

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

SALOMÉ URREA VALENCIA

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense*, ADUBAÇÃO NITROGENADA E
ECOLOGIA MOLECULAR MICROBIANA EM SISTEMA PLANTIO DIRETO**

**PONTA GROSSA – PR
2021**

SALOMÉ URREA VALENCIA

**INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense*, ADUBAÇÃO NITROGENADA E
ECOLOGIA MOLECULAR MICROBIANA EM SISTEMA PLANTIO DIRETO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Agronomia na Universidade Estadual
de Ponta Grossa, Área de concentração Ciência do
Solo e Recursos Ambientais.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão

Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires

**PONTA GROSSA – PR
2021**

U81 Urrea Valencia, Salomé
 Inoculação de *Azospirillum brasilense*, adubação nitrogenada e ecologia
 molecular microbiana em sistema plantio direto / Salomé Urrea Valencia. Ponta
 Grossa, 2021.
 118 f.

 Tese (Doutorado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura),
 Universidade Estadual de Ponta Grossa.

 Orientadora: Profa. Dra. Carolina Galvão.
 Coorientador: Prof. Dr. Eduardo Caires.

 1. qPCR. 2. 16s rRNA. 3. Plantio direto. 4. Nitrogênio. 5. BPCV. I. Galvão,
 Carolina. II. Caires, Eduardo. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa.
 Agricultura. IV.T.

CDD: 631



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Tese: “INOCULAÇÃO DE *Azospirillum brasilense*, ADUBAÇÃO NITROGENADA E ECOLOGIA MOLECULAR MICROBIANA EM SISTEMA PLANTIO DIRETO”

Nome: **Salomé Urrea Velencia**

Orientador: **Profª. Drª. Carolina Weigert Galvão**

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Profª. Drª. Carolina Weigert Galvão

Profª. Drª. Neyde Fabíola Balarezo Giarola

Prof. Dr. Fabrício Dario Cassán

Prof. Dr. Ederson da Conceição Jesus

Prof. Dr. Fernando Dini Andreote

Data da Realização: 26 de fevereiro de 2021



Documento assinado eletronicamente por **Ederson da Conceição Jesus, Usuário Externo**, em 26/02/2021, às 15:07, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Neyde Fabiola Balarezo Giarola, Professor(a)**, em 01/03/2021, às 19:42, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Dini Andreote, Usuário Externo**, em 01/03/2021, às 21:51, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Weigert Galvao, Professor(a)**, em 16/03/2021, às 16:58, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Fabricio Cassan, Usuário Externo**, em 13/04/2021, às 09:07, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **0419473** e o código CRC **171BB28A**.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Profa. Dra. Carolina Weigert Galvão por ter acreditado em mim e ter proporcionado a oportunidade de fazer parte do LABMOM, sempre tentando me encaixar em projetos de pesquisa que despertavam minha curiosidade. Ela que juntamente com o Prof. Dr. Rafael Mazer Etto, me fizeram encantar pelo invisível mundo bacteriano e pela sua ecologia. Me ensinaram que existe um jeito leve de ver as coisas e me compartilharam além de muito conhecimento científico, sua amizade e carinho.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires, quem me forneceu todo o suporte agrônomo e aos pesquisadores do Laboratório de Fertilidade do Solo – UEPG, principalmente ao Dr. Angelo Rafael Bini, quem implantou os experimentos a campo e fez as análises químicas do solo e de produtividade das culturas, e ao Me. Vanderson Modolon Duarte por todo o suporte nas diferentes coletas de solo.

À dona Marici Garbosa Smolarek, quem me apresentou aos professores Carolina e Rafael. Sem esse contato esta pesquisa não teria acontecido.

Aos professores que me orientaram desde o início da minha caminhada científica, Profa. Dr. Ana Esperanza Franco Molano, Profa. Dra. Maria Alice Neves e Prof. Dr. André Rodrigues porque cada um deles contribuiu significativamente para me tornar a pessoa que sou hoje e para a formação do pensamento crítico.

Ao LABMOM, minha segunda casa. A todos seus integrantes, obrigada por todo o conhecimento compartilhado, pelo suporte nos experimentos e pela paciência nos dias em que as diferenças culturais me fizeram ser um pouco rígida. Especial agradecimento aos colegas (grandes amigos nas horas de folga) que trabalharam diretamente comigo, Erick Parize, Willian Takahashi e Laís Karas vocês são a melhor equipe de pesquisa que alguém poderia ter. Ao Daniel Potma Gonçalves pela amizade e pelo suporte nas análises estatísticas e metataxonômicas. Meu muito obrigado a todos que pararam suas pesquisas por uns minutos na hora do chá para compartilhar risadas, anedotas, tristezas, artigos, pequenas conquistas do dia a dia nos experimentos... vocês fizeram os dias de trabalho muito prazerosos.

À CAPES pela bolsa de doutorado e ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Ao Adriano Alberto Smolarek, meu amor. Obrigada pelo suporte incondicional nos dias de intensa alegria e nos dias de profunda tristeza e desespero. Por construir comigo uma família que coloca em primeiro lugar os objetivos acadêmicos mesmo sendo áreas tão distantes. Por ser meu assistente de campo em todas as coletas realizadas. Obrigada por compartilhar comigo a caminhada pela vida.

Aos meus pais Miguel Urrea e Patricia Valencia e à minha irmã Sara Urrea, porque mesmo na distância estão diariamente presentes. Eles que nunca me deixaram desistir, comemorando comigo cada um dos logros e me apoiando em cada desacerto. Obrigada por ser sempre a força necessária para continuar.

RESUMO

Um dos principais desafios do século XXI é garantir a segurança alimentar conforme o crescimento populacional. A produção de grãos deve estar baseada no aumento da produtividade das culturas e não na expansão de terras agrícolas, sendo necessários ajustes nas tecnologias de cultivo para garantir melhor aproveitamento dos fertilizantes aplicados, preservar a fertilidade do solo e reduzir o impacto no meio ambiente. O uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal é uma tecnologia promissora por ser de baixo custo, contribuir para a ciclagem de nutrientes essenciais como nitrogênio e fósforo, por proteger contra patógenos, aumentar o desenvolvimento das raízes de plantas inoculadas, entre outras vantagens. Nesse sentido, a presente pesquisa teve o objetivo de avaliar o impacto da aplicação de inoculantes bacterianos comerciais e de fertilizantes nitrogenados em sistema plantio direto de longa duração, na composição da comunidade bacteriana do solo, na abundância de genes participantes do ciclo do nitrogênio e na produtividade de cinco culturas (aveia preta, milho, trigo, soja e centeio), em um ciclo de rotação completo. Os resultados obtidos foram divididos em três capítulos. No capítulo 1, foi monitorado por qPCR o inoculante à base de *Azospirillum brasilense* aplicado em sementes de milho. Como resultado foi verificado que, em condições de campo, após o desenvolvimento radicular, as bactérias inoculadas ficam ancoradas na raiz sendo detectadas até 75 dias após a semeadura, numa concentração na ordem de 10^4 UFC g⁻¹ de raiz. No capítulo 2, foi abordado o impacto da inoculação de *A. brasilense* e de diferentes doses de nitrogênio na composição da comunidade bacteriana do solo não rizosférico, das culturas de aveia preta e milho, utilizando-se a técnica do sequenciamento parcial do gene 16S rRNA na plataforma Illumina MiSeq. Observou-se que não houve diferença nos principais filos bacterianos nas duas culturas devido à inoculação e à fertilização nitrogenada; tais resultados confirmaram que o plantio direto, com rotação diversificada de culturas, é um sistema fundamental para a estabilidade da comunidade bacteriana e da fertilidade de solos agrícolas. Finalmente, no capítulo 3, foram quantificados por qPCR os genes envolvidos na ciclagem do nitrogênio bem como o gene 16S rRNA, verificando-se que o número de bactérias permaneceu estável nas cinco culturas avaliadas; porém, a abundância dos genes *nifH* e *nosZ* variou conforme a cultura, e respondeu de forma diferente à inoculação e adubação nitrogenada. No milho, tanto a inoculação como a adubação nitrogenada diminuiu os valores absolutos de *nifH*, porém, no trigo aumentou. Adicionalmente, a abundância de *nosZ* na aveia preta e no centeio respondeu a um efeito residual dos tratamentos aplicados na soja. Os resultados confirmaram novamente a importância do sistema plantio direto com rotação diversificada de culturas nas funções que desempenham diferentes grupos bacterianos no solo e na estabilidade dos genes *nifH* e *nosZ*.

Palavras –chave: qPCR; 16S rRNA; Plantio direto; Nitrogênio; BPCV.

ABSTRACT

Food security is the priority challenge of the 21st century and accompanying the growing population. Grain production must be based on increasing crop yield and not on expanding agricultural land. In this sense, adjustments on cultivation technologies are necessary to ensure better use of fertilizers, preserve soil fertility and reduce the environment's impact. Plant growth-promoting bacteria is a promising technology because it is a low cost, contributing to the cycling of essential nutrients such as nitrogen and phosphorus, protecting plants against pathogens, and increasing the development of the root and uptake water, among other advantages. The present research aimed to evaluate the impact of the application of commercial inoculants and the use of nitrogen fertilization, in a long-term no-till system, on the composition of the soil bacterial community, on the abundance of nitrogen cycle genes, and the yield of five crops (black oat, maize, wheat, soybean and rye). The results were divided into three chapters. In chapter 1 was approached the detection of *Azospirillum brasilense* by qPCR performed in maize inoculated seeds; the results showed that after radicle emergency, inoculated bacteria anchored in the root being detected only in roots until 75 days after sowing, in a concentration in the order of 10⁴ CFU g⁻¹ of fresh roots. Chapter 2 analyzed the impact of *A. brasilense* inoculation and three doses of nitrogen on structure and composition of the bacterial community using the partial gene sequencing of the 16S rRNA gene on the Illumina MiSeq platform. It was observed that there was no difference in the main phylum in both black oat and maize; the results confirm that no-till practices with crop rotation are fundamental for the stability of the bacterial community and fertility of agricultural soils. Finally, in chapter 3, qPCR's nitrogen gene cycle was quantified in bulk soil of black oat, maize, wheat, soybean, and rye. The abundance of gene responded differently to nitrogen fertilization and bacterial inoculation. In maize, nitrogen and bacterial inoculation decreased *nifH* amounts, but in wheat increased. *nosZ* abundance had a residual soybean effect on black oat and rye. The results confirm the importance of crop rotation under no-till for the stability of *nifH* and *nosZ*.

