

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA
E TECNOLOGIA GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA

**RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E
INOCULANTES PARA PRÉ-INOCULAÇÃO DE
SEMENTES DE MILHO E FEIJÃO**

Autora: Isabel Cristina Mendonça Cardoso Jakoby
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

Rio Verde, GO
novembro, 2016

**RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO E
INOCULANTES PARA PRÉ-INOCULAÇÃO DE
SEMENTES DE MILHO E FEIJÃO**

Autora: Isabel Cristina Mendonça Cardoso Jakoby
Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS-AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Área de Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado.

Rio Verde, GO
novembro, 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/IF Goiano Câmpus Rio Verde

Jakoby, Isabel Cristina Mendonça Cardoso.

J15r Rizobactérias promotoras de crescimento e inoculantes para pré-inoculação de sementes de milho e feijão. / Isabel Cristina Mendonça Cardoso Jakoby. – Rio Verde.- 2016.

63 fls :il.

Tese (Doutorado) – Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde, 2016.

Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie.

Bibliografia

1. Bactérias promotoras de crescimento. 2. Traços funcionais. 3. Inoculação antecipada. I. Título. II. Instituto Federal Goiano – Câmpus Rio Verde.

633.15

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS-AGRONOMIA**

**RIZOBACTÉRIAS PROMOTORAS DE
CRESCIMENTO E INOCULANTES PARA PRÉ-
INOCULAÇÃO DE SEMENTE DE MILHO E FEIJÃO**

Autora: Isabel Cristina Mendonça Cardoso Jakoby
Orientador: Dr. Edson Luiz Souchie

TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia - Área de
Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADA em 22 de novembro de 2016.

Prof^ª. Dra. Daniela Tiago da Silva
Campos
Avaliadora externa
UFMT – Cuiabá/MT

Dr. Fernando Bonafé Sei
Avaliador externo
Microquímica – Campinas/SI

Prof. Dr. Gustavo Castoldi
Avaliador interno
IF Goiano – Polo de Inovação

Prof^ª. Dra. Paula Fabiane Martins
Avaliadora externa
IF Goiano – Polo de Inovação

Prof. Dr. Edson Luiz Souchie
Presidente da banca
IF Goiano – Campus Rio Verde

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por abrir as portas que me fizeram chegar até aqui.

Ao meu esposo, Gilvane, e meu filho João Abilio, que foram o meu esteio, minha força e minha inspiração.

Ao IF Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias – Agronomia pela oportunidade de ser parte do quadro de discentes da 1ª turma de doutorandos do Programa.

Ao meu orientador, Edson Luiz Souchie, pelos momentos de aprendizado, de troca de experiências, de amizade e companheirismo.

Aos colegas mestrandos e doutorandos do Laboratório de Microbiologia Agrícola: Moacir, Cíntia, Lorena e Juliana pelos momentos de contribuição com o meu trabalho e também pela amizade e cumplicidade.

Aos alunos de Iniciação de Científica do Laboratório de Microbiologia Agrícola: Lucas, Milene, Lázara, Maria Gabriela, Lorena Cabral e, em especial, à bolsista Tâmara, pela confiança e pela ajuda na execução das atividades pertinentes ao projeto.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo durante 36 meses dessa jornada e ao MEC/SETEC e CNPq, pelo apoio financeiro (Chamada Pública MEC/SETEC/CNPq Nº 94/2013: Apoio a Projetos Cooperativos de Pesquisa Aplicada e de Extensão Tecnológica) para execução do projeto.

BIOGRAFIA DA AUTORA

ISABEL CRISTINA MENDONÇA CARDOSO JAKOBY, filha de Carlos Antonio Cardoso e Magna Maria Silva de Mendonça Cardoso, nasceu na cidade de Rio Verde Goiás, Estado de Goiás, em 09 de outubro de 1984. Ingressou no ensino superior em março de 2003, quando iniciou no Curso Superior de Tecnologia em Produção de Grãos do Centro Federal de Educação Tecnológica de Rio Verde (CEFET - Rio Verde), atualmente IF Goiano - Campus Rio Verde, com conclusão de sua graduação em dezembro de 2005. Em fevereiro de 2007, após aprovação em processo seletivo, mudou-se para Lages-SC onde ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solo, em nível de Mestrado, na área de Microbiologia do Solo, com conclusão do curso em dezembro de 2008. No mesmo mês retornou a Rio Verde, onde continuou fazendo parte de projetos de pesquisa importantes para sua formação. Em março de 2013, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia, em nível de Doutorado, na área de Microbiologia Agrícola, submetendo-se à defesa da tese, requisito indispensável para a obtenção do título de Doutora em Ciências Agrárias - Agronomia, em novembro de 2016. Em dezembro de 2016, concluiu o curso de Bacharelado em Agronomia, também no IF Goiano – Campus Rio Verde.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1. A cultura do milho.....	2
2. A cultura do feijoeiro.....	3
3. Micro-organismos promotores de crescimento vegetal.....	4
4. Inoculantes.....	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	7
OBJETIVO GERAL.....	12
Capítulo I. TRAÇOS FUNCIONAIS PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE MILHO E FEIJÃO.....	13
Resumo.....	13
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	16
Resultados e Discussão.....	20
Conclusões.....	26
Agradecimento.....	26
Referências Bibliográficas.....	27

Capítulo II. PRÉ-INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO COM <i>Azospirillum brasilense</i> : METODOLOGIAS PARA RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS E COMPATIBILIDADE DE PRODUTOS.....	31
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Material e Métodos.....	34
Resultados e Discussão.....	38
Conclusões.....	43
Agradecimento.....	44
Referências Bibliográficas.....	44
CONCLUSÃO GERAL.....	47

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Características químicas e granulométricas do solo da Área Experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (outubro de 2013).....	16
Tabela 2. Número de unidades formadoras de colônias de bactérias rizosféricas isoladas em meio YMA e NFb semi-sólidos, em plantas-isca de feijão e milho, em Rio Verde, GO.....	20
Tabela 3. Presença (+) ou ausência (-) de capacidade de produção de sideróforos, produção de celulases e fosfatases, atividade antifúngica e produção de ácido indol acético (AIA) por rizobactérias isoladas de plantas de feijão e milho, em Rio Verde, GO.....	22
Tabela 4. Teores de ácido indol acético ($\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) produzidos em meio DYGS com e sem triptofano após inoculação de rizobactérias isoladas de milho e feijão, em Rio Verde, GO.....	23
Tabela 5. Identificação molecular com base no sequenciamento da região 16S rRNA e traços funcionais de rizobactérias isoladas de plantas de feijão e milho, em Rio Verde, GO.....	25
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Descrição dos produtos e dosagens utilizadas para a pré-inoculação de sementes de milho, em Rio Verde, GO.....	37
Tabela 2. Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de <i>Azospirillum brasilense</i> recuperadas após a inoculação de sementes de milho de acordo com a solução diluente e o meio de cultura utilizado, em Rio Verde, GO (média de três repetições do experimento).....	39
Tabela 3. Número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas às 2h e aos 7, 14 e 21 dias após o pré-tratamento de sementes de milho com	

fungicidas/inseticidas, inoculante de <i>Azospirillum brasilense</i> Abv-5 Abv-6 e aditivo protetor, em Rio Verde, GO (média de três repetições do experimento).....	42
--	----

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

AIA	Ácido indol acético	$\mu\text{g AIA mL}^{-1}$
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal	
UFC	Unidades Formadoras de Colônias	
FBN	Fixação biológica de nitrogênio	
DNA	Ácido Desoxirribonucleico	
RPCV	Rizobactérias promotoras de crescimento vegetal	
DAE	Dias após a emergência	
NaCl	Cloreto de sódio	
μL	Microlitros	
YMA	Manitol, extrato de levedura e ágar	
NMP	Número mais provável	
BDA	Batata dextrose ágar	
CAS	Cromoazurol S	
TSA	Ágar tróptico de soja	
pH	Potencial hidrogeniônico	
mM	Milimol	
DYGS	Dextrose, extrato de levedura, glicose, sacarose	
mL	Mililitros	
rpm	Rotações por minuto	
nm	Nanômetro	
PCR	Reação em cadeia pela polimerase	

H ₂ O	Água
g	Gramma
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
BPCV	Bactérias promotoras do crescimento vegetal
kg	Quilograma
f	Fator de diluição
N	Número de colônias por placa
°C	Graus Celsius
IN	Instrução Normativa

RESUMO

JAKOBY, ISABEL CRISTINA MENDONÇA CARDOSO. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, novembro de 2016. **Rizobactérias promotoras de crescimento e inoculantes para pré-inoculação de sementes de milho e feijão.** Orientador: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie.

Objetivou-se selecionar rizobactérias promotoras de crescimento vegetal com potencial para inoculação nas culturas do milho e feijão, e analisar a viabilidade da pré-inoculação de sementes de milho com produtos comerciais, em nível de laboratório. No Capítulo I, foram avaliados os traços funcionais para promoção de crescimento de vegetal e identificados a nível molecular rizobactérias isoladas de plantas de feijão e milho, visando o uso em estudos de inoculação. Os isolados obtidos foram testados quanto à produção de sideróforos, produção de enzimas celulasas e fosfatases, biossíntese de ácido indol acético (AIA) na presença e ausência de triptofano, e atividade antifúngica contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. A identificação molecular foi feita por sequenciamento do gene 16S rRNA. No Capítulo II, buscou-se definir uma metodologia de recuperação de células de *A. brasilense* em sementes de milho inoculadas e avaliar a viabilidade e compatibilidade de produtos na pré-inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*. Na primeira etapa, sementes de milho foram inoculadas com *A. brasilense* Abv5 Abv6 e procedeu-se a recuperação de células após 2h. Foram testadas três soluções diluentes (sacarose 4%, solução salina com tween 80 e água deionizada) e três meios de cultura para plaqueamento (NFb semi-sólido, NFb sólido e meio batata). Após definição do diluente e meio de cultura adequados, na segunda etapa, sementes de milho foram pré-tratadas com fungicidas/inseticidas recomendados para o tratamento de

sementes de milho, um aditivo protetor e inoculadas com *A. brasilense*. A recuperação de células sobre as sementes foi realizada às 2h e aos 7, 14 e 21 dias após o armazenamento. Nenhum isolado foi capaz de produzir sideróforos, celulasas e fosfatases. Apenas dois isolados produziram AIA em meio líquido. A atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum* foi característica presente em seis isolados. A actinobactéria *Microbacterium oxidans* e a bactéria *Lysinibacillus fusiformis* foram as espécies predominantes, com ocorrência tanto na rizosfera de milho quanto de feijão. A solução diluente mais adequada para recuperação de células de *A. brasilense* foi a solução de sacarose 4% como recuperação de $3,5 \times 10^4$ UFC semente⁻¹ no meio NFb sólido e $3,7 \times 10^4$ UFC semente⁻¹ no meio batata. Esses dois meios podem ser usados para plaqueamento em testes de recuperação de células, porém, no meio batata observou-se maior contaminação. No pré-tratamento das sementes de milho, o maior número de células foi recuperado no tratamento com piraclostrobina+tiofanato metílico+fipronil às 2h após o tratamento com $1,12 \times 10^5$ UFC semente⁻¹ recuperadas. Todos os tratamentos tiveram resultados iguais ao controle aos 7 dias de armazenamento.

Palavras-chave: bactérias promotoras de crescimento; traços funcionais; inoculação antecipada, *Azospirillum brasilense*; recuperação de células.

ABSTRACT

JAKOBY, ISABEL CRISTINA MENDONÇA CARDOSO. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, November 2016. **Plant growth promoting rhizobacteria and inoculants for pre-inoculation of maize and common bean seeds.** Advisor: Prof. Dr. Edson Luiz Souchie.

