). Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. **Front. Microbiol.** 9:1606. doi: 10.3389/fmicb.2018.0160

BARRA, *et al.* (2019). Phosphobacteria inoculation enhances the benefit of P-fertilization on *Lolium perenne* in soils contrasting in P-availability. **Soil Biology and Biochemistry** [online] 136, 107516. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.06.012>. Acesso: 25/05/2022.

BATISTA, M. A., INOUE, T. T., ESPER NETO, M., and MUNIZ, A. S. (2018). **Princípios de fertilidade do solo, adubação e nutrição mineral**. In: BRANDÃO FILHO, J. U. T., FREITAS, P. S. L., BERIAN, L. O. S., and GOTO, R., comps. Hortaliças-fruto [online]. Maringá: EDUEM, 2018, pp. 113-162. ISBN: 978-65-86383-01-0. <https://doi.org/10.7476/9786586383010.0006>.

BAUDET, L. M. L. (2012). Armazenamento de sementes. In: PESKE, S. T.; VILLELA, F. A.; MENEGHELLO, G. E. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 3. ed. Pelotas: UFPel, cap. 3, p. 369 - 418.

BERGAMASCHI, C. (2006). **Inoculação em solos com estas condições não tenham respostas positivas do uso destas bactérias**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BOMFIM, C. A; COELHO, L. G. F, do VALE, H. M. M, *et al* (2021). Brief history of biofertilizers in Brazil: from conventional approaches to new biotechnological solutions. **Brazilian J Microbiol** 52:2215–2232. doi: 10.1007/s42770-021-00618-9

BOYD, E. S.; PETERS, J. W. (2013). New insights into the evolutionary history of biological nitrogen fixation. **Front Microbiol**.v.4, n. 201, p. 1-12. Disponível em:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00201>

BRASIL. (2004) **Decreto nº 4.954**, de 14 de janeiro de 2004. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2004/decreto/d4954.htm.

BRASIL. (2009). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS.395p. <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/arquivos-publicacoes-laboratorio/regras-para-analise-de-sementes.pdf/view>

BRASIL. (2011) **Instrução Normativa SDA nº 13**, de 24 de março de 2011. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumosagropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/insda-13-de-24-03-2011-inoculantes.pdf>. Acesso em: 03/12/2022.

BRASIL. (2013) Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Instrução Normativa nº 45**, de 17 de setembro de 2013. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumosagricolas>.

BRASIL. (2020). **Decreto nº 10.375/2020**. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/d10375.htm

BRASIL. (2021). **Projeto de lei Nº 3668**. Dispõe sobre a produção, o registro, comercialização, uso, destino final dos resíduos e embalagens, o registro, inspeção e fiscalização, a pesquisa e

experimentação, e os incentivos à produção de bioinsumos para agricultura e dá outras providências. Disponível em: https://legis.senado.leg.br/sdleg-getter/documento?dm=9028589&ts=1696427205714&disposition=inline&_gl=1*s2apgm*_ga*NjI0MzYxODUuMTY5Njk1NzU5Mw..*_ga_CW3ZH25XMK*MTY5Njk1NzU5My4xLjAuMTY5Njk1NzU5My4wLjAuMA.

BRASIL. (2022). **Decreto nº 10.991**, de 11 de março de 2022. Institui o Plano Nacional de Fertilizantes 2022–2050 e o Conselho Nacional de Fertilizantes e Nutrição de Plantas. Disponível em: <https://in.gov.br/web/dou/-/decreto-n-10.991-de-11-de-marco-de-2022>. Acesso em: 02/12/2022

BRIC, J. M, BOSTOCK, R. M, SILVERSTONE, S.E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. **Appl Environ Microbiol.** Feb;57(2):535-8. doi: 10.1128/aem.57.2.535-538.1991. PMID: 16348419; PMCID: PMC182744.