Key words: qPCR; 16S rRNA; No-till system; nitrogen; PGPB.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Resumo da evolução de produção de inoculantes no Brasil.....22
- Figura 2 - Croqui geral do experimento implantado em setembro de 2012 no esquema de blocos ao acaso em parcelas subdivididas, com três repetições (A). Croqui das parcelas que foram utilizadas no presente estudo (B).....29
- Figura 3 - Parcelas utilizadas para avaliação da sobrevivência de *A. brasilense* AbV5/AbV6 em condições de campo, durante 75 dias após semeadura.34
- Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR para o teste de especificidade dos oligonucleotídeos Azo-2, Azo-2.1 e Azo-2.2. Controle positivo (Cont. +): DNA de colônia de *A. brasilense* FP2. Controle negativo para os oligonucleotídeos (Cont. o. -): DNA de *B. japonicum*. Controle negativo do mix de reação (NTC – *No Template Control*): sem adição de DNA. ..41
- Figura 5 - Curva de calibração para os oligonucleotídeos Azo-2, Azo-2.1 e Azo-2.2 a partir da regressão linear do log UFC g⁻¹ de solo e o Ciclo de quantificação (Cq). Os pontos representam duplicatas do DNA produto da diluição seriada (2x10⁸ – 2x10³) de *A. brasilense* AbV5/AbV6 inoculado em solo estéril.41
- Figura 6 - Curvas de Melting geradas a partir de cada curva de calibração e posterior confirmação dos produtos por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Azo-2 (A e D), Azo-2.1 (B e E), e Azo-2.2 (C e F). TM de cada pico especificadas na Tabela 5. Todas as bandas observadas (D – F) apresentaram um tamanho de 90 pb.....42
- Figura 7 - Quantificação de *A. brasilense* AbV5/AbV6 inoculado em sementes de milho em condições de campo, ao longo do desenvolvimento da cultura durante 75 DAS. O extremo superior da figura representa o desenvolvimento do milho durante os dias de coleta das amostras, e no extremo inferior está indicada a precipitação média durante os meses do experimento. O (*) indica a quantificação em amostras de solo, para os dias 5 – 75 os valores correspondem à quantificação na raiz.....44
- Figura 8 - Detecção de *A. brasilense* AbV5/AbV6 no solo rizosférico 5 dias após a semeadura. A) Curva de Melting. Linha verde = controle positivo (DNA extraído do inoculante comercial a base de *A. brasilense* AbV5/AbV6); linha azul = produtos inespecíficos formados em amostra de solo rizosférico correspondente ao 5 DAS. B) produtos de qPCR observado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Poço-1 = marcador de peso molecular 1500 bp; poços 2-3 = produtos inespecíficos formados em amostra de solo rizosférico correspondente ao 5 DAS.45

Figura 9 - Detecção de *A. brasilense* AbV5/AbV6 no solo (0-10 cm) antes da implementação do experimento e em raízes de milho não inoculado. A) Curva de Melting. Linha verde = controle positivo (DNA extraído do inoculante comercial a base de *A. brasilense* AbV5/AbV6); linha azul = ausência de amplificação na amostra de solo e raiz não inoculados. B) produtos de qPCR observado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Poço-1 = marcador de peso molecular 1500 bp; poço-2 = amostra de solo não inoculado; poço-3 = amostra de raiz de milho não inoculado; poço-4 = NTC; poço-5 = controle positivo (DNA extraído do inoculante comercial a base de *A. brasilense* AbV5/AbV6).....46

Figura 10 - Amostragem para análise da composição da comunidade bacteriana do solo não rizosférico das culturas da aveia preta e do milho, as quais se encontram delimitadas no retângulo vermelho. Na cultura do milho foi realizada a inoculação com *Azospirillum brasilense* AbV5/AbV6 (2×10^8 UFC mL⁻¹), utilizando-se a dose de 100 mL para 60000 sementes. Na cultura da soja todas as parcelas receberam inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA5079/5080 (5×10^9 UFC mL⁻¹) e em parcelas que receberam *A. brasilense* AbV5/AbV6 em outras culturas, foi realizada a co-inoculação (*B. japonicum* + *A. brasilense*), utilizando-se a dose de 2,0 mL de cada inoculante por kg de sementes.51

Figura 11 - Variação na riqueza de OTUs determinado pelo índice de Shannon na cultura da aveia preta. A) Parcelas inoculadas com *A. brasilense*. B) Parcelas com diferentes doses de nitrogênio em cobertura residual. A aveia preta foi cultivada como planta de cobertura de inverno sem receber inoculação e adubação nitrogenada.56

Figura 12 - Distribuição dos tratamentos na cultura da aveia preta em função da similaridade das OTUs calculada pelo coeficiente de Jaccard. A) Parcelas com inoculação de *A. brasilense*. B) Parcelas com diferentes doses de nitrogênio em cobertura residual. A aveia preta foi cultivada como planta de cobertura de inverno sem receber inoculação e adubação nitrogenada.....57

Figura 13 - Variação na riqueza de OTUs determinado pelo índice de Shannon na cultura do milho. A) Parcelas inoculadas com *A. brasilense*. B) Parcelas adubadas com diferentes doses de nitrogênio em cobertura (0N, baixo N = 80 kg N ha⁻¹ e alto N = 240 kg de N ha⁻¹)......58

Figura 14 - Distribuição dos tratamentos na cultura do milho em função da similaridade das OTUs calculada pelo coeficiente de Jaccard. A) Parcelas com inoculação de *A. brasilense*. B) Parcelas com diferentes doses de nitrogênio em cobertura (0N; baixo N = 80 kg de N ha⁻¹ e alto N = 240 kg de N ha⁻¹).59

Figura 15 - Curvas de rarefação do número de OTUs observadas em função do número de sequências do gene 16S rRNA de amostras de solo não rizosférico de aveia preta (A) e milho (B).....60

- Figura 16 - Abundância e composição dos diferentes filos de Bacteria e Archaea encontrados no solo não rizosférico da cultura da aveia preta. Valores representam três repetições biológicas de cada tratamento..... 62
- Figura 17 - Abundância relativa no nível de classe encontrados nos oito filos bacterianos mais abundantes no solo não rizosférico da cultura da aveia preta. Valores representam três repetições biológicas de cada tratamento. 63
- Figura 18 - Abundância e composição dos diferentes filos de Bacteria e Archaea encontrados no solo não rizosférico da cultura milho. Valores representam três repetições biológicas de cada tratamento: com inoculação via semente de *A. brasilense* e três doses de N-ureia aplicadas em cobertura no estágio fisiológico V4 (0N, baixo N = 80 kg de N ha⁻¹ e alto N = 240 kg de N ha⁻¹). 64
- Figura 19 - Abundância relativa no nível de classe encontrados nos oito filos bacterianos mais abundantes no solo não rizosférico da cultura do milho. Valores representam três repetições biológicas de cada tratamento: com inoculação via semente de *A. brasilense* e três doses de N-ureia aplicadas em cobertura no estágio fisiológico V4 (0N, baixo N = 80 kg de N ha⁻¹ e alto N = 240 kg de N ha⁻¹). 65
- Figura 20 - Principais processos do ciclo do nitrogênio mediados por microrganismos e principais genes que participam no ciclo, utilizados como marcadores para monitorar sua abundância no solo pela técnica de qPCR. 79
- Figura 21 - Sucessão de culturas em um ciclo de rotação completo, com início em abril de 2017 e fim em julho de 2019 as quais se encontram delimitadas no retângulo vermelho. Nas culturas de milho e trigo foi realizada a inoculação com *Azospirillum brasilense* AbV5/AbV6 (2×10^8 UFC mL⁻¹), utilizando-se as doses de 100mL para 60000 sementes e 2,5 ml por kg de sementes de milho e trigo respectivamente. Na cultura da soja todas as parcelas receberam inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA5079/5080 (5×10^9 UFC mL⁻¹) e, em parcelas que receberam *A. brasilense* AbV5/AbV6 em outras culturas, foi realizada a co-inoculação (*B. japonicum* + *A. brasilense*), utilizando-se a dose de 2,0 mL de cada inoculante por kg de sementes. 81
- Figura 22 - Curvas de calibração para os genes *nifH* (A); *nosZ* (B) e 16S rRNA (C) a partir da regressão linear do log de cópias gene/g de solo e o ciclo de quantificação (Cq). Os pontos representam duplicatas do DNA produto da diluição seriada ($2 \times 10^8 - 2 \times 10^2$) de *A. brasilense* AbV5/AbV6 inoculado em solo estéril. Curvas de *Melting* para os genes *nifH* (D); *nosZ* (E) e 16S rRNA (F) foram geradas automaticamente pelo software dos equipamentos. 86
- Figura 23 - Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com BPCV no número de cópias do gene 16S rRNA. As doses de N Baixo/Alto correspondem a 80/240 kg N ha⁻¹; 40/120 kg N ha⁻¹ e 25/75 kg N ha⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente. Aveia

preta e centeio não receberam doses extras de N por serem culturas de cobertura de inverno. Com: inoculação com *A. brasilense* ou co-inoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum*, Sem: sem inoculação. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre as culturas e letras minúsculas entre os tratamentos dentro de cada cultura (Tukey $p < 0,05$)..... 87

Figura 24 - Análise de componentes principais gerado a partir do número de cópias do gene 16S rRNA, dos atributos químicos do solo e da produtividade do milho, trigo e soja. S: enxofre; K: potássio; P: fósforo; H+Al: acidez potencial; Nareia/ Careia: nitrogênio e carbono disponível, respectivamente; Mg: magnésio; Ca: cálcio; prodmilho/ prodtrigo/ prodsoja: produtividade milho, trigo e soja, respectivamente; Blackoat16S/ Maize16S/ Wheat16S/ Soybean16S/ Rye 16S: número de cópias do gene 16S rRNA no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio, respectivamente. 88

Figura 25 - Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com BPCV no número de cópias do gene *nifH*. As doses de Baixo/Alto N correspondem a 80/240 kg N ha⁻¹; 40/120 kg N ha⁻¹ e 25/75 kg N ha⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente. Aveia preta e centeio não receberam doses extras de N por serem culturas de cobertura de inverno. Com: inoculação com *A. brasilense* nas culturas de milho e trigo ou co-inoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum* na cultura da soja. Sem: sem inoculação. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre as culturas e letras minúsculas, entre os tratamentos dentro de cada cultura (Tukey $p < 0,05$)..... 89

Figura 26 - Valores relativos do gene *nifH* em comparação ao número total de cópias do gene 16S rRNA. A) Aveia preta, B) Milho, C) Trigo, D) Soja e E) Centeio. 89

Figura 27 - Análise de componentes principais gerado a partir do número de cópias do gene *nifH*, dos atributos químicos do solo e da produtividade do milho, trigo e soja. S: enxofre; K: potássio; P: fósforo; H+Al: acidez potencial; Nareia e Careia: nitrogênio e carbono disponível, respectivamente; Mg: magnésio; Ca: cálcio; prodmilho/ prodtrigo/ prodsoja: produtividade milho, trigo e soja, respectivamente; BlackoatnifH/ MaizenifH/ WheatnifH/ SoybeannifH/ RyenifH: número de cópias do gene *nifH* no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio, respectivamente. 93