This work aimed to select plant growth promotion rhizobacteria with potential for inoculation in maize and bean crops, as well as to analyze the viability of pre-inoculation of maize seeds with commercial products at the laboratory. In Chapter I, functional traits for plant growth promotion were evaluated and rhizobacteria isolated from bean and maize plants were identified at the molecular level, aiming their use in inoculation studies. The isolates obtained were tested for siderophore production, cellulase and phosphatase enzyme production, indole acetic acid biosynthesis (AIA) in the presence and absence of tryptophan, and antifungal activity against the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Molecular identification was done sequencing the 16S rRNA gene. In Chapter II we tried to define a methodology for the recovery of *Azospirillum brasilense* cells in inoculated maize seeds and to evaluate the viability and compatibility of products in the pre-inoculation of seeds with *A. brasilense*. In the first step, maize seeds were inoculated with *A. brasilense* Abv5 Abv6 and cells were recovered after 2h. Three diluent solutions (sucrose 4%, saline solution with tween 80 and deionized water) and three culture media for plating (semi-solid NFb, solid NFb and potato medium) were tested. After definition of the appropriate diluent and culture medium, in the second stage, maize seeds were pre-treated with fungicides/insecticides recommended for the treatment of maize seeds, a protective additive and inoculated with *A. brasilense*. The recovery of cells on seeds was performed at 2h and at 7, 14 and 21 days after storage. No isolate was able to produce siderophores,

cellulases, and phosphatases. Only two isolates produced AIA in liquid medium. The antifungal activity against *S. sclerotiorum* was present in six isolates. The actinobacteria *Microbacterium oxidans* and the bacterium *Lysinibacillus fusiformis* were the predominant species, occurring in both maize and bean rhizosphere. The most suitable diluent solution for recovery of *A. brasilense* cells was the sucrose solution with recovery of 3.5×10^4 CFU seed⁻¹ in the solid NFb medium and 3.7×10^4 CFU seed⁻¹ in the potato medium. These two media can be used for plating in cell recovery tests. In pre-treatment of maize seeds, the highest number of cells was recovered in the treatment with pyraclostrobin + thiophanate methyl + fipronil at 2 h after treatment with 1.12×10^5 CFU seed⁻¹ recovered. All treatments had equal results to the control at 7 days of storage.

Keywords: growth promoting bacteria; functional trait; early inoculation, *Azospirillum brasilense*; cell recovery.

INTRODUÇÃO GERAL

As culturas do milho (*Zea mays* L.) e do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) possuem importância econômica significativa, a primeira por ser a que mais contribui para a produção mundial de cereais e a segunda por ser uma das principais leguminosas consumidas na alimentação humana no mundo. A microbiologia do solo oferece várias alternativas para o desenvolvimento de novas biotecnologias que podem contribuir para o estabelecimento desses sistemas agrícolas tornando-os mais sustentáveis, produtivos e menos dependentes do uso de altas concentrações de fertilizantes e agroquímicos (Döbereiner, 1990).

Os micro-organismos do solo desempenham importante papel na ciclagem de nutrientes e interagem naturalmente com as plantas, muitas vezes atuando como promotores do crescimento vegetal. Estes micro-organismos são encontrados na rizosfera, podem ser de vida livre, estabelecer simbiose com leguminosas e também ocorrem em associação plantas da família *Poaceae* (gramíneas) de interesse econômico, como milho, arroz, trigo, aveia e cana-de-açúcar (Moreira et al., 2010). Os benefícios da colonização de plantas por estes micro-organismos estão relacionados à sua capacidade de promover o crescimento vegetal por uma série de mecanismos que juntos contribuem para tornar as plantas mais saudáveis e produtivas, pela maior eficiência de absorção de água e nutrientes, maior tolerância a estresses abióticos e ao ataque de agentes patogênicos (Hungria, 2011).

Com o crescimento acelerado da população global e conseqüente aumento por demanda de alimentos, a introdução de novas técnicas para aumentar a produtividade das culturas com sustentabilidade é essencial. A utilização de bactérias promotoras de crescimento vegetal, na forma de inoculantes, tem mostrado potencial e é estratégica, pois reduz a dependência das culturas por fertilizantes, e também o efeito negativo da

sua aplicação sobre o ambiente, o que torna o desenvolvimento dessa tecnologia necessário não só do ponto de vista econômico como também ambiental (Gupta et al., 2015; Goswami et al., 2016).

O sucesso da inoculação pode ser afetado por um fator ainda pouco estudado que é a utilização de fungicidas e inseticidas para o tratamento das sementes, antes da semeadura. A composição dos produtos recomendados para o tratamento de sementes, que é de suma importância para garantir o estabelecimento inicial das culturas e protegê-las do ataque de pragas e doenças, pode afetar a sobrevivência dos microorganismos inoculados, o que torna esse um dos principais obstáculos para garantir a eficiência da inoculação. Considerando que atualmente o problema mais relevante na inoculação da cultura da soja é a compatibilidade das cepas utilizadas com fungicidas e outros produtos usados no tratamento de sementes (Hungria et al., 2007), é esperado que tal problema também afete outras culturas, como o milho e o feijoeiro.

1. A cultura do milho

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no mundo e possui grande importância econômica pelo fato de ser uma cultura de usos múltiplos, tanto na alimentação humana e animal, como também em vários setores da indústria. A previsão de produção mundial de milho para o fechamento da safra 2015/16 é de aproximadamente 959 milhões de toneladas e, nesse cenário, o Brasil está entre os principais produtores, com produção de cerca de 67 milhões de toneladas (USDA, 2016).

No panorama nacional de produção de milho, o Estado de Goiás ocupa atualmente o terceiro lugar no ranking, com mais de 6,4 milhões de toneladas somando-se safra e safrinha (CONAB, 2016). Além da importância econômica da cultura do milho, destaca-se sua relevância social principalmente no que diz respeito à agricultura familiar em que ela se torna a principal cultura (Fabrini et al., 2012).

A cultura do milho é exigente quanto à aplicação de fertilizantes, principalmente os nitrogenados, o que a torna altamente responsiva a esse nutriente. A adubação fosfatada também é muito importante para a cultura, principalmente durante os primeiros estádios de desenvolvimento da plântula. A resposta da cultura à aplicação de fertilizantes depende do manejo adequado da adubação, da fonte de nutriente utilizada, época de aplicação do fertilizante, além da interferência exercida pelas

condições edafoclimáticas e pelos micro-organismos do solo (Ohland et al., 2005, Okamura et al., 2011).

2. A cultura do feijoeiro

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é alimento básico na nutrição dos brasileiros, sendo sua principal fonte de proteína de origem vegetal e importante fonte de micronutrientes. Segundo os dados mais recentes, publicados pela Food and Agriculture Organization of the United Nations, a produção mundial do feijão-comum, em 2012, alcançou 23 milhões de toneladas e o Brasil foi o segundo maior produtor com produção de 2,8 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2013).

No Brasil, o cultivo do feijoeiro possui três safras, a primeira designada como safra das águas que ocorre entre os meses de agosto a novembro; a segunda é a safra da seca, realizada entre os meses de dezembro e abril; e a terceira é a safra de inverno, caracterizada pelo cultivo irrigado de abril a junho (Embrapa Arroz e Feijão, 2012). Em termos de agricultura empresarial (grandes produtores), Goiás está entre os principais produtores de feijão comum. Na safra 2015/16, a produção foi superior a 284 mil toneladas, com produtividade acima de 2.300 kg ha⁻¹ (Silva e Wander, 2013; CONAB, 2016).

Do ponto de vista social, o cultivo do feijoeiro é de grande representatividade, por ser realizado por diversos tipos de produtores, em várias regiões do país e em diferentes níveis tecnológicos, sendo a agricultura familiar a principal responsável pela produção brasileira de feijão. Boa parte da produção é destinada ao autoconsumo das famílias, especialmente nas regiões onde predominam pequenas áreas de cultivo. No estado de Goiás, em 2006, 84% dos estabelecimentos com cultivo de feijão-comum eram de pequenos agricultores, no entanto, a produtividade dessas áreas é baixa, possivelmente pela não utilização das tecnologias recomendadas para a cultura (Silva e Wander, 2013).

O nitrogênio (N) é o nutriente mais requerido pelo feijoeiro e as principais fontes desse nutriente para a cultura são os fertilizantes nitrogenados e a FBN, porém, o efeito da inoculação de bactérias fixadoras de N nesta cultura nem sempre é positivo, o que requer mais estudos, principalmente com enfoque nos seus diversos sistemas de produção (Barbosa e Gonzaga, 2012).

3. Micro-organismos promotores de crescimento vegetal

As plantas estão associadas a micro-organismos de diversas formas. Na rizosfera, área de solo sob influência das raízes, são encontrados inúmeros micro-organismos conhecidos como promotores de crescimento vegetal, que podem colonizar os tecidos das plantas e contribuir para o seu desenvolvimento (Fibach-Paldi et al., 2012). A colonização dos tecidos vegetais por tais micro-organismos pode ocorrer de forma epifítica, quando se dá superficialmente ou endofítica, quando bactérias e fungos penetram os tecidos vegetais sem causar danos ao tecido. Uma característica da colonização endofítica é a ausência de sintomas de doença, pelo fato dessa relação não ter característica patogênica (Reinhold-Hurek e Hurek, 2011).

Existem vários mecanismos pelos quais fungos e bactérias podem contribuir para o desenvolvimento de plantas colonizadas. A nutrição vegetal pode ser diretamente beneficiada pela FBN e solubilização de fosfatos. Esses micro-organismos também são capazes de sintetizar fitormônios e vitaminas essenciais; atuar em rotas de sinalização, como a rota do etileno; aumentar a resistência das plantas a estresses; e protegê-las de ataques de patógenos pela produção de compostos antifúngicos e antibacterianos, e da produção de sideróforos (Dobellaere et al., 2003; Bashan e Bashan, 2005; Perrig et al., 2007).

A FBN é realizada por bactérias de diversos grupos filogenéticos, que são denominadas diazotróficas. Estas bactérias podem viver livres em diversos ecossistemas, estabelecer simbioses com leguminosas da família *Fabaceae* ou estarem associadas às plantas, entre elas gramíneas da família *Poaceae*, sendo nesse caso denominadas de diazotróficas associativas (Moreira et al., 2010). A FBN é um processo estratégico para a manutenção da sustentabilidade dos agrossistemas, pois beneficia não só a cultura colonizada, como também as subseqüentes, reduz a utilização de fertilizantes nitrogenados e as perdas de N no sistema o que, por consequência, pode reduzir o custo de produção e os problemas de contaminação ambiental (Liu et al. 2012).

Em leguminosas produtoras de grãos como a soja e o feijão, e também em espécies forrageiras e arbóreas, a FBN ocorre por meio do estabelecimento da relação de simbiose entre bactérias do solo da família *Rhizobiaceae* e as raízes dessas plantas, em que a hospedeira fornece à bactéria produtos oriundos da fotossíntese e se beneficia

do N fixado pela bactéria, principalmente na forma de amônio (Moreira e Siqueira, 2006).

A cultura do feijoeiro, especificamente, é colonizada por várias espécies de bactérias diazotróficas do gênero *Rhizobium* (*R. leguminosarum* sv. *phaseoli*, *R. phaseoli*, *R. tropici*, *R. etli*, *R. leucaenae*, *R. giardinii* sv. *phaseoli*, *R. gallicum*, *R. lusitanum* e *R. pisi*), mas nem sempre as estirpes inoculadas são eficientes para colonizar as plantas sob condições de campo, e a nodulação acaba sendo baixa. As estirpes de *R. tropici* SEMIA 4080 é a recomendada atualmente e autorizada para produção e comercialização de inoculantes recomendados para a cultura do feijoeiro no Brasil (Hungria et al., 2000; Castellane et al., 2014). No entanto, a estirpe PRF 81^T, descrita recentemente por um grupo de pesquisadores brasileiros como uma nova espécie de rizóbio, denominada *Rhizobium freirei*, tem sido a estirpe mais competitiva e eficiente para inoculação de sementes de feijão (Dall’Agnol et al., 2013).

Na cultura do milho e outras gramíneas, os principais gêneros de diazotróficos associativos relatados são *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum* e *Pseudomonas*. Algumas dessas bactérias podem ser endofíticas, o que lhes confere a capacidade de colonizar não apenas a superfície, mas também o interior dos tecidos da hospedeira ocupando espaços intercelulares e tecidos vasculares, sem que seja necessário o desenvolvimento de estruturas especializadas, como nódulos, e também sem causar nenhum sintoma de doença (Moreira et al., 2010; Monteiro et al., 2012).

Vários estudos têm sido realizados com foco nas comunidades de micro-organismos na cultura do milho. No Brasil, já existem inoculantes comerciais registrados para a cultura do milho que contêm duas estirpes de *Azospirillum brasilense* identificadas pela Embrapa Soja e pesquisas demonstraram incrementos de até 24% na produtividade da cultura (Hungria, 2011). Os principais benefícios da colonização de plantas por *Azospirillum* e outros associativos, além da FBN, estão atribuídos ao melhor desenvolvimento do sistema radicular e, por consequência, à maior capacidade de absorção de água e nutrientes pelas raízes, principalmente em função do seu potencial de produção de ácido indol-acético (AIA) (Dobbelaere e Okon, 2007).