BULEGON, L. G.; KLEIN, J.; RAMPIM, L.; GUIMARÃES, V. F.; BATTISTUS, A. G.; KESTRING, D. (2014). Desenvolvimento inicial de plântulas de soja inoculadas e co-inoculadas com *Azospirillum brasilense* e *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, n. 1, p. 26-37.

CANCELLIER, L. L., AFFÉRI, S. F., ADORIAN, G. C., RODRIGUES, H. V. M. (2010) Influencia da adubação orgânica na linha de semeadura na emergência e produção forrageira de milho. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil) 5:(5)25-32.

CASSÁN, F. *et al.* (2020). Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, n. 4, p. 461–479, 2020.

CHRISTENSEN *et al.* (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **J. Clin. Microbiol.** 22:996-1006

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. (2024). **Boletim da safra de grãos**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>. Acesso em 10/03/2024.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL (CNA) (2022). **CNA prevê margem de lucro menor e alta dos custos de produção em 2023**. Disponível em: <https://www.cnabrazil.org.br/noticias/cna-preve-margem-de-lucro-menor-e-alta-dos-custos-de-producao-em-2023>. Acesso em 20/09/2023.

DALL'AGNOL, A.; NOGUEIRA, M. A. (2020). **Bioinsumos: a terceira onda da agricultura brasileira**. Disponível em: <https://blogs.canalrural.com.br/embrapasoja/2020/07/16/bioinsumos-aterceira-onda-da-agricultura-brasileira>. Acesso em: 20/08/2023.

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**, Campina Grande, v. 17, n. 10, p. 1023-1029. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-43662013001000001>

DARTORA, J. *et al.* (2016). Co-inoculation of *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae* in maize. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, p. 545–550, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v20n6p545-550>. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141543662016000600545&lng=en&tlng=en. Acesso em: 03/09/2023.

DANHORN, T.; FUQUA, C. (2007). Biofilm Formation by Plant-Associated Bacteria, Annu. **Rev. Microbiol.** V. 61, p. 401–22.

DÖBEREINER, J., PEDROSA, F.O. (1987). Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. **Science Tech**, Madison, USA.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas. Brasília, **Embrapa-SPI**. Itaguaí, Embrapa CNPAB. 60p.

DOBBELAERE, S., CROONENBORGH, A., THYS, A., BROEK, A. V., & VANDERLEYDEN, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and soil**, 212(2), 153-162.

DOBBELAERE, *et al.* (2001). Responses of agronomically important crops to inoculation with **Azospirillum**. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28, n. 9, p. 871- 879.

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

EMBRAPA, (2022). **Notícias:** <https://www.embrapa.br/en/busca-de-noticias/-/noticia/73697007/como-reduzir-a-dependencia-de-fertilizantes-na-agropecuaria-brasileira>

FERREIRA, A. S. *et al.* (2013). Implications of *Azospirillum brasilense* inoculation and nutrient addition on maize in soils of the Brazilian Cerrado under greenhouse and field conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 103–108. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.05.020>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0929139313001649>. Acesso em: 03/08/2023.

FERREIRA, E. P. B.; KNUPP, A. M., & MARTIN-DIDONET, C. C. G. (2014). Crescimento de cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) influenciado pela inoculação com bactérias promotoras de crescimento de plantas. **Bioscience Journal**, Uberlândia, 30(3), 655-665.

FERREIRA, Daniel Furtado (2019). SISVAR: A COMPUTER ANALYSIS SYSTEM TO FIXED EFFECTS SPLIT PLOT TYPE DESIGNS. **REVISTA BRASILEIRA DE BIOMETRIA**, [S.l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, dec. ISSN 1983-0823. Available at: <<http://www.biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450>>. Date accessed: 10 feb. 2020. doi: <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>.