Figura 28 - Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com BPCV no número de cópias do gene *nosZ*. As doses de N Baixo/Alto correspondem a 80/240 kg N ha⁻¹; 40/120 kg N ha⁻¹ e 25/75 kg N ha⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente. Aveia preta e centeio não receberam doses extras de N por serem culturas de cobertura de inverno. Com: inoculação com *A. brasilense* nas culturas de milho e trigo ou co-inoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum* na cultura da soja. Sem: sem inoculação. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre as

culturas e letras minúsculas entre os tratamentos dentro de cada cultura (Tukey $p < 0,05$)..... 94

Figura 29 - Valores relativos do gene *nosZ* em comparação ao número total de cópias do gene 16S rRNA. A) Aveia preta, B) Milho, C) Trigo, D) Soja e E) Centeio. 94

Figura 30 - Análise de componentes principais gerado a partir do número de cópias do gene *nosZ*, dos atributos químicos do solo e da produtividade do milho, trigo e soja. S: enxofre; K: potássio; P: fósforo; H+Al: acidez potencial; Nareia/ Careia: nitrogênio e carbono disponível, respectivamente; Mg: magnésio; Ca: cálcio; prodmilho/ prodtrigo/ prodsoja: produtividade milho, trigo e soja, respectivamente; BlackoatnosZ/ MaizenosZ/ WheatnosZ/ SoybeanosZ/ RyenosZ: número de cópias do gene *nifH* no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio, respectivamente. 96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros para a adubação e inoculação (A. brasilense ou A. brasilense + B. japonicum) de aveia preta, milho, trigo e soja. N: aplicação de ureia, P: aplicação de P ₂ O ₅ na forma de fosfato monoamônio (MAP), K: aplicação de K ₂ O na forma KCl.	30
Tabela 2 - Cronograma de coletas do para o monitoramento de A. brasilense AbV5/AbV6 na cultura do milho.	36
Tabela 3 - Microrganismos utilizados na presente pesquisa, com suas respectivas origens e meios de cultura.	37
Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e qPCR.....	38
Tabela 5 - Parâmetros para cada par de oligonucleotídeos obtidos a partir da curva de calibração.	42
Tabela 6 - Produtividade do milho na área onde foi desenvolvido o experimento.	47
Tabela 7 - Atributos químicos do solo não rizosférico superficial (0 – 10 cm), em uma área com 36 anos de plantio direto e rotação de culturas.	54
Tabela 8 - Diferença na média da abundância relativa dos principais filos e classes bacterianos encontrados no solo não rizosférico da aveia preta e do milho.	66
Tabela 9 - Gêneros bacterianos diazotróficos mais abundantes no solo não rizosférico de aveia preta e milho.	67
Tabela 10 - Resumo de alguns trabalhos que utilizaram a técnica de qPCR para quantificar genes funcionais do ciclo do nitrogênio.....	79
Tabela 11 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR para o monitoramento dos genes <i>nifH</i> , <i>nosZ</i> e 16SrRNA, nas culturas de aveia preta, milho, trigo, soja e centeio.	84
Tabela 12 - Parâmetros para cada par de oligonucleotídeos obtidos a partir da curva de calibração.	85
Tabela 13 - Análise de variância para o número de cópias do gene 16S rRNA no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio. As doses de N Baixo/Alto correspondem a 80/240 kg N ha ⁻¹ ; 40/120 kg N ha ⁻¹ e 25/75 kg N ha ⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente.....	87
Tabela 14 - Análise de variância para o número de cópias do gene <i>nifH</i> no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio. As doses de N Baixo/Alto	

correspondem a 80/240 kg N ha ⁻¹ ; 40/120 kg N ha ⁻¹ e 25/75 kg N ha ⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente.....	90
Tabela 15 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura da aveia preta, considerando o efeito residual da inoculação com BPCV e da adubação nitrogenada realizadas na cultura antecessora.	90
Tabela 16 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura do milho, considerando a inoculação com <i>A. brasilense</i> e três doses de nitrogênio.....	91
Tabela 17 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura do trigo, considerando a inoculação com <i>A. brasilense</i> e três doses de nitrogênio.	91
Tabela 18 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura da soja, considerando a coinoculação com <i>A. brasilense</i> + <i>B. japonicum</i> nas parcelas identificadas com BPCV e três doses de nitrogênio.....	92
Tabela 19 - Análise de variância para o número de cópias do gene <i>nosZ</i> no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio. As doses de N Baixo/Alto correspondem a 80/240 kg ha ⁻¹ ; 40/120 kg ha ⁻¹ e 25/75 kg ha ⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente.....	95
Tabela 20 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura da soja, considerando a coinoculação com <i>A. brasilense</i> + <i>B. japonicum</i> nas parcelas identificadas com BPCV e três doses de nitrogênio.....	95
Tabela 21 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura do centeio, considerando o efeito residual da soja referente à coinoculação com <i>A. brasilense</i> + <i>B. japonicum</i> nas parcelas identificadas com BPCV e três doses de nitrogênio.	95
Tabela 22 - Produtividade do milho, trigo e soja em resposta à inoculação com BPCV e à adubação nitrogenada. As doses de N Baixo/Alto correspondem a 80/240 kg ha ⁻¹ ; 40/120 kg ha ⁻¹ e 25/75 kg ha ⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente.....	96

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	17
1.1 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL: <i>Azospirillum</i> COMO EXEMPLO	18
1.2 O USO DOS TERMOS BIOFERTILIZANTE E INOCULANTE NO BRASIL	20
1.3 USO DAS BPCV COMO INOCULANTES NA AGRICULTURA BRASILEIRA	21
1.4 A TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVA – QPCR NO ESTUDO DO CICLO DO NITROGÊNIO E DE DIFERENTES COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO	23
1.5 O SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S RRNA COMO ALTERNATIVA PARA O ENTENDIMENTO DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO.....	25
2 METODOLOGIA GERAL	28
2.1 ÁREA DE ESTUDO	28
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	28
2.3 TRATOS CULTURAIS	29
2.4 ANÁLISE QUÍMICA E GRANULOMÉTRICA DO SOLO	29
3 ARTIGOS.....	31
3.1 DETECÇÃO DE <i>Azospirillum brasilense</i> PELA TÉCNICA DE QPCR NA CULTURA DO MILHO EM CONDIÇÕES DE CAMPO	31
3.1.1 Introdução.....	31
3.1.1.1 Estudos pioneiros sobre quantificação de <i>A. brasilense</i>	32
3.1.2 Material e Métodos.....	34
3.1.2.1 Delineamento experimental e implantação do experimento	34
3.1.2.2 Coleta de amostras	35
3.1.2.3 Extração de DNA total do solo e raiz.....	36
3.1.2.4 Extração de DNA bacteriano por desnaturação de colônia isolada.....	36
3.1.2.5 Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores para <i>A. brasilense</i>	37
3.1.2.6 Geração das curvas de calibração para Azo-2, Azo-2.1 e Azo-2.2	38
3.1.2.7 Quantificação de <i>A. brasilense</i> AbV5/AbV6 em amostras de campo	39
3.1.3 Resultados e Discussão.....	40
3.1.3.1 Ajuste de parâmetros para Azo-2, Azo-2.1 e Azo-2.2.....	40

3.1.3.2 Quantificação por qPCR de <i>A. brasilense</i> AbV5/AbV6 e do número aproximado de bactérias totais em amostras de campo.....	42
3.1.3.3 Produtividade do milho e influência da inoculação com <i>A. brasilense</i> AbV5/AbV6 ...	46
3.1.4 Conclusões.....	47
3.1.5 Perspectivas para Futuras Pesquisas.....	48
3.2 O SISTEMA DE PLANTIO DIRETO DE LONGA DURAÇÃO CONTRIBUI COM A ESTABILIDADE NA ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO NÃO RIZOSFÉRICO.....	48
3.2.1 Introdução.....	48
3.2.1.1 Estudos do microbioma dos solos brasileiros agricultáveis	49
3.2.2 Material e Métodos.....	50
3.2.2.1 Coleta de amostras de solo para análise molecular	51
3.2.2.2 Extração do DNA total do solo	51
3.2.2.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando a plataforma Illumina	52
3.2.2.4 Análise estatística	52
3.2.3 Resultados.....	53
3.2.3.1 Características químicas do solo	53
3.2.3.2 Estrutura geral da comunidade microbiana	54
3.2.3.3 Biodiversidade e composição da comunidade microbiana	60
3.2.3.4 Abundância de bactérias diazotróficas	66
3.2.4 Discussão	67
3.2.4.1 A adubação nitrogenada não afetou a estrutura geral de comunidade microbiana ...	67
3.2.4.2 Efeito da inoculação nos índices de beta diversidade.....	68
3.2.4.3 Efeito do sistema plantio direto na conservação da estrutura da comunidade microbiana.....	69
3.2.4.4 Diferenças na composição geral da comunidade microbiana	70
3.2.4.5 Diferenças no nível de classe em resposta aos dois genótipos vegetais	71
3.2.4.6 Bactérias diazotróficas identificadas na área de estudo.....	72
3.2.5 Conclusões.....	74
3.2.6 Perspectivas para Futuras Pesquisas.....	75
3.3 EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA E DA INOCULAÇÃO COM BPCV NA ABUNDÂNCIA DE GENES ENVOLVIDOS NO CICLO BIOLÓGICO DO NITROGÊNIO EM SISTEMA PLANTIO DIRETO	75

3.3.1 Introdução	75
3.3.1.1 O ciclo do nitrogênio	76
3.3.1.2 Trabalhos que quantificaram genes do ciclo do nitrogênio pela técnica de qPCR	79
3.3.2 Material e métodos	81
3.3.2.1 Coleta de amostras	81
3.3.2.2 Extração do DNA total do solo	81
3.3.2.3 Geração das curvas de calibração para <i>nifH</i> , <i>nosZ</i> e 16S rRNA	82
3.3.2.4 Quantificação dos genes <i>nifH</i> , <i>nosZ</i> e 16S rRNA em amostras de campo	83
3.3.3 Resultados.....	85
3.3.3.1 Ajuste das curvas de calibração	85
3.3.3.2 Abundância dos genes <i>nifH</i> , <i>nosZ</i> e 16S rRNA	86
3.3.3.3 Produtividade de grãos de milho, trigo e soja	96
3.3.4 Discussão	97
3.3.4.1 A adubação nitrogenada e a inoculação com BPCV impacta de forma diferente a abundância de <i>nifH</i> e <i>nosZ</i>	97
3.3.4.2 O plantio direto contribui com a abundância de <i>nifH</i> e <i>nosZ</i>	99
3.3.4.3 Os cátions Ca^{+2} e Mg^{+2} influenciaram na abundância de 16S rRNA, <i>nifH</i> e <i>nosZ</i>	99
3.3.5 Conclusões.....	100
3.3.6 Perspectivas para Futuras Pesquisas.....	101
REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO GERAL

Um dos maiores desafios do século XXI será alimentar aproximadamente 10 bilhões de pessoas em 2050 e ao mesmo tempo reduzir o impacto ambiental e os custos da produção agrícola (FOLEY et al., 2011). Para atingir esse objetivo é necessária a duplicação de safras, o que exige soluções rápidas e imediatas (TILMAN et al., 2011). Nesse contexto, o uso de bactérias promotoras do crescimento vegetal – BPCV, como inoculantes, com o intuito de diminuir o consumo de insumos agrícolas, tem aumentado nos últimos anos, não apenas pelo alto custo dos fertilizantes nitrogenados, mas também por representar uma das mais importantes práticas para uma agricultura mais sustentável (AMBROSINI; DE SOUZA; PASSAGLIA, 2015; VERMA; MISHRA; ARORA, 2019).