Nesse sentido, as culturas do milho e do feijoeiro podem ser direta ou indiretamente beneficiadas pela colonização por bactérias diazotróficas. Trabalhos de isolamento e caracterização fisiológica de isolados comprovam que, quando bem

selecionados, possuem várias aptidões ao mesmo tempo e, por isso, tornam-se interessantes para uso em programas de inoculação. A possibilidade de co-inoculação de espécies distintas também se torna uma técnica interessante, na qual ambas podem se beneficiar (Dardaneli et al., 2008).

4. Inoculantes

A utilização de micro-organismos promotores de crescimento na forma de inoculantes é a principal forma de disponibilizá-los às culturas em concentrações populacionais adequadas, visto que muitas das espécies microbianas de interesse não são encontradas no solo em densidades populacionais satisfatórias. No entanto, o conhecimento e a adoção de tecnologias de inoculação adequadas são imprescindíveis para a eficiência do produto (Brockwell e Bottomley, 1995).

O uso de inoculantes na cultura da soja é o principal exemplo de aplicação comercial de um produto de origem microbiana no Brasil. Mas já existem inoculantes comercializados à base de outras espécies microbianas em várias culturas, dentre elas o milho e o feijão. No entanto, para cada caso estudado, há a necessidade de se pesquisar formulações adequadas às exigências nutricionais dos micro-organismos e tecnologias de inoculação que garantam a qualidade e eficiência do produto. Em situações experimentais, micro-organismos benéficos são aplicados de variadas formas, em formulações líquidas e sólidas, contudo, para produção em larga escala, muitas dessas formas se tornam impraticáveis (O'Callaghan, 2016).

Outro fator importante, quando o tema é a produção de inoculantes em larga escala e tecnologias de inoculação, consiste no controle de qualidade dos produtos comercializados. No Brasil, as metodologias oficiais para contagem, identificação e análise de pureza de inoculantes estão publicadas na Instrução Normativa (IN) nº 30, de 12 de novembro 2010. Quando se trata da recuperação de células de micro-organismos inoculados sobre sementes, a metodologia de recuperação e quantificação de células de rizóbios em sementes inoculadas envolve a contagem das unidades formadoras de colônia (UFC) em placas contendo meio de cultura específico à espécie, porém, a metodologia se aplica a todos as espécies de rizóbios registradas para comercialização, independente do gênero (Brasil, 2010). Para análise de recuperação de células de bactérias diazotróficas associativas, ainda não existe metodologia proposta na legislação.

É essencial que seja possível quantificar o número de células viáveis de cada micro-organismo por unidade de peso de inoculante para determinar o potencial de inóculo dos produtos em condições e doses de aplicação diferentes, pois só assim os resultados obtidos a campo podem ser adequadamente interpretados (Rose et al., 2011). Além da qualidade dos inoculantes, um dos problemas mais sérios enfrentados atualmente é a compatibilidade dos inoculantes microbianos com produtos utilizados no tratamento de sementes, principalmente fungicidas e inseticidas. Esse problema já é fato na cultura da soja e, provavelmente, seja um dos principais desafios à inoculação de micro-organismos associativos, como *Azospirillum* (Hungria, 2011), o que requer pesquisas aplicadas à adaptabilidade das estirpes estudadas ao sistema de produção das culturas inoculadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBOSA, F.R.; GONZAGA, A.C.O. **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região Central-Brasileira: 2012-2014**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2012. 248 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 272). (ISSN 1678-9644).

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, p. 1795–1804, 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n° 30, de, 12 de novembro de 2010. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 nov. 2010, seção 1. 28 p.

BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p. 683-697, 1995.

CASTELLANE, T.C.L.; LEMOS, M.V.F.; LEMOS, E.G.M. Evaluation of the biotechnological potential of *Rhizobium tropici* strains for exopolysaccharide production. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 191-197, 2014.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: grãos, primeiro levantamento, safra 2015/16**. Brasília, v. 4, p. 1-164, 2016.

DALL'AGNOL, R.F.; RIBEIRO, R.A.; ORMENO-ORRILLO, E.; ROGEL, M.A.; DELAMUTA, J.R.M.; ANDRADE, D.S.; MARTINEZ-ROMERO, E.; HUNGRIA, M. *Rhizobium freirei*, a symbiont of *Phaseolus vulgaris* very effective in fixing nitrogen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, p. 4167-4173, 2013.

DARDANELLI, M.S.; CÓRDOBA, F.J.F. de; ESPUNY, M.R.; CARVAJAL, M.A.R.; DIAZ, M.E.S.; SERRANO, A.M.G.; OKON, Y.; MEGÍAS, M. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2713-2721, 2008.

DOBBELAERE, S.; OKON, Y. The plant growth-promoting effect and plant responses. Elmerich, Claudine, Newton, William E. (Eds.). In: **Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations**, Series: Nitrogen Fixation: Origins, Applications and Research Progress. Springer: Dordrecht, The Netherlands, v. 5, p. 145-170, 2007.

_____ ; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Review in Plant Science**, v. 22, p. 107-149, 2003.

DÖBEREINER, J. Avanços recentes na pesquisa em fixação biológica do nitrogênio no Brasil. São Paulo: **Estudos Avançados**, v. 4, p. 144-152, 1990.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados conjunturais da produção de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* L.) no Brasil (1985 a 2011): área, produção e rendimento).** Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. Acesso em: 29 de agosto de 2013.

FABRINI, J.E.; LUZ, J.A.S.; LACERDA, C.L. de. A importância das culturas de milho e feijão para o desenvolvimento econômico de assentamentos de reforma agrária atendidos pelo Projeto Lumiar – Paraná. **Revista Nera**, v. 3, p. 68-94, 2012.

FAOSTAT. FAO's corporate database. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org>>. Acesso em 29 de agosto de 2013.

FIBACH-PALDI, S.; BURDMAN, S.; OKON, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 326, p. 99-108, 2012.

GOSWAMI, D.; THAKKER, J.N.; DHANDHUKIA, P.C. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Food and Agriculture**, v. 2, p. 1-19, 2016.

GUPTA, G.; PARIRHAR, S.S.; AHIRWAR, N.K.; SNEHI, S.K.; SINGH, V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 7, p. 96-102, 2015.

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo.** Londrina: Embrapa Soja, 2011. 38 p. (Embrapa Soja – Documentos 325). (ISSN 2176-2937).

_____ ; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F.J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 1515–1528, 2000.

_____; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro.** Londrina: Embrapa Soja, 2007. 80p. (Embrapa Soja. Documentos, 283). (ISSN 1516-781X; N 283).

LIU, Y.; ZUO, S.; XU, L.; ZOU, Y.; SONG, W. Study on diversity of endophytic bacterial communities in seeds of hybrid maize and their parental lines. **Archives of Microbiology**, v. 194, p. 1001-1012, 2012.

MONTEIRO, R.A.; BALSANELLI, E.; WASSEN, R.; MARIN, A.M.; BRUSAMARELLO-SANTOS, L.C.C.; SCHMIDT, M.A.; TADRA-SFEIR, M.Z.; PANKIEWICZ, V.C.S.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S.; PEDROSA, F.O.; SOUZA, E.M. *Herbaspirillum*-plant interactions: microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, p. 175-196, 2012.

MOREIRA, F.M. de S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** 2.ed. Lavras: UFLA, 2006. 729p.

MOREIRA, F.M.S.; SILVA, K.; NOBREGA, R.S.A.; CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, p. 74-99, 2010.

O'CALLAGHAN, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. **Applied Microbiology and Technology**, v. 100, p. 5729-5746, 2016.

OHLAND, R.A.A.; SOUZA, L.C.F. de; HERNANI, L.C.; MARCHETTI, M.E.; GONÇALVES, M.C. Culturas de cobertura do solo e adubação nitrogenada no milho em plantio direto. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 538-544, 2005.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains

of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, p. 1143-1150, 2007.

OKAMURA, R.S.; MARIANO, D.C.; ZACCHEO, P.V.C. Uso de fertilizante nitrogenado na cultura do milho: uma revisão. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, v. 4, p. 226-235, 2011.

REINHOLD-HUREK, B.; HUREK, T. Living inside plants: bacterial endophytes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 435-443, 2011.

ROSE, M.T.; DEAKER, R.; POTARD, S.; TRAN, C.K.T.; VU, N.T.; KENNEDY, I.R. The survival of plant growth promoting microorganisms in peat inoculant as measured by selective plate counting and enzyme-linked immunoassay. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 1649-1659, 2011.

SILVA, O.F. da; WANDER, A.E. **O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2013. 63 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 287). (ISSN 1678-9644).

WHITELAW, M.A. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. **Advances in Agronomy**, v. 69, p. 99–151, 2000.

OBJETIVO GERAL

Selecionar rizobactérias promotoras do crescimento vegetal com potencial para inoculação nas culturas do milho e feijão, e analisar a viabilidade da pré-inoculação de sementes de milho com produtos comerciais, em nível de laboratório.

CAPÍTULO I

TRAÇOS FUNCIONAIS PARA PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO E IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE RIZOBACTÉRIAS ISOLADAS DE MILHO E FEIJÃO

(Normas de acordo com a revista Pesquisa Agropecuária Tropical)

RESUMO: As culturas do milho e do feijoeiro são colonizadas por bactérias rizosféricas que podem contribuir para o crescimento e desenvolvimento dessas culturas. Entretanto, estudos de isolamento e caracterização dos traços funcionais dessas espécies são primordiais. Objetivou-se avaliar traços funcionais para promoção do crescimento vegetal e identificar, em nível molecular, rizobactérias isoladas de plantas de feijão e milho, visando o uso em estudos de inoculação. Para isolamento das bactérias, foram utilizados meios semis-seletivos livres de N. Os isolados obtidos foram testados quanto à produção de sideróforos, produção de enzimas celulasas e fosfatases, biossíntese de ácido indol acético (AIA), na presença e ausência de triptofano, e atividade antifúngica contra o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. Posteriormente, foi realizada extração do DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA para identificação das espécies. Dentre os 12 isolados, nenhum foi capaz de produzir sideróforos, celulasas e fosfatases nas condições testadas. Apenas dois isolados produziram AIA, em meio líquido, com resultados significativos nas duas condições testadas. A atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum* foi característica presente em seis isolados. A actinobactéria *Microbacterium oxidans* e a bactéria *Lysinibacillus fusiformis* foram as

espécies predominantes, com ocorrência tanto na rizosfera de milho quanto de feijão. Nenhuma rizobactéria multifuncional com potencial para produção de inoculantes e aplicação em larga escala foi obtida nesse trabalho.

PALAVRAS-CHAVE: bactérias promotoras do crescimento vegetal; bioprospecção; *Zea mays* L.; *Phaseolus vulgaris* L.

FUNCTIONAL TRAITS FOR PLANT GROWTH PROMOTION AND GENETIC IDENTIFICATION OF RHIZOBACTERIA ISOLATED FROM MAIZE AND COMMON BEAN

ABSTRACT: Maize and common bean crops are colonized by rhizospheric bacteria that can contribute to plant growth and development. However, studies about isolation and characterization of the functional traits of these species are primordial. This work aimed to evaluate functional traits for growth promotion and to identify at the molecular level, rhizobacteria species isolated from bean and maize plants, aiming their use in inoculation studies. For bacteria isolation, semi-selective nitrogen-free media were used. The isolates obtained were tested for siderophore production, cellulase and phosphatase production, indole acetic acid biosynthesis (IAA) in the presence and absence of tryptophan, and antifungal activity against the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Later, DNA extraction and sequencing of the 16S rRNA gene were performed to identify the species. Among the twelve isolates, none were able to produce siderophores, cellulases and phosphatases under the conditions tested. Only two isolates produced AIA in liquid medium, with significant results in the two conditions tested. The antifungal activity against *S. sclerotiorum* was present in six isolates. The actinobacteria *Microbacterium oxidans* and the bacteria *Lysinibacillus fusiformis* were the predominant species, occurring in both maize and bean rhizosphere. None multifunctional rhizobacteria with potential for inoculant production and large scale application was obtained in this work.

KEYWORDS: plant growth promoting bacteria; bioprospection; *Zea mays* L.; *Phaseolus vulgaris* L.

1.1 INTRODUÇÃO

As plantas são colonizadas por uma densidade de células de micro-organismos que pode superar o número de células vegetais, e quando se leva em consideração a quantidade de genes microbianos na rizosfera, os valores são consideravelmente maiores do que o de genes vegetais. Vários trabalhos relatam que, muitos desses micro-organismos, principalmente bactérias associadas à rizosfera, possuem efeitos benéficos significativos na germinação de sementes, vigor das plântulas, crescimento e desenvolvimento, nutrição vegetal, defesa contra patógenos e produtividade de diversas culturas (Mendes et al. 2013).