FERREIRA, *et al.* (2020). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 6203-6212, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>

FERREIRA, N. dos S.; CONIGLIO A.; PUENTE M.; SANT'ANNA F. H, MARONICHE, G.; GARCÍA, J.; MOLINA, R.; NIEVAS, S.; VOLPIANO, C. G; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L.M.P.; PEDRAZA, R.O.; REIS, V.M.; ZILLI J.É.; CASSAN, F. (2022). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Az39 as the type strain of *Azospirillum argentinense* sp. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2022 Aug; 72(8). doi: 10.1099/ijsem.0.005475. PMID: 35913881.

FERREIRA, E; NOGUEIRA, M. A; HUNGRIA, M. (2024). **Manual de análises de bioinsumos para uso agrícola: inoculantes**. Livro. Brasília, DF: Embrapa.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. (2010). The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, p. 623- 633. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.

FONSECA, L. M. F. **Inoculação com estirpes de *Azospirillum* e adubação nitrogenada no acúmulo de nutrientes e produtividade de milho**. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias. Universidade Federal de São João del-Rei. Disponível em: [https://ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/ppgca/Dissertacao%20Livia%20Ferraz\(2\).pdf](https://ufsj.edu.br/portal2-repositorio/File/ppgca/Dissertacao%20Livia%20Ferraz(2).pdf)

FRANÇA-NETO, J.B *et al.* (2016). **Tecnologia da produção de semente de soja de alta qualidade**. [recurso eletrônico]: Londrina: Embrapa Soja. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/151223/1/Documentos-380_OL1.pdf. Acesso em 31/08/2023.

GOMES E. A.; SILVA C. U.; OLIVEIRA C. A.; LANA U. P.; MARRIEL I. E.; SANTOS, V. L. (2016). **Microrganismos promotores do crescimento de plantas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 51 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 208). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1144322/1/DOC-267-Mecanismos-das-bacterias-promotoras-do-crescimento-deplantas.pdf>. Acesso em 02/12/2022

GORDON, S. A.; WEBER, R. P. (1951). **Colorimetric estimation of indoleacetic acid**. **Plant Physiol**. Jan;26(1):192-5. doi: 10.1104/pp.26.1.192. PMID: 16654351; PMCID: PMC437633.

GOU *et al.* (2015). Accumulation of choline and glycine betaine and drought stress tolerance induced in maize (*Zea mays*) by three plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strains. **Pakistan Journal of Botany**, v. 47, n. 2, p. 581-586.

- HAMMER, Ø., HARPER, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). **PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis**. *Palaeontologia Electronica*, 4, 9 p. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- HALL, T. (2011). **BioEdit: an important software for molecular biology**. *GERF Bulletin of Biosciences*;2(1): 60–61.
- HÖRDT, A. *et al.* (2020). Analysis of 1,000+ Type-Strain Genomes Substantially Improves Taxonomic Classification of Alphaproteobacteria. ***Frontiers in Microbiology***, v. 11, p. 468, 7 abr.
- HUERGO *et al.* (2008). **Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense***. In: CASSÁN, F. D.; GARCIA DE SALAMONE, I. *Azospirillum sp.*: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina. p. 17-35.
- HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E. V (2008). Caracterização genética de rizóbios e outras bactérias diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas por BOX PCR. Londrina: Embrapa Soja, 12 p. (Embrapa Soja. **Comunicado Técnico, 79**). **Conferir o negrito**
- 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***, v. 331, n. 1-2, p. 413-425.
- HUNGRIA, M. (2011). Inoculação com *Azospirillum brasiliense*: inovação em rendimento a baixo custo. Londrina: Embrapa Soja, 2011. 36 p. (Embrapa Soja. **Documentos, 325**).
- HUNGRIA, M., NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S. (2013). Co-inoculation of soybeans and common beans with *rhizobia* and *azospirilla*: strategies to improve sustainability. ***Biology and Fertility of Soils***, 49(7), 791-801.
- HUNGRIA, M.; RIBEIRO, R. A.; NOGUEIRA, M. A. (2018). Draft Genome Sequences of *Azospirillum brasilense* Strains Ab-V5 and Ab-V6, Commercially Used in Inoculants for Grasses and Legumes in Brazil. ***Genome Announcements***, v. 6, n. 20, 17 maio.
- HUNGRIA, M.; BARBOSA, J. Z.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. (2022). Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. ***Agronomy Journal***, p. 1-12. DOI: 10.1002/agj2.21150
- JALES *et al.* (2021). Morfofisiologia do milho inoculado com *Azospirillum brasilense* submetido à restrição hídrica e adubação nitrogenada. Sete Lagoas; Embrapa Milho e Sorgo, 43 p. (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 227**).