A microbiota do solo pode ser afetada e alterada por fatores bióticos e abióticos, sendo a planta mais um fator biótico que contribui para a seleção das bactérias predominantes através dos seus exsudatos. Essas interações da planta com as bactérias também podem alterar sua exsudação e toda essa variação reflete diretamente no desenvolvimento da própria planta (VACHERON et al., 2013). Diante dessas razões, a determinação dos fatores que influenciam as comunidades bacterianas, e a manutenção da diversidade microbiana no solo associada com maior produtividade de grãos, são preocupações pertinentes para o aumento da sustentabilidade da produção agrícola (DING et al., 2013).

Segundo as projeções para o agronegócio brasileiro realizadas pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o crescimento da produção dos cinco principais grãos cultivados no Brasil (arroz, feijão, milho, soja e trigo), durante o período 2018 – 2028, continuará fundamentado no aumento da produtividade, e não na ampliação das áreas de cultivo, com projeções de incrementos de 26,8% na produção e apenas 15,3% nas áreas de cultivo (BRASIL, 2019). De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), espera-se que a safra 2020/21 seja a maior da história, com uma produção total de grãos de 265,9 milhões de toneladas; 3,5% superior à safra 2019/20 (CONAB, 2020a).

Inserido nesse panorama, o estado do Paraná se destaca por ser o maior produtor de trigo (51% da produção nacional), o segundo maior produtor de milho (16,7% da produção nacional) e o terceiro maior produtor de soja (14,2% da produção nacional) (CONAB, 2019). O Paraná também se destaca por ser o estado pioneiro na adoção do sistema plantio direto com rotação diversificada de culturas. Na safra de 2020, o trigo teve uma produtividade média 31% superior à safra de 2019. Para as culturas de milho e soja, as quais tiveram um aumento na área cultivada, também se espera uma produtividade superior à safra anterior (CONAB,

2020a). Referente aos cultivos de inverno utilizados como cobertura, o centeio vem ganhando destaque no estado do Paraná devido à farta palhada gerada pelo cereal, a qual serve como base para a sustentação do plantio direto (CONAB, 2020b).

Diante dessa perspectiva e ciente da importância dos microrganismos para a estrutura e fertilidade do solo, é urgente e imperativo a obtenção de maior conhecimento da biodiversidade e da ecologia bacteriana presente no solo nos sistemas de produção agrícola, com o intuito de identificar as consequências da inoculação de BPCV na estrutura da comunidade bacteriana e na produção de grãos.

1.1 BACTÉRIAS PROMOTORAS DO CRESCIMENTO VEGETAL: *Azospirillum* COMO EXEMPLO

As bactérias que promovem o crescimento das plantas são um grupo benéfico e heterogêneo de microrganismos que podem ser de vida livre, ou associados à raiz (rizobactérias), seja na rizosfera, na superfície da raiz ou associados a ela, e são capazes de melhorar o crescimento das plantas e protegê-las de doenças e estresses abióticos (DE SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

Entre as rizobactérias há um gradiente de proximidade e intimidade com a raiz, como segue: 1) Bactérias rizosféricas, as quais vivem no solo perto de raízes, utilizando exsudatos das raízes como fontes carbono e nitrogênio; 2) Bactérias rizosféricas que colonizam a superfície radicular e habitam o rizoplane; 3) Bactérias endofíticas, as quais residem no tecido radicular, habitando espaços entre células corticais; e, finalmente, 4) Bactérias que vivem dentro das células, em estruturas especializadas da raiz, chamadas nódulos. Esse último grupo é dividido em rizóbios associados a leguminosas e espécies de *Frankia* associadas a plantas lenhosas (GRAY; SMITH, 2005).

Os mecanismos de promoção do crescimento vegetal apresentados pelas BPCV compreendem a fixação biológica de nitrogênio (BALDANI; BALDANI, 2005), o aumento da atividade da nitrato redutase vegetal quando em interações endofíticas (CASSÁN et al., 2008); a produção de hormônios como auxinas, citocininas (TIEN; GASKINS; HUBBELL, 1979), giberelinas (BOTTINI et al., 1989), etileno (STRZELCZYK; KAMPERT; LI, 1994) e uma variedade de outras moléculas (PERRIG et al., 2007); a solubilização de fosfatos (RODRIGUEZ et al., 2004); e o controle biológico de patógenos (CORREA et al., 2008).

Dentre as BPCV, o *Azospirillum* é um dos gêneros mais estudados por ter a capacidade de associar-se com aproximadamente 113 espécies de plantas, distribuídas em 35 famílias

botânicas, incluindo 14 espécies de cereais (PEREG; DE BASHAN; BASHAN, 2016). O *Azospirillum brasilense* é única espécie utilizada para formulação de inoculantes comerciais no Brasil, sendo autorizadas e recomendadas as estirpes AbV1, AbV4, AbV5, AbV6, AbV7 e AbV8 (BRASIL, 2011).

Como as espécies de *Azospirillum* podem fixar nitrogênio, solubilizar fosfato, produzir fitormônios, entre outras características das BPCV, a sua capacidade para promover o crescimento das plantas não é explicado por um único mecanismo, o que levou à proposição da hipótese de aditividade (BASHAN; LEVANONY, 1990), na qual múltiplos mecanismos participam da bem sucedida associação entre o *Azospirillum* e as plantas, sendo que tais mecanismos podem variar dependendo da planta que for colonizada, a estirpe de *Azospirillum* inoculada e as condições prevaletentes durante a interação (BASHAN; DE BASHAN, 2010).

A fixação biológica do nitrogênio – FBN e a produção de fitormônios são duas características atreladas à capacidade do *Azospirillum* para promover o crescimento das plantas. A primeira delas é controversa e por muitos anos retardou o seu uso na agricultura brasileira devido à falta de consistência nos resultados e ausência de formação de nódulos em associação com as raízes das plantas (REIS, 2014). Estudos relatam que a contribuição de nitrogênio para as plantas como produto da FBN de *Azospirillum* é baixa, atingindo valores de 5 – 18% do total de nitrogênio na planta (BASHAN; HOLGUIN; LUZ, 2004). Contudo, a capacidade do *Azospirillum* para produzir hormônios vegetais é um argumento que comprova o potencial benéfico de seu uso na agricultura (CASSÁN; DÍAZ-ZORITA, 2016).

A biossíntese destes compostos tem sido bem estudada por análises moleculares, sendo influenciada por fatores ambientais como a sinalização da planta e o estresse. Cassán et al. (2014) estudaram tais fatores e demonstraram que a acidificação e o estresse osmótico afetam a produção de tais moléculas. A produção de ácido indol acético (AIA) por exemplo, aumenta em condições de deficiência de carbono e de solo ácido (ONA et al., 2003), característica que também é observada *in vitro*, na fase estacionária do crescimento bacteriano, em que o carbono é reduzido e o pH é baixo.

Uma metanálise recente realizada por Rubin et al. (2017) reuniu informações que demonstraram que as BPCV são mais eficientes em condições de estresse abiótico. Os tratamentos analisados foram a inoculação em plantas irrigadas e em condições de estresse hídrico. Os resultados demonstraram que as plantas irrigadas tiveram um incremento de 35% na massa de raiz, 28% na parte aérea, e 19% no rendimento reprodutivo, enquanto as plantas em condições de estresse hídrico apresentaram um incremento de 43% na massa de raiz, 45% na parte aérea e 40% no rendimento reprodutivo.

Outro benefício da produção de fitormônios é a modificação no sistema radicular. O aumento de pelos radiculares é a resposta fenotípica mais observada em plantas inoculadas com *Azospirillum*. A modificação radicular permite maior absorção de água e nutrientes, tal e como foi proposto em 1970 quando o gênero começou ser estudado. Bashan e Holguin (1997) observaram que após inocular auxinas produzidas por *Azospirillum* houve aumento na proliferação radicular e, conseqüentemente, na promoção do crescimento da planta.

1.2 O USO DOS TERMOS BIOFERTILIZANTE E INOCULANTE NO BRASIL

O termo bioestimulante é relativamente novo na agricultura e sua utilização é restrita à comunidade científica; porém, ainda carece de uma definição unificada. A definição mais abrangente foi criada por du Jardin (2015), que se referiu aos bioestimulantes de plantas como substâncias ou materiais, com exceção de nutrientes e pesticidas, os quais, quando aplicados nas plantas, sementes ou substratos de crescimento, tem a capacidade de modificar os processos fisiológicos da planta, gerando benefícios para seu crescimento, desenvolvimento e resposta ao estresse.

Alguns autores aceitam a proposta de du Jardin (2015); a exemplo disso, Halpern et al. (2015) empregaram o termo, considerando como bioestimulantes aqueles que têm efeito positivo sobre o crescimento e eficiência de absorção de nutrientes pelas raízes, criando quatro grupos de bioestimulantes, a saber: substâncias húmicas, formulações a base de proteínas hidrolases e aminoácidos, extrato de algas marinhas, e microrganismos que promovem o crescimento vegetal.

A definição de biofertilizante melhor aceita pelos pesquisadores em BPCV foi proposta por Vessey (2003), e define de forma clara o alcance do termo. Assim, foi definido como “substância que contém microrganismos vivos, os quais, quando aplicados na semente, na superfície da planta ou no solo, colonizam a rizosfera ou o interior da planta, promovendo o crescimento seja por suplementação ou por maior disponibilidade de nutrientes essenciais para a planta hospedeira”.

Dentro do contexto nacional, a legislação brasileira trata sobre o uso de biofertilizantes na Lei 6894/1980 e refere-se ao termo biofertilizante como “produto que contém princípio ativo ou agente orgânico isento de substâncias agrotóxicas, capaz de atuar, direta ou indiretamente, sobre o todo ou parte das plantas cultivadas, elevando a sua produtividade, sem ter em conta o seu valor hormonal ou estimulante”. Dentro da mesma lei define-se também o

termo inoculante como “a substância que contenha microrganismos com a atuação favorável ao desenvolvimento vegetal”.