O uso dessas bactérias na agricultura, conhecidas como rizobactérias promotoras de crescimento de vegetal (RPCV), tem se mostrado potencialmente promissor na prática da agricultura sustentável com redução significativa do impacto dos estresses bióticos e abióticos sobre as culturas, o que reflete positivamente no aumento do potencial produtivo de culturas de interesse econômico (Goswami et al. 2016).

Apesar da importância da microbiota rizosférica para o crescimento vegetal ser amplamente reconhecida, pouco se conhece sobre a função e as características da maioria das RPCV e, para que o crescimento e a sanidade vegetal sejam beneficiados, é indispensável saber os micro-organismos presentes nesse microbioma, bem como os seus traços funcionais (Mendes et al. 2013).

As culturas do milho (*Zea mays* L.) e do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) estão entre as de maior importância econômica para a produção mundial de alimentos. Essas culturas, assim como outras gramíneas e leguminosas, são colonizadas por diversos gêneros de RPCV, dentre eles *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Herbaspirillum*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e *Sphingomonas*. Esses gêneros podem não só sobreviver como bactérias de vida livre na rizosfera, como também colonizar endofiticamente a planta hospedeira de forma inter ou intracelular (Monteiro et al. 2012, Dall’Agnol et al. 2013, Wekesa et al. 2016).

A inoculação de plantas com RPCV é uma técnica centenária que visa aumentar a produtividade das culturas e a performance das plantas em condições adversas, além de contribuir para o aumento da eficiência agrônômica pela redução de custos e poluição ambiental, já que o uso de estirpes eficientes possibilita reduzir, e até mesmo eliminar, a aplicação de fertilizantes industrializados nas culturas. Essa técnica,

anteriormente adotada para inoculação de rizóbios, é aplicada atualmente a outras espécies de bactérias promotoras de crescimento vegetal. No entanto, a eficiência da técnica precisa levar em consideração dois fatores cruciais: a eficiência do isolado e a tecnologia de inoculação apropriada (Souza et al. 2015, Bashan et al. 2016).

Considerando que, para a identificação de espécies de RPCV eficientes para uso como inoculantes nas culturas, os primeiros passos cruciais são os estudos de isolamento e caracterização fisiológica dessas espécies, objetivou-se com esse trabalho avaliar traços funcionais para promoção do crescimento vegetal e identificar, em nível molecular, rizobactérias isoladas de plantas de feijão e milho, visando o uso em estudos de inoculação.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Cultivo das plantas-isca

Plantas-isca de milho e feijão foram cultivadas em vasos contendo solo (Latosolo Vermelho distroférico), coletado na área experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, situada na latitude 17° 47' 53" S, longitude 50° 55' 41" W e altitude 742 m, no município de Rio Verde, GO. O clima da região, segundo a classificação de Köppen-Geiger, é classificado como Aw (clima tropical com estação seca). As características químicas e granulométricas do solo, cultivado com as plantas-isca, estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Características químicas e granulométricas do solo da área experimental do IF Goiano – Campus Rio Verde, GO (outubro de 2013).

pH (água)	P	K	Fe	Mn	Zn	Cu	Ca	Mg	Al	Mat.Org.	Sat. Bases	Areia	Silte	Argila
	-----mg dm ⁻³ -----						---cmol _c dm ⁻³ ---			g dm ⁻³	-----%-----			
6,1	15,2	255	9,0	60,2	6,0	1,3	4,4	1,3	0,03	34,9	55,6	36,2	17,4	46,4

Extratores: Mehlich 1 (P, K, Cu, Fe, Zn e Mn); KCl 1 N (Ca, Mg e Al).

O híbrido de milho utilizado foi DKB 30 PRO e a cultivar de feijão foi BRS estilo. As sementes foram semeadas em outubro de 2013 e as plantas cultivadas por 45 dias após a emergência (DAE) quando foram coletadas, acondicionadas em sacos plásticos e caixa de isopor com gelo, e enviadas ao Laboratório de Microbiologia Agrícola do IF Goiano – Campus Rio Verde para isolamento de RPCV.

1.2.2 Isolamento de bactérias rizosféricas em plantas de milho e feijão

Amostras de plantas inteiras de milho e feijão foram coletadas cuidadosamente para conservação do solo aderido ao sistema radicular. No laboratório, foram retirados 10g de raízes finas, em triplicatas, para cada cultura e colocadas em erlenmeyers contendo 90 mL de solução de salina NaCl (0,85%) esterilizada para agitação em agitador orbital, por 15 minutos. Após agitadas, as amostras foram diluídas sucessivamente até 10^{-7} e procedeu-se a inoculação de 100 μ L das diluições a partir de 10^{-3} , em meios de cultura semi-específicos livres de N. Foram utilizados os meios NFb semi-sólido (5 repetições por diluição) (Döbereiner et al. 1999) e YMA (3 repetições por diluição) (Fred & Waskman 1928). As placas com meio YMA foram incubadas em estufa bacteriológica a 28 °C, por 7 dias. A contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) nas placas com meio YMA foi feita diariamente. À medida que surgiam novas colônias, essas eram retiradas do meio e transferidas para outras placas para isolamento e purificação.

Os frascos com meio NFb foram avaliados após 7 dias considerando como frascos com crescimento positivo a presença de película aerotóxica em forma de véu. O número de frascos positivos de cada diluição foi utilizado para a estimativa do número de UFC por grama de raízes, utilizando o método do Número Mais Provável de Propágulos (NMP), seguindo a tabela de McCrady (Döbereiner et al. 1995). Os frascos positivos foram usados para isolamento de culturas puras com inoculações sequenciais em meio NFb sólido, NFb semi-sólido e repicagem em meio BDA até a formação de colônias puras e isoladas.

1.2.3 Avaliação in vitro dos traços funcionais para promoção de crescimento vegetal

Os isolados bacterianos obtidos foram avaliados quanto aos seus traços funcionais para promoção de crescimento vegetal, por meio de métodos qualitativos descritos por Cattelan (1999). A produção de sideróforos foi considerada positiva pela conversão da cor azul da solução CAS (adaptada de Schwyn & Neilands 1987) para alaranjanda. Avaliou-se a produção de celulase pela formação de halo de solubilização ao redor das colônias inoculadas em meio TSA, suplementado com celulose em pó. O antagonismo direto ao fungo patogênico *Sclerotinia sclerotiorum* em meio BDA

(Shadwick 1938) foi analisado através da inibição do crescimento do micélio fúngico pelas colônias bacterianas, inoculadas na forma de um círculo de 5 cm de diâmetro.

O teste para verificação da produção de fosfatase foi realizado em meio de cultura TSA (Ágar triptona soja), pH 7,3 conforme metodologia em que verifica-se a produção de fosfatase pelos isolados pela formação de um halo com coloração rósea em torno das colônias (Romeiro 2007). A avaliação qualitativa da capacidade de produção de AIA em meio TSA com 5 mM de triptofano, também seguiu a metodologia descrita por Cattelan (1999). Foram considerados positivos, os isolados em que se observou a formação de halo avermelhado na colônia, após saturação da membrana de nitrocelulose com solução de Salkowski (Gordon & Weber 1951). Para todos os traços funcionais avaliados, os isolados foram considerados positivos (+) na presença da característica ou negativos (-), na sua ausência.

Os isolados com capacidade de produção de AIA em meio sólido foram selecionados para um teste de quantificação de AIA em meio líquido, na presença e ausência de triptofano, seguindo o protocolo descrito por Ashgar et al. (2002) modificado. Alíquotas de 500 μL do pré-inóculo (10^8 UFC mL^{-1}) de cada isolado testado foram inoculadas em frascos contendo 7 mL de meio de DYGS líquido com suplementação de 100 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de triptofano e sem suplementação de triptofano. As amostras foram incubadas no escuro, em agitador orbital (80 rpm), a $28 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, por 3 dias.

Após o período de incubação, as culturas foram homogeneizadas e 1,5 mL de cada foram transferidos para microtubos e centrifugados a 12.000 rpm, por 5 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. A partir do sobrenadante de cada isolado foi retirado 1mL e colocado em tubos de ensaio em triplicata, e então adicionou-se 1mL do reagente de Salkowski (Gordon & Weber 1951). Os tubos foram agitados e incubados, por 30 min, no escuro para reação. A presença de AIA foi observada pela mudança da coloração da solução, que se torna intensamente rosa, à medida que as concentrações de AIA aumentam. Após o tempo de reação, as amostras tiveram sua absorbância medida em espectrofotômetro de UV-visível (530 nm). A concentração de AIA na solução foi estimada usando-se a curva de calibração com 0, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de AIA sintético, preparada a partir da solução padrão de AIA (300 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 7 x 2 (7 tratamentos de inoculação, na presença e ausência de

triptofano), em triplicata. O controle consistiu no meio de cultura esterilizado não-inoculado, com e sem triptofano e incubado nas mesmas condições dos demais tratamentos. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o software estatístico SISVAR (Ferreira 2011).

1.2.4 Identificação molecular e sequenciamento do gene 16S rRNA

Para a identificação molecular das bactérias isoladas, o gene codificador do RNA ribossomal 16S foi amplificado pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) e, posteriormente, sequenciado. As células bacterianas foram depositadas em microtubos para PCR contendo os reagentes para a PCR, agitando-se rapidamente a ponta do palito de dente dentro do líquido. A reação de PCR foi constituída de 10 μ L de tampão para PCR 5X, 1 μ L de *primer* fD1 (10 μ M), 1 μ L de *primer* rP1 (10 μ M), 1 μ L de dNTPs (10 mM), 0,2 μ L de GoTaq DNA polimerase (5 U/ μ L Promega) e 36,8 μ L de H₂O MilliQ autoclavada. Os *primers* fD1 (5' – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3') e rP1 (5' – ACGGTTACCTTGTTACGACTT – 3') foram descritos por Weisburg et al. (1991).

A amplificação foi realizada em termociclador (modelo T100, BioRad), nas etapas: desnaturação inicial a 94 °C/4 min, 40 ciclos de 94 °C/30 s – 60 °C/30 s – 72 °C/90 s e extensão final a 72 °C/4 min. A verificação da amplificação foi feita por eletroforese em gel de agarose (0,8%), acrescido de brometo de etídio (100 ng/mL), e registrada em fotodocumentador acoplado a transiluminador UV. Os produtos amplificados foram purificados através de precipitação com polietilenoglicol (Schmitz & Riesner 2006) e os produtos da purificação submetidos à reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia (Sanger et al. 1977).

A reação constituiu de 5 μ L de produto de PCR, 1 μ L de reagente Big Dye 3.1 (Applied Biosystems), 1,5 μ L de tampão de diluição, 0,3 μ L de *primer* fD1 ou rP1 (10 M) e 2,2 μ L de H₂O MilliQ autoclavada. A reação foi realizada em termociclador (modelo T100, BioRad) com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95 °C/1 min seguida de 25 ciclos de 95 °C/5 s – 60 °C/4 min. Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados pela adição de 40 μ L de isopropanol 75%, seguida de centrifugação a 12.000 rpm/10 min. Foram adicionados mais 100 μ L de isopropanol 75% e novamente centrifugado a 12.000 rpm/5 min. Após descartar o sobrenadante, o

sedimento foi secado e ressuspensionado em 10 µL de formamida e desnaturado a 95 °C/2 min. O sequenciamento foi realizado em sequenciador capilar 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas com sequências de espécies tipo depositadas no Ribosomal Database Project, release 10 (Cole et al. 2009).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.3.1 Isolamento de bactérias rizosféricas em plantas de milho e feijão

Aos 45 DAE das plantas-isca, todas as amostras coletadas para isolamento de RPCV apresentavam sistema radicular bem formado. As plantas de feijão não possuíam sinais de nodulação. O intuito do uso de dois meios de cultura com formulação livre de N (YMA e NFb semi-sólido) foi pré-selecionar, ainda na etapa de isolamento, populações de bactérias diazotróficas simbióticas e também associativas. O número de UFC de bactérias isoladas da rizosfera das plantas de feijão em meio YMA foi de $8,6 \times 10^3$ UFC g⁻¹ raízes e em meio NFb a população estimada foi de $1,5 \times 10^2$ UFC g⁻¹ raízes. Na rizosfera das plantas-isca de milho, as médias populacionais de rizobactérias foram de $2,3 \times 10^3$ e $2,8 \times 10^2$ UFC g⁻¹ raízes, nos meios YMA e NFb, respectivamente (Tabela 2). Estima-se que cerca de 1 a 2% da população de bactérias que colonizam a rizosfera das plantas, são capazes de promover o crescimento vegetal através de um ou mais mecanismos (Antoun & Kloepper 2001; Beneduzi et al. 2012).