LABOURIOU, L. G. (1983). **A germinação das sementes**. Washington: Organização dos Estados Americanos (Monografias Científicas). 170 p.

LAMM, R. B.; NEYRA, C. A. (2011). Characterization and cyst production of *Azospirilla* isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. <https://doi.org/10.1139/m81-202>, v. 27, n. 12, p. 1320–1325, 1 dez. 2011.

LIN et al. (2012) *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. **Int J Syst Evol Microbiol**. May;62(Pt 5):1185-1190. doi: 10.1099/ijms.0.030585-0. Epub 2011 Jul 8. PMID: 21742820.

KHAN *et al.* (2023). Microbial bioformulation: a microbial assisted biostimulating fertilization technique for sustainable agriculture. **Front Plant Sci**. Dec 12; 14:1270039. doi: 10.3389/fpls.2023.1270039. PMID: 38148858; PMCID: PMC10749938.

KUSS, A. V.; KUSS, V. V.; HOLTZ, E. K.; LOVATO, T. (2008). Inoculação de bactérias diazotróficas e desenvolvimento de plântulas de arroz irrigado em solo e câmara de crescimento. **Revista da FZVA**, v. 15, n. 1, p. 90-102, 2008.

MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M. (2002). Cultivo do milho: germinação e emergência. Brasília, DF: Embrapa Milho e Sorgo, 2002. 9p. (**Comunicado técnico**).

MAGUIRE, J. D. (1962) Speed of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, 2, 176-177. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

MALAVOLTA, E. (2006). **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Editora Ceres, 2006. 631p.

MARCOS FILHO, J. (2015) - **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba:FEALQ, 2a ed. p. 660.

MARCHIORO, T.E.L. (2005) **Produção de ácido indol acético e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. Tese de Doutorado, Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MARONICHE, G. A., GARCÍA, J. E., SALCEDO, F.; CREUS, C. M. (2017) Molecular identification of *Azospirillum spp*: Limitations of 16S rRNA and qualities of rpoD as genetic markers, **Microbiological Research**, Volume 195, Pages 1-10. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.11.009>.

MARTINEZ-VIVEROS, O. (2010) *et al.* Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. **Soil Science Plant Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 293–319. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162010000100006>. Disponível em: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-95162010000100006. Acesso em: 30 set. 2023.

MARTÍNEZ-MORALES, L. J. *et al.* (2003). Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 228, n. 2, p. 167-173.

MAYER, A.M. AND POLJAKOFF-MAYBER, A. (1989). **The Germination of Seeds**. 4th Edition, Pergamon Press plc, Headington Hill Hall, Oxford OX3 OBW, England, 52-56.

MOREIRA, F. M. de S.; SIQUEIRA, J. O. (2006). **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: Ufla, 2006. 626 p.

NCBI. (2024). **NCBI BLAST**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em: maio/ 2024.

OKUMURA, R. S.; DE CINQUE MARIANO, D., & ZACCHEO, P. V. C. (2011). Use of nitrogen fertilizer in corn: Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**. Disponível em: <https://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/viewFile/1337/1456>.

PATTEN, C. L; GLICK, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Can J Microbiol**. 1996 Mar;42(3):207-20. doi: 10.1139/m96-032. PMID: 8868227. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8868227/> Acesso em: 05/09/2023.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 14^a ed. Piracicaba: Nobel, 2000. 477p.

PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M.; REZENDE, A. M. (2003). Entraves da comercialização à competitividade do milho brasileiro. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, n. 104, p. 23-40, 2003.

RAI, S; OMAR, A. F; REHAN, M; AL-TURKI, A; SAGAR, A; ILYAS, N; SAYYED, R. Z. HASANUZZAMAN, M. (2022). Crop microbiome: their role and advances in molecular and omic techniques for the sustenance of agriculture. **Planta**. 2022 Dec 30;257(2):27. doi: 10.1007/s00425-022-04052-5. PMID: 36583789.

REIS, V. M. (2007). Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas. Embrapa Agrobiologia - **Documentos (INFOTECA-E)**.

RIBEIRO, V. P. (2018). **Inoculação simples e mista com *Azospirillum brasilense* e *Bacillus sp.* em plantas de milho: desenvolvimento de tecnologias para sistemas agrícolas sustentáveis**. Dissertação de Mestrado Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia. Universidade Federal de São João del-Rei. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/186020/1/Christiane-dissertacao-Vitoria.pdf>

HUNGRIA, M.; BARBOSA, J. Z.; RONDINA, A. B. L.; NOGUEIRA, M. A. (2022). Improving maize sustainability with partial replacement of N fertilizers by inoculation with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, p. 1-12. DOI: 10.1002/agj2.21150 (não tem espaço entre as iniciais?)

RUDRAPPA, T.; BIEDRZYCKI, M. L.; BAIS, H. P. (2008). Causes and consequences of plantas sociated biofilms. **FEMS Microbiol Ecol**. v. 64, p. 153–166, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00465.x>.

SALA, V. M. R. *et al.* (2007). Resposta de genótipos de trigo à inoculação de bactérias diazotróficas em condições de campo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 42, n. 6, p. 833-842.

SANTOS, L. C. *et al.* (2017). Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **Plos One**, v. 12, n. 3, 1 mar. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174576>. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0174576>. Acesso em: 03/09/2023.

SANTOS, M. S.; HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A. (2017). Production of polyhydroxybutyrate (PHB) and biofilm by *Azospirillum brasilense* aiming at the development of liquid inoculants with high performance. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 37, p. 1855-1862. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16162>.

SANTOS, M. S; NOGUEIRA, M. A; HUNGRIA, M. (2021). Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. <https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20200128>

SANTOYO G. (2022). How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. **J Adv Res**. 2022 Sep; 40:45-58. doi: 10.1016/j.jare.2021.11.020. Epub 2022 Dec 4. PMID: 36100333; PMCID: PMC9481936.

SKONIESKI, et al. (2017). Effect of seed inoculation with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization rates on maize plant yield and silage quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 9, p. 722- 730, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1806-92902017000900003>

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 425-448. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>.

STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogenfixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 24, n. 4, p. 487-506.

STEPANOVIĆ, *et al.* (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apmis**, 115, p.891-899. http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x

TAIZ, L., *et al.*; MASTROBERTI, A. A. *et al.*(tradução) (2017). **Fisiologia e desenvolvimento vegetal 6.ed.** – Porto Alegre: Artmed.

TURNER, S.; PRYER, K. M; MIAO, V. P; PALMER, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **J Eukaryot Microbiol**. Jul-Aug;46(4):327-38. doi: 10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x. PMID: 10461381.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J; LUPSKI, J. R (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, 5(1), 25-40.

WEI, Z. *et al.* (2020). Rhizosphere immunity: Targeting the underground for sustainable plant health management. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, v. 7, n. 3, p. 317–328, 2020. DOI: <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2020346>. Disponível em:<http://journal.hep.com.cn/fase/EN/10.15302/J-FASE-2020346>. Acesso em: 01/10/2023.

WITHERS, *et al.* (2018) Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**.7 de fevereiro de 2018;8(1):2537. doi: 10.1038/s41598-018-20887-z. PMID: 29416090; PMCID: PMC5803245.