Constata-se que os termos biofertilizante e inoculante, como abordados pelo MAPA na Lei 6894/1980, não condizem com as definições encontradas na literatura científica. Nesse sentido, para fins de melhor compreensão no presente trabalho foi utilizado o termo inoculante, o qual inclui as BPCV utilizadas na produção de grãos e não o termo biofertilizante para evitar erros de interpretação entre a definição da legislação nacional e a definição encontrada na literatura científica.

1.3 USO DAS BPCV COMO INOCULANTES NA AGRICULTURA BRASILEIRA

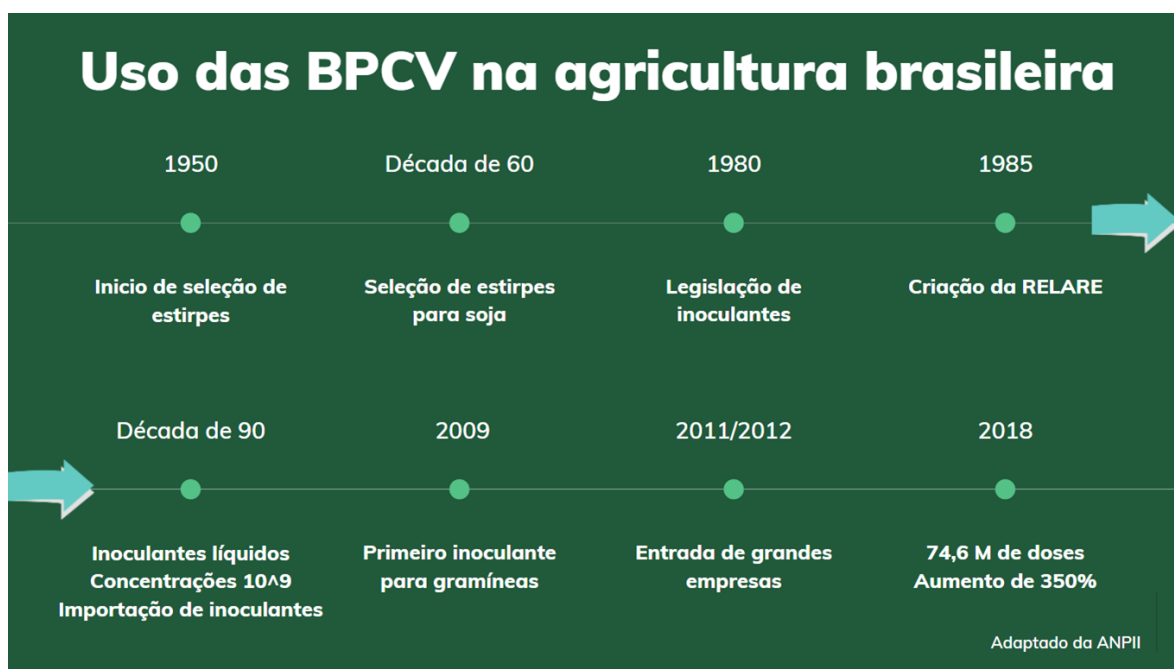
Em escala global, os efeitos da excessiva adubação nitrogenada causam sérios problemas ao ambiente, contaminando água potável com nitratos, acidificando os solos e gerando gases de efeito estufa (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). O uso das BPCV como inoculantes no intuito de diminuir o consumo de insumos agrícolas tem aumentado nos últimos anos, não apenas pelo alto custo dos fertilizantes nitrogenados, como também por representar uma das mais importantes práticas para aumentar a sustentabilidade da agricultura (DE SOUZA; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2015).

O uso de inoculantes na agricultura remonta à época do naturalista romano, Plínio, o Velho (23 – 79 DC) que escreveu “O feijão ocupa o primeiro lugar entre as leguminosas. Fertiliza o solo em que foi semeado como o faria qualquer esterco”. Séculos depois em 1888, os cientistas alemães Hellriegel e Wilfarth descobriram a capacidade que têm as leguminosas para transformar nitrogênio molecular em amônia e, na mesma época, pelos trabalhos de Beijerinck, soube-se que os organismos envolvidos em tal processo são bactérias (SHURTLEFF; AOYAGI, 2018).

Remetendo-se ao contexto nacional (Figura 1), na década de 1940, os trabalhos de José Gomes da Silva, no Instituto Agrônomo de Campinas, e de João Rui Jardim Freire, na Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul, foram pioneiros na inoculação de soja, feijão e trevos utilizando inoculantes importados e realizando reisolamentos nacionais (DÖBEREINER; DUQUE, 1980). Nesse cenário, o aumento da produção de soja na década de 1960 foi o marco para produção de inoculantes no Brasil, pois as primeiras inoculações com *Bradyrhizobium japonicum* já se mostravam promissoras para aumentar o rendimento da cultura que viria ser o carro chefe da agricultura brasileira (ARAUJO, 2016).

Posteriormente, no começo da década de 1970, constituía-se a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e, assim, o grupo de pesquisa do antigo Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas do Ministério da Agricultura liderado pela pesquisadora Johanna Döbereiner (hoje conhecido como EMBRAPA Agrobiologia) passou a funcionar como Unidade de Apoio à Pesquisa em Biologia do Solo (UAPNBS) (EMBRAPA, 2020). No grupo estavam sendo realizados estudos sobre a fixação biológica do nitrogênio, sendo proposto que mesmo na ausência de nódulos em gramíneas, ocorria fixação biológica de nitrogênio. Foi assim que, a partir de trabalhos desenvolvidos, principalmente com gramíneas tropicais, as espécies *Azospirillum lipoferum* e *Azospirillum brasilense* foram descritas (BALDANI; BALDANI, 2005).

Figura 1 - Resumo da evolução de produção de inoculantes no Brasil.



Apesar do impacto de tal descoberta para a agricultura nacional e mundial, o primeiro inoculante brasileiro para gramíneas só foi comercializado em 2009. Esse atraso deve-se ao fato de que na época de 1970, a denominada “revolução verde” preconizava o uso de fertilizantes, prática que colocou o Brasil como exemplo de agricultura tropical, porém diminuiu o interesse de alternativas mais sustentáveis como a inoculação com BPCV em gramíneas (REIS, 2014).

As pesquisas desenvolvidas pela EMBRAPA em parceria com o Núcleo de Fixação Biológica da Universidade Federal do Paraná, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, desde o ano de 1996, resultaram no registro de quatro estirpes de *Azospirillum*

brasiliense autorizadas pelo MAPA para a produção de inoculantes comerciais (HUNGRIA, 2011). As estirpes *A. brasiliense* AbV4, AbV5, AbV6 e AbV7 foram recomendadas para o milho, e as estirpes AbV1, AbV5, AbV6 e AbV8, para o trigo. Tais estirpes geraram um incremento no rendimento de grãos de 24 – 30% para milho, e 14 – 18% para trigo, em comparação com o controle sem inoculação.

Os registros mais recentes sobre a produção de inoculantes no Brasil foram compilados no ano de 2018 pela Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes (ANPII). Nesse ano foram produzidas um total de 74,6 milhões de doses de inoculantes, das quais 9,1 milhões de doses foram de inoculantes para gramíneas e 63,9 milhões de doses foram de inoculantes para soja (ANPII, 2018). Tais valores refletem um expressivo crescimento nos últimos anos, de aproximadamente 365% no total de doses, durante o período compreendido entre os anos de 2009 e 2018. Isto significa a adoção plena da tecnologia por parte dos agricultores brasileiros (ARAUJO, 2018). Adicionalmente, é importante destacar que após a recomendação do uso da co-inoculação da soja com *Bradyrhizobium* spp. e *Azospirillum brasiliense* (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015), houve aumento de 320% na produção de inoculantes à base de *A. brasiliense* entre o período de 2015 até 2018 (ANPII, 2018).

1.4 A TÉCNICA DE PCR QUANTITATIVA – QPCR NO ESTUDO DO CICLO DO NITROGÊNIO E DE DIFERENTES COMUNIDADES MICROBIANAS DO SOLO

A aplicação da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir dos anos de 1990 permitiu avanços em estudos ecológicos do solo uma vez que não depende de metodologias de cultura *in vitro* e, com isso, revolucionou o entendimento da estrutura e diversidade das comunidades microbianas em diferentes sistemas (SMITH; OSBORN, 2009).

Embora permitisse inferir sobre a ecologia das comunidades microbianas do solo, a PCR é uma técnica “end-point”, na qual os resultados só podem ser analisados no final da reação e oferece apenas valores qualitativos, mas não quantitativos. Nesse sentido, o surgimento da técnica de qPCR (HIGUCHI et al., 1993) permitiu ter resultados quantitativos e em tempo real, utilizando-se um laser acoplado ao termociclador e marcando os ácidos nucleicos com um corante que gerasse fluorescência quando as duas fitas estivessem unidas.

A técnica de qPCR em essência, segue os mesmos passos de uma PCR convencional. Por exemplo, consiste de repetidos ciclos de amplificação do DNA onde este é inicialmente desnaturado, seguido pelo anelamento de um par de oligonucleotídeos específicos nas

extremidades da região de interesse e, subsequentemente, ocorre a ligação da enzima polimerase para extensão. Como resultado há um incremento exponencial do número de fragmentos de interesse a cada ciclo de PCR; porém, em contraste com a PCR “end-point”, o incremento de fragmentos é reportado a cada ciclo (ciclo de quantificação Cq) pela detecção de fluorescência (SMITH; OSBORN, 2009). Existem duas formas de reportar essa fluorescência: pela ação do corante intercalante *SYBR Green* ou *EVA Green*; e pelo sistema *TaqMan*.

No presente trabalho foi abordado somente o sistema de reporte pelo *SYBR Green*. De forma simplificada, o corante se liga à dupla fita de DNA/cDNA e, após cada ciclo de extensão, é emitido um sinal de fluorescência pela excitação do corante. Assim, o número de cópias de fragmentos acumulados é refletido no aumento da fluorescência emitida (HIGUCHI et al., 1993).

Uma vez finalizados os ciclos de amplificação, uma curva de dissociação ou curva de *melting* é gerada para confirmar se o sinal de fluorescência emitida pertence apenas à amplificação da região de interesse e não a produtos inespecíficos. Durante a curva de dissociação, a dupla fita de DNA é aquecida utilizando um gradiente de temperatura e, então, o sinal de fluorescência gerado é medido em cada ponto de temperatura. Nesse sentido, a temperatura na qual 50% da dupla fita é desnaturada pode ser usada para confirmar que o fragmento de interesse está presente, juntamente com a presença de outros produtos não específicos e/ou dímeros dos oligonucleotídeos iniciadores (SMITH; OSBORN, 2009).