Tabela 2. Número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias rizosféricas isoladas em meio YMA e NFb semi-sólido, em plantas-isca de feijão e milho, em Rio Verde, GO.

Cultura	UFC g ⁻¹ raízes		Número de isolados
	YMA	NFb	
Feijão	$8,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	5
Milho	$2,3 \times 10^3$	$2,8 \times 10^2$	7

Após o processo de isolamento e purificação, foram obtidos cinco isolados oriundos da rizosfera do feijoeiro (F1, F2, F3, F4 e F5), e sete da rizosfera do milho (M1, M2, M3, M4, M5, M7 e M8), todos resultantes do isolamento em meio YMA (Tabela 2). A caracterização fenotípica das bactérias através do teste de coloração gram mostrou que F1, M1, M2, M3, M5 e M8 são bactérias gram-positivas com células em

formato de bastonete. Os isolados F2, F3, F4, F5, M6 e M7 são gram-positivos com células em forma de bacilo.

Os isolados obtidos a partir dos frascos com meio NFb semi-sólido, não se mostraram resistentes ao procedimento de purificação. O uso do meio NFb semi-sólido seguido de múltiplos subcultivos para isolamento e purificação, provavelmente dificultou a sobrevivência dos isolados microaerofílicos. Mirza & Rodrigues (2012) compararam a técnica de isolamento em meio semi-sólido com a contagem direta em placas com meio sólido e consideraram a técnica de plaqueamento direto como mais efetiva para obtenção de isolados.

1.3.2 Avaliação in vitro dos traços funcionais para a promoção do crescimento vegetal

Dentre os 12 isolados que tiveram seus traços funcionais avaliados para caracterização do potencial de promoção do crescimento vegetal, 10 isolados produziram resultados positivos em pelo menos uma das características avaliadas.

Embora a habilidade de produção de sideróforos seja uma característica importante em RPCV, nenhum dos isolados testados produziu este traço funcional (Tabela 3). A produção de sideróforos, agentes quelantes do íon férrico (Fe^{3+}), produzidos e secretados por alguns micro-organismos quando em condições de deficiência de Fe^{3+} (Benite et al. 2002), é uma estratégia especializada e tem sido intensamente estudada para aplicação na agricultura com foco na fertilidade do solo e principalmente no biocontrole de fungos patogênicos (Ali & Vidhale 2013). Estirpes de *Pseudomonas fluorescens* produtoras de sideróforos tiveram maior taxa de crescimento quando inoculadas no solo, chegando a densidades populacionais três vezes maior em comparação com estirpes não-produtoras (Luján et al. 2015).

Tabela 3. Presença (+) ou ausência (-) de capacidade de produção de sideróforos, produção de celulases e fosfatases, atividade antifúngica e produção de ácido indol acético (AIA) por rizobactérias isoladas de plantas de feijão e milho, em Rio Verde, GO.

Isolado	Origem	Sideróforos	Celulases	Fosfatases	Atividade antifúngica	AIA
F1	Feijão	-	-	-	-	-
F2	Feijão	-	-	-	-	-
F3	Feijão	-	-	-	+	+
F4	Feijão	-	-	-	-	+
F5	Feijão	-	-	-	-	-
M1	Milho	-	-	-	+	-
M2	Milho	-	-	-	+	-
M3	Milho	-	-	-	+	+
M5	Milho	-	-	-	-	+
M6	Milho	-	-	-	+	-
M7	Milho	-	-	-	-	+
M8	Milho	-	-	-	+	+

O resultado do teste para avaliação da produção de celulases também foi negativo para todos os isolados (Tabela 3). A produção de enzimas do tipo celulase é um traço funcional interessante em estirpes promotoras de crescimento, principalmente com foco para uso no controle biológico de fitopatógenos, pois a celulase degrada a parede celular dos fungos inibindo o seu crescimento (Reetha et al. 2014).

Nenhum isolado testado apresentou reação colorimétrica positiva indicativa de produção de fosfatases. A liberação de fosfatases por RPCV é um mecanismo importante de biodisponibilização e mineralização de fosfatos. Hussain et al. (2013) testaram 72 isolados de rizobactérias para promoção do crescimento de milho e detectaram a atividade de fosfatases em 55 isolados.

Na avaliação da atividade antifúngica dos isolados, o fungo *S. sclerotiorum*, agente causal do mofo-branco, foi escolhido como alvo pela sua importância econômica em função da severidade e das perdas provocadas pela doença em inúmeras culturas de valor comercial, incluindo o feijão. Seis dos isolados testados neste trabalho (F3, M1, M2, M3, M6 e M8) apresentaram potencial de inibição do crescimento micelial de *S.*

sclerotiorum no teste de antagonismo direto, indicativo de presença de atividade antifúngica (Tabela 3). Rizobactérias antagonistas podem produzir substâncias como sideróforos e antibióticos capazes de controlar ou inibir o crescimento de fitopatógenos com efeitos indiretos na promoção do crescimento vegetal (Beneduzi et al. 2012). Como neste trabalho nenhum isolado foi capaz de produzir sideróforos, provavelmente a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* pelos isolados F1, M1, M2, M3, M6 e M8 ocorreu pela liberação de antibióticos no meio.

No teste qualitativo em placas de Petri, a capacidade de produção de AIA em meio TSA suplementado com 5mM triptofano foi característica presente nos isolados F3, F4, M3, M5, M7 e M8 (Tabela 3). Posteriormente, esses isolados foram então avaliados para quantificação dos teores de AIA produzidos em meio DYGS líquido, na presença e ausência de triptofano (Tabela 4).

Tabela 4. Teores de ácido indol acético ($\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) produzidos em meio DYGS com e sem triptofano após inoculação de rizobactérias isoladas de milho e feijão, em Rio Verde, GO.

Isolado	Triptofano	
	Com	Sem
	----- $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$ -----	
F3	0,09 Ba	0 Ba
F4	0,06 Ba	0 Ba
M3	6,16 Aa	3,04 Ab
M5	0,09 Bb	3,13 Aa
M7	0,15 Ba	0 Ba
M8	0,15 Ba	0 Ba
Controle não inoculado	0 Ba	0 Ba

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas (coluna) e minúsculas (linha), não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

A biossíntese de AIA é um dos principais traços funcionais presentes em rizobactérias para estimular e promover o crescimento vegetal das culturas (Mohite et al. 2013). Esse fitormônio, quando liberado por bactérias na rizosfera, possui efeitos diretos nas raízes das plantas, que aumentam a formação de raízes laterais e pêlos radiculares, melhorando a absorção de nutrientes (Datta & Basu 2000).

No teste quantitativo, a presença de AIA no sobrenadante dos isolados analisados foi confirmada após a reação colorimétrica do reagente de Salkowski, com desenvolvimento de cor rosa mais intenso nas amostras com maior concentração de AIA. Dentre os seis isolados testados, apenas M3 e M5 apresentaram teores de AIA significativos em pelo menos uma das condições testadas (presença ou ausência de triptofano). Os demais isolados produziram baixas quantidades de AIA e não diferiram estatisticamente do tratamento controle não inoculado (Tabela 4).

O isolado M3 foi capaz de produzir AIA através das duas rotas bioquímicas testadas, ou seja, tanto na presença quanto na ausência do aminoácido precursor L-triptofano. A maior concentração de AIA, produzida pelo isolado M3 (6,16 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) foi detectada nas condições em que o triptofano estava presente (Tabela 4), sendo essa, possivelmente, a rota preferencial para a produção de AIA por esse isolado. Hussain et al. (2013) também observaram isolados de rizobactérias com potencial de produção de AIA pelas duas rotas metabólicas, entretanto, assim como neste trabalho, os valores detectados na ausência de triptofano, foram consideravelmente menores do que os observados no meio que recebeu suplementação.

Para o isolado M5, por outro lado, a habilidade de produção de AIA em teores significativos (3,13 $\mu\text{g AIA mL}^{-1}$) ocorreu na condição de ausência de triptofano (Tabela 4). A biossíntese de AIA por rizobactérias pode ocorrer através de seis rotas biossintéticas diferentes, cinco destas são dependentes da presença de triptofano enquanto a rota triptofano-independente é ativada na presença de indol-3-glicerolfosfato (Tewari & Arora, 2013). Djuric et al. (2011) analisaram a produção de AIA por isolados de *Pseudomonas* da rizosfera de milho e em três dos isolados testados, a produção de AIA foi detectada apenas na ausência de triptofano.

1.3.4 Identificação molecular e sequenciamento do gene 16S rRNA

A identificação molecular por sequenciamento do gene 16S rRNA das rizobactérias isoladas de milho e feijoeiro resultou na predominância das espécies *Microbacterium oxidans* e *Lysinibacillus fusiformis*. A espécie *M. oxidans* foi mais frequente na cultura do milho (5 isolados) enquanto na cultura do feijão, três dos isolados foram identificados como *L. fusiformis*. Um isolado originário da rizosfera do feijoeiro foi identificado como *Bacillus megaterium* (Tabela 5).

Tabela 5. Identificação molecular com base no sequenciamento da região 16S rRNA e traços funcionais de rizobactérias isoladas de plantas de feijão e milho, em Rio Verde, GO.

Isolado	Origem	Traços funcionais	Identificação baseada no sequenciamento da região 16 S
F1	Feijão	-	<i>Microbacterium oxidans</i>
F2	Feijão	-	<i>Bacillus megaterium</i>
F3	Feijão	Atividade antifúngica	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
F4	Feijão	-	<i>L. fusiformis</i>
F5	Feijão	-	<i>L. fusiformis</i>
M1	Milho	Atividade antifúngica	<i>M. oxidans</i>
M2	Milho	Atividade antifúngica	<i>M. oxidans</i>
M3	Milho	Atividade antifúngica e biossíntese de AIA	<i>M. oxidans</i>
M5	Milho	Biossíntese AIA	<i>M. oxidans</i>
M6	Milho	Atividade antifúngica	<i>L. fusiformis</i>
M7	Milho	-	<i>L. fusiformis</i>
M8	Milho	Atividade antifúngica	<i>M. oxidans</i>

Seis isolados foram classificados como *Microbacterium oxidans*, uma actinobactéria pouco relatada em artigos científicos com foco em promoção de crescimento de vegetal. Nesse trabalho, isolados de *M. oxidans* apresentaram traços funcionais indicativos de atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum* e dois deles (M3 e M5) foram os únicos com capacidade de biossíntese de AIA comprovada no teste quantitativo (Tabela 5). Egamberdieva (2008) isolou uma estirpe de *Microbacterium* sp. da filosfera de *Pisum sativum* cv. Grapis. com potencial de produção de AIA e antagonismo ao fungo *Fusarium culmorum*. Costa et al. (2012) relataram isolados do gênero *Microbacterium* colonizando endofiticamente folhas de plantas de feijoeiro (*P. vulgaris*). Outros relatos de estirpes do gênero *Microbacterium* com colonização rizosférica e endofítica podem ser encontrados na literatura (Zinniel et al. 2002, Zakhia et al. 2006).

Os isolados F3, F4, F5, M6 e M7 foram classificados como *Lysinibacillus fusiformis* (Tabela 5). Dentre os cinco isolados da espécie, os isolados F3 e M6 apresentaram atividade antifúngica contra *S. sclerotiorum*. Isolados de bactérias

rizosféricas do gênero *Lysinibacillus* com potencial de controle de doenças na cultura do milho, causadas pelo fungo *Fusarium verticillioides*, foram encontrados por Abiala et al. (2015). A estirpe *L. fusiformis* B-CM18 isolada da rizosfera da leguminosa *Cicer arietinum* (grão-de-bico) demonstrou atividade antifúngica contra vários fungos fitopatogênicos (Singh et al. 2013).

Para que se tornem micro-organismos recomendados para produção em larga escala e comercializados para inoculação de culturas como o milho e o feijoeiro, além dos traços funcionais para promoção do crescimento vegetal, os isolados também precisam ser resistentes à produção massal sem perder sua funcionalidade e submetidos a testes em nível de campo para validação de sua eficiência agrônômica (O'Callaghan et al. 2016).

1.4 CONCLUSÕES

As principais espécies isoladas da rizosfera de plantas de milho e feijoeiro cultivadas em solo do Cerrado, utilizando-se meios de cultura semi-seletivos livres de N, são a actinobactéria *Microbacterium oxidans* e a bactéria *Lysinibacillus fusiformis*.

Isolados de *M. oxidans* são capazes de produzir AIA utilizando vias dependentes e independentes de triptofano.