Para estimar a eficiência da reação é preciso construir uma curva de calibração. Assim, a eficiência é definida como a fração de moléculas que são copiadas a cada ciclo. Para tal fim, a curva de calibração deve ser construída a partir de uma concentração conhecida do gene de interesse e, posteriormente, a partir dessa concentração, é realizada uma diluição seriada. É esperado que o valor de Cq versus o logaritmo da concentração do gene de interesse seja linear com uma inclinação (*slope*) negativa (SVEC et al., 2015). Em uma diluição seriada na ordem de 10, o *slope* = -3,33, o $r^2 = 1$, e a eficiência (E) = 2, indicando 100% de eficiência, ou seja, a cada ciclo de quantificação existe uma duplicação perfeita das moléculas, em resumo $E = 10^{-(1/slope)} - 1$ (CALLBECK et al., 2013).

A eficiência depende de vários fatores segundo Nolan et al. (2006) incluindo: 1) o desenho experimental, o qual inclui a seleção dos oligonucleotídeos iniciadores e a origem da amostra que será quantificada; 2) a amostra, q pode conter inibidores e outras substancias que interferem nos diferentes passos da reação; 3) os reagentes utilizados e sua concentração, sendo que estes não podem ser limitantes durante a reação; e, por último 4) a correta

calibração do equipamento, garantindo assim altos valores de eficiência e, principalmente, reprodutibilidade e precisão.

Uma vez verificados os fatores anteriores, existem questões chave que todo experimento de qPCR deve seguir, as quais foram sumarizadas por Bustin et al. (2009), a saber:

- Sensibilidade analítica: se refere ao número mínimo de cópias em uma amostra que pode ser medido com precisão. A sensibilidade é expressa como o limite de detecção (LOD – Limit of Detection), indicando a concentração que pode ser detectada com uma certeza de 95% de probabilidade.

- Especificidade analítica: se refere à capacidade que tem o ensaio de qPCR desenhado de detectar a sequência alvo ao invés de outras sequências inespecíficas que também estão presentes na amostra.

- Precisão: indica a diferença entre os valores medidos e os valores reais (obtidos a partir da diluição seriada), o que representa alterações na duplicação ou no número de cópias estimadas.

- Repetibilidade (precisão intra-ensaio): faz referência à precisão e robustez do ensaio ao analisar as mesmas amostras repetidamente, sendo expressa como o desvio padrão para a variância dos ciclos de quantificação.

- Reprodutibilidade (precisão inter-ensaio): se refere à variação nos resultados ao repetir a corrida ou ao repetir o experimento em outro laboratório, sendo expressa como o desvio padrão do número de cópias quantificado.

1.5 O SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO GENE 16S RRNA COMO ALTERNATIVA PARA O ENTENDIMENTO DA ESTRUTURA DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO

O microbioma do solo é definido como o conjunto de microrganismos que são encontrados nesse habitat incluindo Archaea, Bacteria, vírus, protistas, fungos e outros microrganismos eucariotos (FIERER, 2017). Embora no último século o avanço tecnológico tenha permitido incrementar o conhecimento da sua composição, a maior parte da diversidade do solo ainda permanece desconhecida (DELGADO-BAQUERIZO et al., 2018). Considerando-se que um grama de solo pode albergar até um bilhão de células bacterianas, representadas em aproximadamente um milhão de espécies (GANS; WOLINSKY; DUNBAR, 2005), até o momento se conhece cerca 1% dessa diversidade, principalmente devido ao fato de que a maioria dos microrganismos não são cultiváveis em laboratório

(SCHLOSS et al., 2016; KONSTANTINIDIS; ROSSELLÓ-MÓRARA, 2015). Nesse sentido, o uso de técnicas moleculares independentes de cultivo permite conhecer com uma boa resolução a diversidade de um dos ambientes mais ricos do planeta (TIEDJE et al., 1999).

Desde o sequenciamento dos primeiros genomas bacterianos no começo da década de 1990 até hoje, ou seja, 30 anos depois, foram sequenciados cerca de 300.000 genomas bacterianos (NCBI, 2021). O imenso volume de informação gerado foi aumentando com a capacidade de sequenciamento e a disponibilidade de diferentes plataformas de sequenciamento, o que se refletiu na diminuição dos custos e tornou a técnica muito mais acessível para diferentes centros de pesquisa (SHENDURE; JI, 2008).

Além do sequenciamento do genoma, o gene 16S rRNA é amplamente utilizado como marcador para o conhecimento da ecologia e diversidade bacteriana de amostras ambientais, já que todos os genomas bacterianos apresentam pelo menos uma cópia desse gene. Além disso, corresponde a uma região que apresenta regiões tanto variáveis como conservadas no genoma, e apresenta uma boa resolução taxonômica para diferentes níveis de classificação (LAND et al., 2015). Há 40,1 milhões de sequências do gene 16S rRNA depositadas na base de dados GenBank (BENSON et al., 2013) do NCBI, das quais 5,2 milhões correspondem a bactérias não cultiváveis (GENBANK, 2021). Contudo, o número de sequências de amostras de solo é muito baixo se comparado com o número de sequências associadas a um hospedeiro. Cerca de 7,8% de um total de 10 milhões de sequências registradas no GenBank em 2016 correspondiam a bactérias do solo, enquanto 55% correspondiam a bactérias dependentes de um hospedeiro (SCHLOSS et al., 2016).

O sequenciamento do gene 16S rRNA tem permitido explorar a composição da comunidade bacteriana do solo, evidenciando que apenas 2% dos filotipos dominantes são compartilhados em diferentes solos ao redor do mundo (DELGADO-BAQUERIZO et al., 2018), sendo que Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Planctomycetes, Chloroflexi, Verrucomicrobia e Bacteroidetes são os mais abundantes (JANSSEN, 2006). Tal variação se deve aos fatores que modelam o comportamento das comunidades, principalmente o pH do solo (LAUBER et al., 2009), a disponibilidade e qualidade de carbono orgânico (SUL et al., 2013), e a disponibilidade de nitrogênio bem como a adução nitrogenada (CEDERLUND et al., 2014).

Dentre as plataformas disponíveis para sequenciamento de segunda geração, a plataforma Illumina se tornou a mais utilizada nos últimos anos devido ao baixo custo dos reagentes e alto rendimento para geração de sequências, quando comparada com plataformas como a 454 da Roche ou a SOLiD da Applied Biosystems (LIU et al., 2012). Contudo, o

desenvolvimento de plataformas para sequenciamento de terceira geração como GanapSys, Genia, Nanopore, Firefly entre outras, as quais visam maior acurácia e comprimento das sequências, registram um crescimento acelerado, principalmente porque são técnicas que respondem à demanda clínica (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

Levando em consideração o grande volume de informação gerada no sequenciamento de amostras de solo e a alta percentagem de sequências de 16S rRNA que ainda permanece sem classificação taxonômica em bases de dados (KONSTANTINIDIS; ROSSELLÓ-MÓRARA, 2015), é inerente a necessidade de estudos que visem preencher essa lacuna. Análises metataxonômicas são úteis não apenas para o conhecimento da composição bacteriana do solo, como também para um melhor entendimento da ecologia das comunidades presentes, permitindo assim identificar organismos chave que formam redes de interações microbianas no solo, fundamentais para a estabilidade e saúde do ecossistema (BANERJEE; SCHLAEPPI; A HEIJDEN, 2018).

2 METODOLOGIA GERAL

2.1 ÁREA DE ESTUDO

O experimento foi realizado no município de Ponta Grossa, PR, (25°13'S, 50°07'W), em uma área com um histórico de mais de 30 anos sob sistema plantio direto. A área experimental apresenta uma altitude de 830 m, precipitação pluvial anual média de 1550 mm e temperaturas médias que oscilam entre 17 °C e 28 °C. A classificação do clima é do tipo Cbf, com verão ameno e geadas constantes durante o inverno (PEEL; FINLAYSON; MCMAHON, 2007). O solo utilizado foi um Latossolo Vermelho distrófico (SANTOS, 2018) textura muito argilosa.

O presente estudo foi conduzido durante o inverno de 2017 e o inverno de 2019, a partir de um experimento com culturas em rotação que foi utilizado nos trabalhos de dissertação e de tese do aluno egresso Dr. Angelo Rafael Bini, sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires do Programa de Pós Graduação em Agronomia da UEPG. Todos os dados referentes às análises do solo, semeadura e produtividade das culturas apresentados nesse trabalho foram gentilmente compartilhados pelo Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires do Laboratório de Fertilidade do Solo da UEPG.

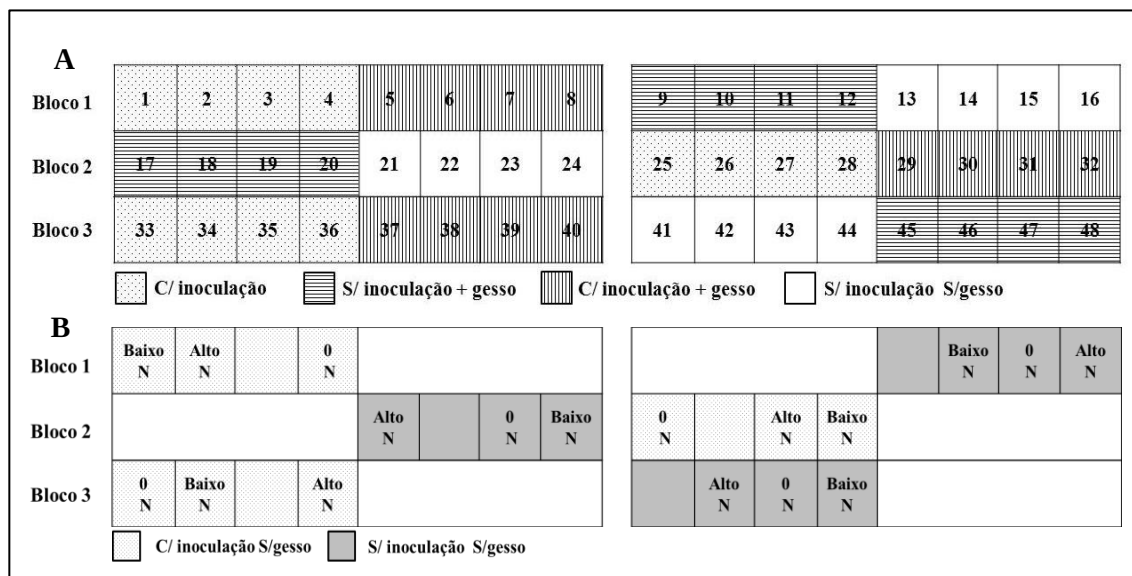
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental utilizado foi em blocos ao acaso no esquema de parcelas subdivididas, com três repetições. Uma visão geral do croqui do experimento pode ser observada na Figura 2A. Cada parcela foi representada por uma área de 208 m² (32,0 m × 6,5 m), e cada subparcela 52 m² (8,0 m × 6,5 m). As parcelas corresponderam aos tratamentos com e sem inoculação, utilizando-se inoculante comercial à base de *A. brasilense* AbV5/AbV6 (seguindo as concentrações recomendadas para cada cultura). Na cultura da soja, todas as parcelas foram inoculadas com inoculante comercial a base de *Bradyrhizobium japonicum* semia 5079 e semia 5080 (recentemente reclassificada como *B. diazoefficiens* por Delamuta et al. (2013) e co-inoculadas com *A. brasilense* em parcelas com inoculação de *A. brasilense* em outras culturas. As subparcelas corresponderam a quatro doses de N-ureia em cobertura, ajustando-se as doses segundo os requerimentos de cada cultura (Tabela 1).

Para o desenvolvimento da presente pesquisa não foram consideradas as parcelas com adição de gesso, e também não foram consideradas as quatro doses de nitrogênio, apenas os

valores zero, baixo e alto, dependendo de cada cultura, como descrito na Tabela 1. Um croqui das parcelas que foram utilizadas neste estudo pode ser observado na Figura 2B.

Figura 2 - Croqui geral do experimento implantado em setembro de 2012 no esquema de blocos ao acaso em parcelas subdivididas, com três repetições (A). Croqui das parcelas que foram utilizadas no presente estudo (B).



2.3 TRATOS CULTURAIS

O milho, híbrido DKB 230, foi semeado no espaçamento foi de 0,50 m entre as linhas, sendo utilizadas 3,9 sementes por metro de linha. O trigo, cultivar TBIO Sossego, foi semeado no espaçamento foi de 0,22 m entre as linhas e na densidade de 150 kg ha⁻¹ de sementes. A soja, cultivar Brasmax Lança 58160 IPRO, foi semeada com espaçamento de 0,45 m entre linhas visando uma população de 28 plantas por m². A aveia preta e o centeio foram utilizados como culturas de cobertura no inverno em 2017 e 2019. Dados referentes à adubação e à inoculação para milho, trigo e soja foram registrados (Tabela 1) a partir do trabalho de dissertação de Bini (2015).

2.4 ANÁLISE QUÍMICA E GRANULOMÉTRICA DO SOLO

As análises foram realizadas pelo Laboratório de Fertilidade do Solo da UEPG. As amostras de cada parcela foram coletadas no final da cultura da soja, no verão de 2016/2017, antes da semeadura da aveia preta em abril de 2017.

De forma resumida, o pH foi determinado em CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, a acidez potencial (H⁺Al) pelo método de tampão de SMP, os teores de alumínio (Al), cálcio (Ca) e magnésio

(Mg) por extração com solução de KCl 1 mol L⁻¹, fósforo (P) disponível e potássio (K) trocável por extração com solução de Mehlich 1, e carbono orgânico pelo método de Walkley-Black (PAVAN et al., 1992), utilizando-se o fator de conversão de 1,72 para obter o teor de matéria orgânica (CATANI; KÜPPER, 1946). O teor de sulfato (S-SO₄²⁻) foi determinado por extração com solução de fosfato de cálcio 0,01 mol L⁻¹ (CANTARELLA; PROCHNOW, 2001). Adicionalmente foram determinados teores de areia, silte e argila, seguindo a metodologia de EMBRAPA (1997).

Tabela 1 - Parâmetros para a adubação e inoculação (*A. brasilense* ou *A. brasilense* + *B. japonicum*) de aveia preta, milho, trigo e soja. N: aplicação de ureia, P: aplicação de P₂O₅ na forma de fosfato monoamônio (MAP), K: aplicação de K₂O na forma KCl.

CULTURA	ADUBAÇÃO kg ha ⁻¹				INOCULAÇÃO mL kg ⁻¹ de sementes
	Nutriente	Base	Cobertura		
			Dose	Estádio fenológico	
Aveia preta	N	15			Sem inoculação
	P	26,20			
	K				
Milho	N	45	0; 80; 240	V4-V6	▲
	P	25,10		Na semeadura	
	K		100		
Trigo	N	56	0; 40; 120	Perfilhamento	2,5
	P	49,78		Na semeadura	
	K		100		
Soja ⁺	N		0; 25; 75	R3	2 ^a
	P	*			2 ^b
	K				
Centeio	N	15			Sem inoculação
	P	26,20			
	K				

Notas: ▲ 100 mL para 60000 sementes

⁺ A cultura da soja recebeu co-inoculação com *B. japonicum* e *A. brasilense*

*A adubação de base da cultura da soja foi adiantada na cultura do trigo

^a Dose do inoculante comercial a base de *A. brasilense* AbV5/AbV6 numa formulação de 2 x10⁸ UFC ml⁻¹

^b Dose do inoculante comercial a base de *B. japonicum* SEMIA5079/5080 numa formulação de 5 x10⁹ UFCmL⁻¹. UFC = Unidades Formadoras de Colônia.

3 ARTIGOS

3.1 DETECÇÃO DE *Azospirillum brasilense* PELA TÉCNICA DE QPCR NA CULTURA DO MILHO EM CONDIÇÕES DE CAMPO

3.1.1 Introdução

Diante dos efeitos positivos das bactérias do gênero *Azospirillum* para o desenvolvimento e consequente produtividade das culturas, diversas espécies tem sido estudadas, dentre elas *Azospirillum brasilense* e *Azospirillum lipoferum* (BALDANI; BALDANI, 2005). *A. brasilense* é a espécie mais utilizada na formulação de inoculantes para gramíneas, existindo 106 inoculantes comerciais registrados na América do Sul, sendo a Argentina e o Brasil os principais produtores (CASSÁN et al., 2020).

No Brasil, grande parte dos inoculantes a base de *A. brasilense* são formulados a partir das estirpes AbV5/AbV6, e são recomendados principalmente para as culturas de milho e trigo, e em co-inoculação com *Bradyrhizobium* para soja e *Rhizobium tropici* para o feijoeiro (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). Segundo dados da Associação Nacional dos Produtores e Importadores de Inoculantes – ANPII, o número de doses vendidas de inoculantes formulados com *A. brasilense* aumentou de 2,5 milhões, em 2012, para mais de 9 milhões em 2018 (ANPII, 2019).

De modo geral, as formas de inoculação de *Azospirillum* ocorrem diretamente no solo, sobre a raiz ou sobre a superfície das sementes, sendo esta última a mais utilizada. A inoculação muitas vezes encontra-se afetada porque a manipulação é inadequada e, como consequência, a população de bactérias diminui rapidamente (BASHAN; DE-BASHAN, 2015). As características do solo também são importantes para o estabelecimento da associação entre planta – bactéria, podendo ser determinantes para garantir o sucesso da inoculação.

A inoculação de *Azospirillum* em culturas como trigo, milho e sorgo causa mudanças morfológicas na raiz, as quais se iniciam imediatamente após germinação das sementes; tais mudanças podem ser observadas no aumento de pelos radiculares e no aumento de ramificações (OKON; KAPULNIK, 1986; CASSÁN et al., 2020).

Bashan et al. (1995), em um estudo de comparação da sobrevivência de *A. brasilense* Cd e Sp-245 tanto no solo como na rizosfera, utilizando 23 tipos de solos diferentes, concluíram que a espécie coloniza a rizosfera sobrevivendo muito mais tempo aderido à raiz

do que no solo. Tal colonização depende da mobilidade de *Azospirillum* e a atração de diferentes exsudatos das plantas (ALEXANDRE, 2015). Já, o processo de ligação à raiz depende principalmente de dois fatores: (i) a existência de um flagelo polar que auxilia as bactérias no processo de adsorção às raízes e (ii) a produção de exopolissacarídeos, os quais permitem que as bactérias se fixem firmemente à superfície da raiz (PEREG; MCMILLAN, 2015).

O comportamento no processo de colonização das raízes pode variar dependendo da estirpe inoculada. Na estirpe *A. brasilense* Cd, por exemplo, a adsorção em raízes de trigo ocorre na superfície da raiz principalmente, e em menor proporção nos pelos radiculares (BASHAN; LEVANONY, 1989). Resultados semelhantes foram encontrados em raízes de morango inoculado com *A. brasilense* REC5 e PEC5 (GUERRERO-MOLINA; WINIK; PEDRAZA, 2012). Por outro lado, foi observado em raízes de trigo que *A. brasilense* Sp-245 (recentemente reclassificada como *A. baldaniorum* por Ferreira et al. (2020) também coloniza a superfície da raiz, contudo, pode ser encontrada no interior formando pequenas colônias no espaço intercelular, enquanto *A. brasilense* Sp7 e Wa5 foram encontradas exclusivamente na superfície da raiz (SCHLOTER; HARTMANN, 1998).

3.1.1.1 Estudos pioneiros sobre quantificação de *A. brasilense*

São escassos os trabalhos que quantificaram *A. brasilense* no solo, embora esse seja o ponto de partida para auxiliar na formulação de protocolos que permitam compreender melhor o comportamento de tais bactérias após inoculação.

Couillerot et al. (2010b) monitoraram durante 10 dias a presença das estirpes de *A. brasilense* UAP-154 e CFN-535 na rizosfera do milho em condições de laboratório, a partir de marcadores SCAR desenhados para a cada estirpe. Os valores médios encontrados para as duas estirpes oscilaram na ordem de 10^5 UFC por sistema de raiz.

Faleiro et al. (2013) monitoraram *A. brasilense* FP2 em raízes de milho durante 10 dias em condições de laboratório, a partir de oligonucleotídeos desenhados para uma região específica no gene *nifA*. Valores na ordem de 10^8 UFC g⁻¹ de raiz foram obtidos nos primeiros dias do experimento, e até 10^7 UFC g⁻¹ de raiz no último dia.

Cotta (2015) registrou em um trabalho de dissertação de mestrado (dados não publicados) o monitoramento de *A. brasilense* AbV5, AbV6 e AbV7 na cultura do milho em condições de campo durante 28 dias, utilizando o par de oligonucleotídeos Azo-2.1 (STETS et al., 2015). Os resultados indicaram que as estirpes de *A. brasilense* utilizadas encontravam-se

em uma concentração na ordem de 10^4 UFC g⁻¹ de raiz, porém também foram encontradas no controle sem inoculação, sugerindo que algumas estirpes inoculadas se encontravam no solo onde foi realizado o experimento.

Stets et al. (2015) desenharam oligonucleotídeos espécie específicos e estirpe específicos para *A. brasilense* FP2, os quais foram testados em um experimento de inoculação de *A. brasilense* FP2 em raízes de trigo, tanto em condições estéreis como não estéreis, em casa de vegetação. Os autores registraram valores na ordem de 10^7 UFC g⁻¹ de raiz durante 13 dias, como também foi constatado que *A. brasilense* FP2 é uma bactéria altamente competitiva, uma vez que quando foi quantificada em presença de outras bactérias, o número de UFC não diminuiu.