Os isolados das espécies *L. fusiformis* e *M. oxidans* possuem potencial para aplicação em testes visando o controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum*.

Nenhuma rizobactéria testada apresentou multifuncionalidade para que pudesse ser considerada como isolado com potencial para produção de inoculante e aplicação em larga escala.

1.5 AGRADECIMENTO

À SETEC/MEC e ao CNPq pelo apoio financeiro para execução deste trabalho (Chamada Pública MEC/SETEC/CNPq N° 94/2013: Apoio a Projetos Cooperativos de Pesquisa Aplicada e de Extensão Tecnológica).

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIALA, M.; ODEBODE, A.; HSU, S.; BLACKWOOD, C. Phytobeneficial properties of bacteria isolated from the rhizosphere of maize in southwestern nigerian soils. *Applied Environmental Microbiology*, v. 81, p. 4736–4743, 2015.

ALI, S.S.; VIDHALE, N.N. Bacterial siderophore and their application: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 2, p. 303-312, 2013.

ANTOUN, H.; KLOPPER, J.W. Plant growth promoting rhizobacteria. In: BRENNER, S.; MILLER, J.H. Ed. *Encyclopedia of Genetics*. Academic: 2001. p. 1477–1480.

ASGHAR, H.N.; ZAHIR, Z.A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L. *Biology and Fertility of Soils*, v. 35, p. 231-237, 2002.

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

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P.; MACHADO, B.C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. *Química Nova*, v. 25, p. 1155-1164, 2002.

COLE, S.E.; LARIVIERE, F.J.; MERRIKH, C.N.; MOORE, M.J. A convergence of rRNA and mRNA quality control pathways revealed by mechanistic analysis of nonfunctional rRNA decay. *Molecular Cell*, v. 34, p. 440-450, 2009.

COSTA, L.E.O.C.; QUEIROZ, M.V.; BORGES, A.C.; MORAES, C.A.; ARAUJO, E.F.; DATTA, C.; BASU, P. Indole acetic acid production by a *Rhizobium* species from root nodules of a leguminous shrub *Cajanus cajan*. *Microbiology Research*, v. 155, p. 123–127, 2002.

DJURIC S.; PAVIC, A.; JARAK, M.; PAVLOVIC, S.; STAROVIC, M.; PIVIC, R.; JOSIC, D. Selection of indigenous fluorescent pseudomonas isolates from maize rhizospheric soil in Vojvodina as possible PGPR. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 16, p. 6580-6590, 2011.

EGAMBERDIEVA, D. Plant growth promoting properties of rhizobacteria isolated from wheat and pea grown in loamy sand soil. *Turkish Journal of Biology*, v. 32, p. 9-15, 2008.

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, v. 26, p. 192-195, 1951.

HUSSAIN, M.I.; ASGHAR, H.N.; ARSHAD, M.; SHAHBAZ, M. Screening of multi-traits rhizobacteria to improve maize growth under axenic conditions. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, v. 23, p. 514-520, 2013.

LUJÁN, A.M.; GOMEZ, P.; BUCKLING, A. Siderophore cooperation of the bacterium *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Biology Letters*, v. 11, p. 1-4, 2015.

MIRZA, B.S.; RODRIGUES, J.L.M. Development of a direct isolation procedure for free-living diazotrophs under controlled hypoxic conditions. *Applied Environmental Microbiology*, v. 78, p. 5542-5549, 2012.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, v.13, p. 638-649, 2013.

REETHA, S.; BHUVANESWARI, G.; THAMIZHINIYAN, P.; RAVI MYCIN, T. Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (*Allium cepa*.L).

International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, v. 3, p. 568- 574, 2014.

ROMEIRO, R.S. *Controle biológico de doenças de plantas: procedimentos*. Viçosa, MG: UFV, 2007. 172p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 74, p. 5463–5467, 1977.

SCHMITZ, A.; RIESNER, D. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical Biochemistry*, v. 354, p. 311-313, 2006.

SINGH, R.K.; KUMAR, D.P.; SOLANKI, M.K.; SINGH, P.; SRIVASTVA, A.K.; KUMAR, S.; KASHYAP, P.L.; SAXENA, A.K.; SINGHAL, P.K.; ARORA, D.K. Optimization of media components for chitinase production by chickpea rhizosphere associated *Lysinibacillus fusiformis* B-CM18. *Journal of Basic Microbiology*, v. 53, p. 451–460, 2015.

TEWARI, S.T.; ARORA, N.K. Transactions among microorganisms and plant in the composite rhizosphere habitat. In: ARORA, N.K. (ed.) *Plant microbe symbiosis: fundamental and advances*. Springer, p. 1-50, 2013.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 697-703, 1991.

ZAKHIA, F.; JEDER, H.; WILLEMS, A.; DREYFUS, B.; DE LAJUDIE, P. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. *Microbial Ecology*, v. 51, p. 375–393, 2006.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.;

VIDAVER, A.K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 2198-2208, 2002.

CAPÍTULO II

PRÉ-INOCULAÇÃO DE SEMENTES DE MILHO COM *Azospirillum brasilense*: METODOLOGIAS PARA RECUPERAÇÃO DE CÉLULAS E COMPATIBILIDADE DE PRODUTOS

(Normas de acordo com a revista Pesquisa Agropecuária Tropical)

RESUMO: Objetivou-se definir uma metodologia de recuperação de células de *A. brasilense* em sementes de milho inoculadas e avaliar a viabilidade e compatibilidade de produtos na pré-inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*. Na primeira etapa, sementes de milho foram inoculadas com *A. brasilense* Abv5 Abv6 e procedeu-se a recuperação de células após 2h. Foram testadas três soluções diluentes (sacarose 4%, solução salina com tween 80 e água deionizada) e três meios de cultura para plaqueamento (NFb semi-sólido, NFb sólido e meio batata). Após definição do diluente e meio de cultura adequados, na segunda etapa, sementes de milho foram pré-tratadas com fungicidas/inseticidas recomendados para o tratamento de sementes de milho, um aditivo protetor e inoculadas com *A. brasilense*. A recuperação de células sobre as sementes foi realizada às 2h e aos 7, 14 e 21 dias após o armazenamento. A solução diluente mais adequada para recuperação de células de *A. brasilense* foi a solução de sacarose 4% como recuperação de $3,5 \times 10^4$ UFC semente⁻¹, no meio NFb sólido e $3,7 \times 10^4$ UFC semente⁻¹, no meio batata. Esses dois meios podem ser usados para plaqueamento em testes de recuperação de células, porém, no meio batata observou-se maior contaminação. No pré-tratamento das sementes de milho, o maior número de células foi recuperado no tratamento com piraclostrobina+tiofanato metílico+fipronil às

2h após o tratamento com $1,12 \times 10^5$ UFC semente⁻¹ recuperadas. Todos os tratamentos tiveram resultados estatisticamente iguais ao controle, aos 7 dias de armazenamento.

PALAVRAS-CHAVE: tratamento antecipado de sementes; inoculante líquido; produtos fitossanitários.

PRE-INOCULATION OF MAIZE SEEDS WITH *Azospirillum brasilense*: METHODS FOR CELL RECOVERING AND COMPATIBILITY OF PRODUCTS

ABSTRACT: The objective of this work was to define a methodology for the recovery of *A. brasilense* cells in inoculated maize seeds as well as to evaluate the viability and compatibility of products in the pre-inoculation of seeds with *A. brasilense*. In the first step, maize seeds were inoculated with *A. brasilense* Abv5 Abv6 and cells were recovered after 2h. Three diluent solutions (4% sucrose solution, saline solution with tween 80 and deionized water) and three culture media for plating (semi-solid NFb, solid NFb and potato medium) were tested. After definition of the appropriate diluent and culture medium, in the second stage, maize seeds were pre-treated with fungicides/insecticides recommended for the treatment of maize seeds, a protective additive and inoculated with *A. brasilense*. The recovery of cells on the seeds was performed at 2h and at 7, 14 and 21 days after storage. The most suitable diluent solution for recovery of *A. brasilense* cells was the 4% sucrose solution with recovery of 3.5×10^4 CFU seed⁻¹ in the solid NFb medium and 3.7×10^4 CFU seed⁻¹ in the potato medium. These two media can be used for plating in cell recovery tests, but in the potato medium a greater contamination was observed. In pre-treatment of maize seeds, the highest number of cells was recovered in the treatment with pyraclostrobin+ thiophanate-methyl+fipronil, at 2 h after treatment, with 1.12×10^5 CFU seed⁻¹ recovered. All treatments had statistically equal results to the control at 7 days of storage.

KEYWORDS: anticipated seed treatment; liquid inoculant; plant protection products.

2.1 INTRODUÇÃO

O crescimento acelerado da população mundial e o aumento da demanda por alimento têm impulsionado a produção agrícola e, por consequência, a necessidade do uso de fertilizantes e outros produtos sintéticos como fungicidas, herbicidas e inseticidas. No entanto, o uso desses produtos aumenta o custo de produção, além de impactar negativamente o agrossistema, comprometendo a qualidade do solo e da água (O’Callaghan 2016; Oerke 2006). Nesse cenário, o uso de produtos biológicos como inoculantes contendo bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV), é uma alternativa para aumentar a sustentabilidade da produção agrícola, com benefícios à fertilidade do solo, nutrição vegetal, crescimento e desenvolvimento das culturas, e supressão de fitopatógenos (Gupta et al. 2015).

O gênero *Azospirillum* abrange espécies de BPCV que se associam a diversas plantas, dentre elas culturas de interesse comercial, que respondem à inoculação dessas bactérias com aumentos consideráveis na produtividade. No Brasil, a inoculação das estirpes de *A. brasilense* Abv-5 Abv-6 contribuiu para o aumento de até 30% no rendimento de gramíneas como o milho e o trigo. Além disso, a tecnologia de co-inoculação de *A. brasilense* com *Bradyrhizobium japonicum* e *Rhizobium tropici* mostrou benefícios expressivos na produtividade das culturas da soja e do feijoeiro (Hungria 2010, Hungria et al. 2013).

Um dos principais métodos para aplicar micro-organismos benéficos na agricultura é pela inoculação das sementes, em que as células microbianas são colocadas em contato com as sementes de modo a colonizar as raízes das plântulas já nos primórdios da germinação. Entretanto, um dos desafios para a indústria de inoculantes é desenvolver formulações e tecnologias de inoculação que garantam a viabilidade dos inoculantes e a capacidade das estirpes de sobreviver, competir com a microbiota nativa do solo e colonizar as plantas após a semeadura (O’Callaghan 2016).

A qualidade do procedimento de inoculação, que geralmente é realizado em campo, com grandes quantidades de sementes e sem equipamentos adequados é comprometida, na maioria das vezes, por enfrentar condições adversas como altas temperaturas, baixa umidade e solo seco no momento da semeadura, e também, pela incompatibilidade do inoculante com produtos como fungicidas e inseticidas usados no tratamento fitossanitário de sementes (Date et al. 2001, Bashan et al. 2014).

A compatibilidade entre produtos usados no tratamento de sementes com inoculantes de *Bradyrhizobium* já é um problema conhecido na cultura da soja que pode afetar severamente a sobrevivência das células nas sementes inoculadas e a performance do inoculante (Campo et al. 2009) e esse problema certamente também pode comprometer a eficiência da inoculação de sementes com *Azospirillum*. Vogel et al. (2015) observaram que o uso dos fungicidas Captan e Carboxin+Thiram em combinação com a inoculação de *A. brasilense* no tratamento de sementes de trigo demonstrou efeito deletério sobre a bactéria.

Uma técnica que pode ser uma alternativa para assegurar a qualidade e eficiência da inoculação, é a pré-inoculação de sementes antes da comercialização ou por alguns dias que antecedem a semeadura (Zilli et al. 2010). A tecnologia de pré-inoculação deve se basear na seleção de cepas resistentes aos estresses abióticos após aplicação sobre as sementes, no emprego de protetores microbianos e osmoprotetores que garantam a sobrevivência das células, na avaliação da compatibilidade dos produtos biológicos com os produtos químicos adotados no tratamento de sementes e na profissionalização das operações de tratamento das sementes (Anta 2016).

Com o crescimento do uso de inoculantes de *Azospirillum* na agricultura, a tendência é que logo a inoculação antecipada também seja possível para essas bactérias, mas para isso, investimentos na pesquisa e no desenvolvimento de produtos são essenciais. Outra questão importante é a definição de uma metodologia para recuperação de células de *Azospirillum* em sementes inoculadas para que seja possível estabelecer parâmetro e padrões para tais pesquisas. Portanto, com este trabalho, objetivou-se definir uma metodologia de recuperação de células de *A. brasilense* em sementes de milho inoculadas e avaliar a viabilidade e compatibilidade de produtos na pré-inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios descritos neste trabalho foram conduzidos no Laboratório de Microbiologia Agrícola do IF Goiano – Campus Rio Verde, entre agosto de 2015 e setembro de 2016.

2.2.1 Recuperação e quantificação de células de *Azospirillum brasilense* inoculadas sobre sementes de milho.

Sementes do híbrido milho DKB 30 PRO foram inoculadas com um inoculante comercial líquido recomendado para a cultura do milho, contendo a bactéria diazotrófica associativa *Azospirillum brasilense* estirpes Abv-5 e Abv-6 com garantia de concentração mínima de 2×10^8 UFC mL⁻¹ de produto. Para inoculação, seguiu-se a dose recomendada pelo fabricante correspondente a 3×10^5 UFC semente⁻¹.

Para inoculação, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos com capacidade para 5 kg e, após a aplicação do inoculante com o auxílio de uma seringa, foram agitadas em movimentos rotatórios para distribuição do produto de maneira uniforme. Posteriormente, o saco plástico contendo as sementes foi deixado aberto para secagem do produto. A unidade experimental consistiu de 1 kg de sementes de milho nuas, ou seja, sem aplicação prévia de nenhum produto fitossanitário para evitar interferência nos resultados obtidos.

Duas horas após a inoculação, amostras de 100 sementes foram coletadas e colocadas em erlenmeyers com capacidade para 150 mL contendo 100 mL das soluções diluentes para agitação em agitador orbital a 90 rpm, por 15 minutos. Os diluentes testados foram: solução de sacarose 4%, solução salina (NaCl 0,85%) com Tween 80 (2,5% p/v) e água deionizada. Os meios de cultura testados para a recuperação de células de *A. brasilense* foram: meio NFb semi-sólido em frascos tipo penicilina (Döbereiner, 1991), meio NFb sólido (Döbereiner 1991) e meio batata recomendado para purificação de isolados de *Azospirillum* (Döbereiner et al. 1999).

Depois da agitação, alíquotas de 1 mL de cada tratamento foram retiradas, transferidas para tubos de ensaio com as soluções diluentes e diluídas sucessivamente até a diluição 10^{-4} . Na sequência, 100 µL das três últimas diluições foram retirados e inoculados em triplicatas em cada meio de cultura. As placas de Petri e os vidros de penicilina foram incubadas em estufa de crescimento por 7 dias a 28 °C e a avaliação dos frascos com formação de película microaerofílica e contagem do número de UFC nas placas foi feita diariamente entre o 4° e 10° dia.

A contabilização do número de UFC viáveis dos tratamentos com meio NFb semi-sólido seguiu o método do número mais provável (NMP), através da tabela de McCrady (Pochon & Tardieux 1957) descrita no Art. 16 da Instrução Normativa (IN) n° 30, de 12 de novembro de 2010 (Brasil 2010). Nos demais tratamentos, as placas de

Petri da diluição que continha entre 30-300 UFC foram contadas com o auxílio de um contador de colônias e o número de UFC viáveis por semente foi dado pela fórmula: $f \times N$, em que f = fator de diluição e N = número de colônias por placa.

O experimento foi instalado em delineamento experimental inteiramente casualizado, arranjo fatorial 3x3, em que as soluções diluentes e os meios de cultura foram os fatores. Para confirmação dos resultados obtidos, o experimento foi repetido três vezes no decorrer de seis meses (agosto, outubro e dezembro de 2015) e os valores apresentados representam a média das três repetições. Os dados foram analisados por análise de variância e teste Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o software SISVAR (Ferreira 2011).

2.2.2 Compatibilidade de produtos e viabilidade da pré-inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense*

Para verificação do efeito da pré-inoculação de sementes de milho com *A. brasilense* e a compatibilidade do inoculante com fungicidas/inseticidas recomendados para a cultura, foram utilizadas sementes nuas do híbrido de milho DKB 30 PRO. As sementes foram tratadas com um inoculante líquido, um aditivo protetor e cinco produtos fitossanitários fungicidas/inseticidas recomendados para tratamento industrial de sementes na cultura do milho, totalizando cinco tratamentos de pré-inoculação. O tratamento controle consistiu nas sementes inoculadas com o inoculante líquido, na ausência de qualquer outro produto.

O inoculante utilizado foi um produto comercial de formulação líquida recomendado para a cultura do milho, contendo a bactéria diazotrófica associativa *Azospirillum brasilense* estirpes Abv-5 e Abv-6, com garantia de concentração mínima de 2×10^8 UFC mL⁻¹ de produto. Ao todo, foram testados seis tratamentos e todas as análises de recuperação de células foram feitas em triplicata. Cada unidade experimental constou de 1 kg de sementes. Todos os procedimentos de análise foram realizados de acordo com as instruções normativas 30 (Brasil 2010) e 13 (Brasil 2011). A descrição dos tratamentos e doses recomendadas para cada produto estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos produtos e dosagens utilizadas para a pré-inoculação de sementes de milho, em Rio Verde, GO.

Trat.	Inoculante	Dose (UFC semente ⁻¹)	Aditivo	Dose (mL kg ⁻¹)	Produto fitossanitário (princípio ativo)	Dose (mL kg ⁻¹)
1	<i>A. brasilense</i>	3x10 ⁵	Sem	-	-	-
2	<i>A. brasilense</i>	3x10 ⁵	Com	2	Piraclostrobina+tiofanato metílico+fipronil	2
3	<i>A. brasilense</i>	3x10 ⁵	Com	2	Thiamethoxam	6
4	<i>A. brasilense</i>	3x10 ⁵	Com	2	Metalaxil-m + fludioxonil	1
5	<i>A. brasilense</i>	3x10 ⁵	Com	2	Clorantraniliprole	3,5
6	<i>A. brasilense</i>	3x10 ⁵	Com	2	Ciantraniliprole	3,5

Para a aplicação dos produtos, as sementes foram colocadas em sacos plásticos com capacidade para 5 kg. O tratamento das sementes foi realizado primeiramente com o produto fitossanitário e, posteriormente, com a mistura do inoculante + aditivo protetor. Em cada etapa do tratamento, os sacos foram fechados mantendo um volume de ar semelhante ao ocupado pelas sementes e agitados com movimentos rotatórios para completa distribuição dos produtos. Ao fim da pré-inoculação e após secagem completa dos produtos, as sementes foram transferidas para sacos duplos de papel e acondicionadas no laboratório, sob condições de umidade de 55% ± 7% e temperatura média de 27 °C ± 1,5 °C.

A sobrevivência das células de *A. brasilense* nas sementes inoculadas foi avaliada às 2 h e aos 7, 14 e 21 dias após o tratamento. Como ainda não há metodologia oficial para recuperação de células de bactérias associativas, foi adotada a metodologia que apresentou os melhores resultados no teste descrito no item 2.2.1. Amostras de 100 sementes foram coletadas e transferidas para erlenmeyers com capacidade para 150 mL contendo 100 mL de solução de sacarose 4% e deixadas em agitação em agitador orbital a 90 rpm, por 15 minutos. De cada unidade experimental, foram coletadas três amostras.

Alíquotas de 1 mL de cada tratamento foram retiradas dos erlenmeyers, transferidas para tubos de ensaio com solução de sacarose e diluídas sucessivamente até a diluição 10⁻⁴. Então, 100 µL das três últimas diluições foram retirados e inoculados em placas de Petri (seis repetições por diluição) contendo meio NFb sólido (Döbereiner

1991). As placas de Petri foram incubadas em estufa de crescimento a 28 °C, e após 7 dias de incubação realizou-se a quantificação do número de UFC de *A. brasilense*. Foram consideradas para contagem, as placas de Petri da diluição que continha entre 30-300 UFC e o número de UFC viáveis por semente foi dado pela fórmula: $f \times N$, em que f = fator de diluição e N = número de colônias por placa.

Para confirmação dos resultados obtidos, o experimento foi repetido três vezes no decorrer de seis meses (março, junho e agosto de 2016) e os resultados apresentados representam a média das três repetições. As médias foram submetidas à análise de variância e as médias dos tratamentos comparadas ao controle pelo teste Dunnet bilateral ($p \leq 0,05$), utilizando o software estatístico SISVAR (Ferreira 2011).

2.2.3 Controle de qualidade dos inoculantes

Previamente à inoculação das sementes utilizadas nos itens 2.2.1 e 2.2.2, foram realizadas análises de controle de qualidade dos inoculantes conforme IN nº 30, de 12 de novembro de 2010 (Brasil 2010). O procedimento para abertura das embalagens foi realizado em câmara de fluxo laminar. Antes da abertura, as embalagens foram previamente desinfestadas com álcool 70% e homogeneizadas vigorosamente. Para o controle de qualidade, uma alíquota de 1 mL dos inoculantes foi retirada e colocada em 9,0 mL de solução salina (NaCl 0,85%), seguindo a técnica de diluições seriadas até a diluição 10^{-8} . Foram preparadas duas séries de diluição (A e B) para cada embalagem. Alíquotas de 100 µL das três últimas diluições foram plaqueadas em meio NFb sólido, em triplicatas, e as placas incubadas por 7 dias. Foram contabilizados o número de UFC de *A. brasilense* por mL de produto, para confirmação da concentração do lote do inoculante e também o número de UFC de contaminantes na diluição 10^{-5} para avaliação da pureza.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Recuperação e quantificação de células de *Azospirillum brasilense* inoculadas sobre sementes de milho.

Com o crescimento do uso de inoculantes de *Azospirillum brasilense* nas culturas do milho, feijão, soja, trigo entre outras, é indispensável a definição de uma metodologia para quantificação das densidades de células sobre sementes inoculadas

que possibilite avaliar a eficiência da tecnologia de inoculação utilizada, a exemplo do que já está definido e normatizado para rizóbios na cultura da soja.

Neste trabalho, os valores de UFC de *A. brasilense* recuperadas às 2h após a inoculação de sementes de milho variou de acordo com a solução diluente utilizada para a agitação e diluição seriada, e também conforme o meio de cultura usado no plaqueamento, comprovando que metodologias diferentes podem levar a resultados diversificados. A análise de variância dos dados mostrou que não houve interação entre os fatores meio de cultura e solução diluente (Tabela 2).

Tabela 2. Número de unidades formadoras de colônia (UFC) de *Azospirillum brasilense* recuperadas após a inoculação de sementes de milho de acordo com a solução diluente e o meio de cultura utilizado, em Rio Verde, GO (média de três repetições do experimento).

Solução diluente	NFb semi-sólido	NFb sólido	Batata
	UFC semente ⁻¹		
Sacarose 4%	Nd*	3,5 x 10 ⁴ A**	3,7 x 10 ⁴ A
Solução salina com tween 80	Nd	3,9 x 10 ³ B	5,9 x 10 ³ B
Água deionizada	Nd	2,6 x 10 ³ B	3,2 x 10 ³ B

*Nd – crescimento não detectado.

**Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).

Embora o meio NFb semi-sólido seja recomendado para isolamento de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas e também para verificação do controle de qualidade de inoculantes, pelo método do Número Mais Provável (NMP), não foi detectada formação de película microerofílica nos vidros de penicilina que indicasse crescimento de *A. brasilense* nas condições testadas, independente da solução utilizada como diluente (Tabela 2).

A solução de sacarose (4%) foi a que permitiu a recuperação do maior número de células de *A. brasilense*, tanto no meio NFb sólido (3,5 x 10⁴ UFC semente⁻¹) quanto no meio batata (3,7 x 10⁴ UFC semente⁻¹). As médias de UFC obtidas utilizando solução salina com tween 80 e água deionizada foram estatisticamente iguais, porém, consideravelmente menores do que os valores recuperados com a solução de sacarose (Tabela 2). Tanto a solução de sacarose quanto a solução salina com tween 80 são recomendadas nos protocolos de isolamento de *Azospirillum* (Reis et al. 2015).

Os valores de células recuperadas no meio NFb sólido e no meio batata mostram que ambos podem ser usados para recuperação de células de *A. brasilense*.

Esses dois meios já são recomendados na IN 30, de 12 de novembro de 2010 (Brasil 2010) para o controle de qualidade de inoculantes contendo diazotróficos associativos.

A análise de controle de qualidade do lote de inoculantes usados para inoculação das sementes de milho nessa etapa mostrou que a concentração do produto estava acima da garantia de concentração vide embalagem (2×10^8 UFC mL⁻¹), com número de células viáveis igual a $3,1 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ e ausência de contaminantes na diluição 10^{-5} , conforme exigências da IN n° 13, de 24 de março de 2011, que dispõe sobre especificações, garantias, registro, embalagem e rotulagem dos inoculantes destinados à agricultura (Brasil 2011).

Considerando a concentração do inoculante no momento da aplicação nas sementes, observou-se que houve redução considerável no número de células recuperadas às 2h após a inoculação. Penna et al. (2011) destacam que, o número de células recuperadas em sementes inoculadas pode ser extremamente heterogêneo quando expressado em UFC semente⁻¹, pois depende de fatores inerentes ao inoculante (formulação, presença de osmoprotetores, concentração e dose recomendada) e às sementes (genótipo, tamanho, superfície do grão, condições de armazenamento e integridade do tegumento).

O uso de produtos que atuam como adesivos e protetores bacterianos é uma opção que pode ajudar no recobrimento das sementes durante a inoculação e na manutenção de maior número de células sobre as sementes (Bashan & Bashan 2015). Porém, deve-se observar a compatibilidade do produto com a espécie de micro-organismo que se deseja inocular.

*2.3.1 Compatibilidade de produtos e viabilidade da pré-inoculação de sementes de milho com *Azospirillum brasilense**

O lote de inoculantes usado para a pré-inoculação das sementes passou por análises de controle de qualidade e pureza, e o número de células de *A. brasilense* viáveis no lote foi de $4,72 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ (valor acima da garantia mínima) com ausência de contaminantes na diluição 10^{-5} , conforme exigências da IN 13, de 24 de março de 2011 (Brasil 2011).

A análise de variância das médias de UFC semente⁻¹ recuperadas ao longo de 21 dias após o pré-tratamento mostrou diferença entre os tratamentos aplicados. Na aplicação do teste Dunnet, todos os tratamentos com fungicidas/inseticidas foram comparados ao tratamento controle em que foi feita apenas a aplicação do inoculante e

cuja recuperação foi realizada apenas às 2h após a inoculação. Às duas horas após a inoculação, foram recuperadas $3,65 \times 10^4$ UFC semente⁻¹, no tratamento controle (Tabela 3).

No tratamento com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil foram recuperadas $1,12 \times 10^5$ UFC semente⁻¹, após duas horas de pré-tratamento, valor estatisticamente superior ao tratamento controle. Já nos tratamentos com thiamethoxam, metalaxil-m + fludioxonil, clorantraniliprole e ciantraniliprole observou-se redução no número de células de *A. brasilense*, recuperadas às 2h similarmente ao controle (Tabela 3). A presença do aditivo protetor nas primeiras horas de tratamento foi importante para evitar que o contato com os fungicidas/inseticidas reduzisse o número de células abaixo do nível do tratamento controle.

Tabela 3. Número de unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas às 2h e aos 7, 14 e 21 dias após o pré-tratamento de sementes de milho com fungicidas/inseticidas, inoculante de *Azospirillum brasilense* Abv-5 Abv-6 e aditivo protetor, em Rio Verde, GO (média de três repetições do experimento).

Tratamentos			2h	7 dias	14 dias	21 dias
			UFC semente ⁻¹			
1	Inoculante (controle)	-	3,65x10 ⁴			
2	Inoculante + aditivo protetor	piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil	1,12x10 ^{5*}	5,72x10 ^{4ns}	3,83x10 ^{3*}	1,63x10 ^{3*}
3	Inoculante + aditivo protetor	Thiamethoxam	8,75x10 ^{4ns}	4,62x10 ^{4ns}	1,33x10 ^{3*}	3,00x10 ^{3*}
4	Inoculante + aditivo protetor	metalaxil-m + fludioxonil	8,82x10 ^{4ns}	4,50x10 ^{4ns}	2,00x10 ^{3*}	2,08x10 ^{3*}
5	Inoculante + aditivo protetor	Clorantraniliprole	7,14x10 ^{4ns}	3,90x10 ^{4ns}	1,17x10 ^{3*}	2,35x10 ^{3*}
6	Inoculante + aditivo protetor	Ciantraniliprole	8,20x10 ^{4ns}	3,67x10 ^{4ns}	1,83x10 ^{3*}	3,22x10 ^{3*}

* Indica diferença entre as médias em relação ao controle, pelo teste Dunnet bilateral ($p < 0,05$).

^{ns} Ausência de diferença em relação ao controle, pelo teste Dunnet bilateral ($p < 0,05$). ns = não significativo.

Aos 7 dias após o armazenamento das sementes de milho, todos os tratamentos de pré-inoculação igualaram-se ao tratamento controle com valores entre $5,72 \times 10^4$ e $3,67 \times 10^4$ UFC semente⁻¹ (Tabela 3). Nas sementes tratadas com piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, houve redução nos valores de UFC recuperados em comparação às 2h após tratamento, e os valores recuperados igualaram-se ao tratamento controle.

Considerando o número de células recuperadas no tratamento controle às 2h após a inoculação como um ponto de corte abaixo do qual a técnica de pré-inoculação de sementes de milho com *A. brasilense* se tornaria ineficiente, nas condições testadas, nota-se que todos os tratamentos de pré-inoculação se mantiveram acima da faixa limite do controle, até 7 dias após o armazenamento das sementes.

As populações de UFC recuperadas aos 14 e 21 dias depois da pré-inoculação foram estatisticamente menores do que o número de UFC semente⁻¹ recuperadas no tratamento controle às 2h (Tabela 3) e ficaram abaixo do ponto de corte estabelecido pelos valores recuperados no controle (Figura 2). Esses resultados mostram que a tecnologia de pré-inoculação precisa ser aperfeiçoada principalmente quanto às formulações do inoculante e do aditivo protetor, afim de que, no decorrer do tempo de armazenamento das sementes tratadas, obtenha-se um número de células sobre as sementes que garanta o sucesso da inoculação, após a semeadura em campo.

Ressalta-se, por fim, que o sucesso da inoculação de sementes depende não só da tecnologia de inoculação e das formulações utilizadas para prolongar a sobrevivência dos inoculantes durante o tratamento das sementes e o armazenamento, mas também da capacidade do micro-organismo de se estabelecer no solo e nas raízes das plantas (O'Callaghan 2016). Portanto, considerando que este é um trabalho inédito no assunto para a cultura do milho, vale ressaltar que além dos testes em laboratório, são necessárias pesquisas para validação, em nível de campo, de modo a comprovar a eficiência agrônômica da tecnologia e dos produtos desenvolvidos.

2.4 CONCLUSÕES

Para a recuperação de células de *Azospirillum brasilense* em sementes de milho inoculadas, a solução de sacarose (4%) é o diluente mais apropriado e tanto os meios de cultura NFb sólido quanto o meio batata podem ser usados para plaqueamento, embora, a contaminação no meio batata seja maior.

Quanto à pré-inoculação das sementes de milho com *A. brasilense*, conclui-se que, o número de unidades formadoras de colônias em sementes pré-inoculadas recuperadas às 2h após a inoculação, é maior quando se usa piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil no tratamento das sementes.

As concentrações de unidades formadoras de colônias nos tratamentos com fungicidas/inseticidas se mantêm dentro do limite estabelecido pelo controle, por até 7 dias após a inoculação.

2.5 AGRADECIMENTO

À SETEC/MEC e ao CNPq pelo apoio financeiro para execução deste trabalho (Chamada Pública MEC/SETEC/CNPq N° 94/2013: Apoio a Projetos Cooperativos de Pesquisa Aplicada e de Extensão Tecnológica).

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTA, G.G. Pré-inoculación del cultivo de soja: oportunidades y amenazas. In: HUNGRIA, M.; GOMES, D.F.; COLOZZI FILHO (Eds.) Reunião Latinoamericana de Rizobiologia: fortalecendo as parcerias Sul-Sul. *Anais da XXVII Reunião Latinoamericana de Rizobiologia : fortalecendo as parcerias Sul-Sul*. Curitiba: NEPAR, p.116, 2016.

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E.; PRABHU, S.R.; HERNANDEZ, J.P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: formulations and practical perspectives (1998–2013). *Plant and Soil*, v. 378, p. 1-33, 2014.

BASHAN, Y.; BASHAN, L.E. Inoculant preparation and formulations for *Azospirillum* spp. In: CASSÁN, F.D.; OKON, Y.; CREUS, C.M. *Handbook for Azospirillum: technical issues and protocols*. (eds). Springer, p. 469-485, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n° 30, de, 12 de novembro de 2010. Diário Oficial da União, Brasília, 17 nov. 2010, seção 1. 28 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa nº 13, de, 24 de março de 2011. *Diário Oficial da União*, Brasília, 25 mar. 2011, seção 1. 8 p.

CAMPO, R.J.; ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. *Symbiosis*, v. 48, p. 154,163, 2009.

DATE, R.A. Advances in inoculant technology: a brief review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, v. 41, p. 321–325, 2011.

DÖBEREINER, J. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, A.; TRÜPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. & SHLEIFER, K., eds. *The Prokaryotes*, 2.ed. New York, Springer-Verlag, 1991. p.2236-2253.

_____ ; ANDRADE, V.O.; BALDANI, V.L.D. *Protocolos para preparo de meios de cultura da Embrapa Agrobiologia*. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1999. 38p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 110).

FERREIRA, D.F. Sisvar: A computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

GUPTA, G.; PARIRHAR, S.S.; AHIRWAR, N.K.; SNEHI, S.K.; SINGH, V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, v. 7, p. 96-102, 2015.

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

_____.; NOGUEIRA, M.A.; ARAUJO, R.S. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*, v. 49, p. 791-801, 2013.

O'CALLAGHAN, M. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Applied Microbiology and Technology*, v. 100, p. 5729-5746, 2016.

OERKE, E.C. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Sciences*, v. 144, p. 31-43, 2006.

PENNA, C.; MASSA, R.; OLIVIERI, F.; GUTKIND, G. CASSAN, F. A simple method to evaluate the number of bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB Express*, v. 1, p. 1-21, 2011.

POCHON, J.; TARDIEUX, P. *Techniques d`analyse en microbiologie du sol, collection "techniques de base" série microbiologie, service de microbiologie du sol de Institut Pasteur*. Editions de la Tourelle, 106p. 1957.

REIS, V.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Isolation, identification and biochemical characterization of *Azospirillum* spp. and other nitrogen-fixing bacteria. In: CASSÁN, F.D.; OKON, Y.; CREUS, C.M. *Handbook for Azospirillum: technical issues and protocols*. (eds). Springer, p. 3-26, 2015.

VOGEL, G.F.; MARTINKOSKI, L.; JADOSKI, S.O.; FEY, R. Efeitos da combinação de *Azospirillum brasilense* com fungicidas no desenvolvimento de trigo. *Brazilian Journal of Applied Technology for Agricultural Science*, v. 8, p. 73-80, 2015.

ZILLI, J.E.; CAMPO, R.J.; HUNGRIA, M. Eficácia da inoculação de *Bradyrhizobium* em pré-semeadura da soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, p. 335-337, 2010.

CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que:

1) A bioprospeção de rizobactérias com multifuncionalidade para promoção do crescimento vegetal, a partir da rizosfera de plantas de milho e feijão, foi limitada com o uso de meios semi-seletivos;

2) A produção de AIA por rizobactérias promotoras de crescimento vegetal pode ocorrer tanto pela rota dependente quanto independente de triptofano em um mesmo isolado;

3) A actinobactéria *Microbacterium oxidans* coloniza raízes de plantas de milho e feijão em plantas cultivadas em solo de Cerrado e pode contribuir para o desenvolvimento dessas culturas protegendo-as contra a colonização de fungos fitopatogênicos e através da biossíntese de AIA;

4) A bactéria *Lysinibacillus fusiformis* apresenta atividade antifúngica contra *Sclerotinia sclerotiorum* e pode ser usada para o controle biológico de doenças na cultura do feijão e outras hospedeiras do fungo.

5) Nenhuma das espécies isoladas possui multifuncionalidade para que possa ser usada como inoculante, em escala comercial, para as culturas do milho e feijão;

6) A solução de sacarose é o diluente mais apropriado para uso na recuperação de células de *Azospirillum brasilense* em sementes de milho inoculadas;

7) Os meios de cultura NFb e batata podem ser usados para plaqueamento na recuperação de células de *A. brasilense*, no entanto, o crescimento de contaminantes oriundos das sementes de milho é mais visível quando se usa o meio batata;

8) O número de UFC em sementes pré-inoculadas recuperadas às 2h após a inoculação, é maior quando se usa piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil no tratamento das sementes;

9) Sementes de milho pré-tratadas mantiveram um número UFC estatisticamente igual ao tratamento controle, por 7 dias de armazenamento.