Cardozo (2017), em um trabalho de dissertação (dados não publicados), quantificou *A. brasilense* FP2 em condições não estéreis em casa de vegetação, durante 21 dias, utilizando os oligonucleotídeos Azo-2.1 (STETS et al., 2015) e AznifAF12/AznifAF19 (FALEIRO et al., 2013). Os resultados indicaram que utilizando AznifAF12/AznifAF19 não foi possível detectar a bactéria inoculada; já com Azo-2.1, a bactéria foi detectada até o vigésimo primeiro dia em concentrações na ordem de $10^7 - 10^8$ UFC g⁻¹ de raiz.

Embora exista um vasto número de trabalhos sobre inoculação com diferentes estirpes de *A. brasilense*, há questões que ainda precisam ser respondidas como: (i) há um período em que é possível detectar as bactérias inoculadas no solo, seja em associação com as raízes das plantas inoculadas ou livres na rizosfera destas?; (ii) qual é a quantidade de bactérias que coloniza as raízes?; e (iii) há uma oscilação na densidade da população bacteriana em associação com a planta ao longo do desenvolvimento desta? Essas questões perduram principalmente devido à dificuldade de desenvolver um protocolo preciso para a quantificação em campo.

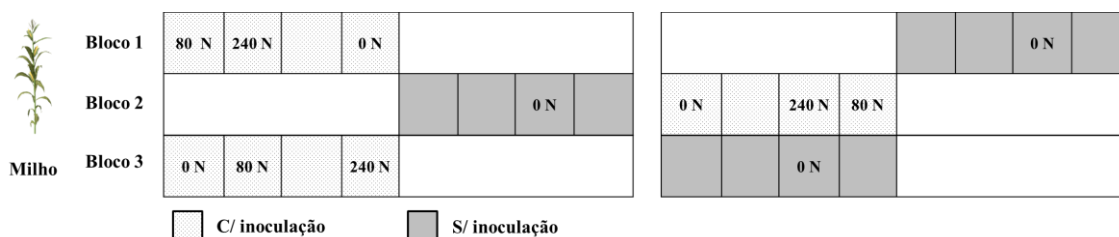
Diante do exposto, o presente capítulo teve os objetivos de (i) quantificar *A. brasilense* AbV5/AbV6 inoculado via semente no milho, pela técnica de qPCR, ao longo do desenvolvimento da cultura e (ii) correlacionar a produtividade de grãos de milho com o efeito da inoculação.

3.1.2 Material e Métodos

3.1.2.1 Delineamento experimental e implantação do experimento

No presente experimento foram utilizadas apenas parcelas inoculadas com *Azospirillum brasilense* AbV5/AbV6. Os controles de solo corresponderam às parcelas 0N sem inoculação (Figura 3) e os controles da raiz corresponderam às plantas de milho que não receberam inoculação. Embora as coletas tenham sido realizadas nas subparcelas com 0, 80 e 240 kg N ha⁻¹, não foram consideradas as doses de N, apenas as três repetições da parcela com inoculação, devido ao fato de a adubação nitrogenada ter sido realizada no estágio fenológico V4-V6, no qual já a colonização da raiz por parte da bactéria já haveria ocorrido.

Figura 3 - Parcelas utilizadas para avaliação da sobrevivência de *A. brasilense* AbV5/AbV6 em condições de campo, durante 75 dias após semeadura.



As sementes de milho foram do híbrido hiper precoce DKB 230. Como registrado na metodologia geral, o milho foi semeado sobre a palhada de aveia preta e a cultura recebeu adubação de base com 45 kg ha⁻¹ de N e 25 kg ha⁻¹ de P. Os resultados referentes à produtividade do milho e os valores de precipitação pluvial média foram gentilmente compartilhados pelo Dr. Angelo Rafael Bini sob a orientação do Prof. Dr. Eduardo Fávero Caires (Laboratório de Fertilidade do Solo/UEPG).

As sementes tinham recebido tratamento de sementes de fábrica e em campo foi adicionado grafite antes da inoculação. Foram inoculados em um saco de 16 kg de sementes, 100 mL de *A. brasilense* AbV5/AbV6, via inoculante líquido comercial Azo Total[®], em uma concentração de 2×10^8 UFC mL⁻¹. Realizou-se a homogeneização manual e, em seguida, foi feita a semeadura com semeadora a vácuo. O processo de inoculação e semeadura foi realizado sem nenhum outro cuidado especial que visasse proteger as bactérias inoculadas, simulando as condições de campo em que os agricultores utilizam o inoculante.

3.1.2.2 Coleta de amostras

A coleta das amostras para análise foi realizada a partir da semeadura e até 75 dias após semeadura (DAS), como detalhado na Tabela 2, na qual estão especificados os dias de coleta, o tipo de amostra coletada (semente ou sistema radicular) e a fase de desenvolvimento do milho no ato de cada coleta. Os 75 dias de coleta foram definidos pelo avançado estado de desenvolvimento das raízes das plantas, o que gerou dificuldade na retirada das plantas sem afetar a estrutura da raiz.

Uma amostra composta para cada dia de coleta foi representada por 18 subamostras (duas amostras de cada parcela). Para cada dia de coleta foram geradas duas amostras em laboratório a partir da amostra composta, sendo elas: 1) solo rizosférico e 2) sistema radicular, seguindo o protocolo proposto por Couillerot et al. (2010a) com algumas modificações.

Para a coleta de solo rizosférico, depois de descartar o excesso de solo sacudindo vigorosamente a semente/sistema radicular, as amostras foram transferidas para um Erlenmeyer. Adicionou-se água destilada estéril (o suficiente até cobrir as sementes/sistema radicular), e as amostras foram agitadas em agitador orbital (*New Brunswick Scientific Classic*, C25KC) a 160 rpm, durante 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram retiradas e reservadas. A solução obtida (rizosfera + água) foi deixada em repouso até a decantação do solo, sendo a água descartada com ajuda de uma pipeta e o solo resultante transferido para um tubo plástico de 50 mL estéril, o qual foi em seguida centrifugado (*Eppendorf* 5810 R) a 5500xg por 10 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi descartado com ajuda de uma pipeta e solo sedimentado foi considerado como solo rizosférico. A amostra foi armazenada a -20°C para posterior extração de DNA.

Para as amostras de raiz, as estruturas vegetais reservadas no passo anterior foram lavadas sucessivamente com água ultrapura estéril até observar ausência de resíduos de solo. Em seguida retirou-se o excesso de água e, posteriormente, elas foram finamente picadas com ajuda de uma lâmina de corte, para depois serem maceradas com almofariz e pistilo de porcelana. Finalmente, elas foram armazenadas a -20°C para posterior extração de DNA.

3.1.2.3 Extração de DNA total do solo e raiz

O DNA do solo rizosférico e o DNA da raiz foram extraídos utilizando-se os kits *PowerSoil DNA isolation* e *DNeasy PowerPlant Pro* da *MOBIO Laboratories, Inc.* respectivamente, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após extração o DNA

foi quantificado por espectrofotometria em NanoVue™ Plus, no Laboratório de Genética Evolutiva – UEPG, e finalmente armazenado a -20 °C.

Tabela 2 - Cronograma de coletas do para o monitoramento de *A. brasilense* AbV5/AbV6 na cultura do milho.

Evento	Data	DAS	Amostra	Fase fenológica
Semeadura	31/08/2017	0		
Coleta 1	01/09/2017	1	Semente	
Coleta 2	03/09/2017	3	Semente	
Coleta 3	05/09/2017	5	Radícula	
Coleta 4	07/09/2017	7	Sistema radicular seminal	
Coleta 5	09/09/2017	9	Sistema radicular	VE
Coleta 6	11/09/2017	11	Sistema radicular	
Coleta 7	13/09/2017	13	Sistema radicular	V1
Coleta 8	15/09/2017	15	Sistema radicular	V2
Coleta 9	20/09/2017	20	Sistema radicular	V3
Coleta 10	25/09/2017	25	Sistema radicular	V4
Coleta 11	05/10/2017	35	Sistema radicular	V6
Coleta 12	15/10/2017	45	Sistema radicular	V8
Coleta 13	14/11/2017	75	Sistema radicular	Pendoamento

Notas: DAS: dias após semeadura. VE: emergência. V(n): número de folhas totalmente expandidas.

3.1.2.3 Extração de DNA total do solo e raiz

O DNA do solo rizosférico e o DNA da raiz foram extraídos utilizando-se os kits *PowerSoil DNA isolation* e *DNeasy PowerPlant Pro* da *MOBIO Laboratories, Inc.* respectivamente, seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após extração o DNA foi quantificado por espectrofotometria em NanoVue™ Plus, no Laboratório de Genética Evolutiva – UEPG, e finalmente armazenado a -20 °C.

3.1.2.4 Extração de DNA bacteriano por desnaturação de colônia isolada

Foram preparados pré-inóculos de *A. brasilense* FP2 e de *Bradyrhizobium japonicum* (Tabela 3), a partir da inoculação de células de cada estirpe em 5 mL de meio líquido NFb (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999) e YM (VINCENT, 1970), respectivamente. As células foram mantidas sob cultivo a 30°C e 180 rpm, até saturação da cultura. Em seguida, as culturas foram crescidas em meio sólido (NFb e YM) e mantidas a 30°C em ausência de luz, até observar a formação de colônias isoladas.

Para extração do DNA, colônias das duas estirpes foram colocadas (1 colônia = 1 tubo) em microtubos (200 µL) contendo 10 µL de água ultrapura estéril. Finalmente, as células foram desnaturadas a 95 °C durante 10 minutos. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C.

Tabela 3 - Microrganismos utilizados na presente pesquisa com suas respectivas origens e meios de cultura.

Organismo	Referência	Origem da cultura	Meio de Cultura	Resistência
<i>A. brasilense</i> FP2	(PEDROSA; YATES, 1984)	Coleção de culturas do NFN da UFPR	NFb (DÖBEREINER; ANDRADE; BALDANI, 1999)	Sm 80 ^a Nal 10 ^b
<i>A. brasilense</i> AbV5/AbV6	(HUNGRIA, 2011)	Inoculante comercial Grap Noda [®]		
<i>B. japonicum</i> SEMIA 5079 e SEMIA 5080*	(VARGAS et al., 1992)	Inoculante comercial Grap Nod+ [®]	YM (VINCENT, 1970)	

Notas: *Estirpe reclassificada como *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov (DELAMUTA et al., 2013).

^a Estreptomicina (Sm) em concentração de uso de 80 µg mL⁻¹

^b Ácido nalidíxico (Nal) em concentração de uso de 10 µg mL⁻¹

3.1.2.5 Especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores para *A. brasilense*

A especificidade dos oligonucleotídeos iniciadores Azo-2, Azo-2.1 e Azo-2.2 (STETS et al., 2015) (Tabela 4) foi verificada a partir da reação de PCR, seguindo os parâmetros recomendados por Stets et al. (2015). Utilizou-se o DNA extraído da colônia isolada de *A. brasilense* FP2 como controle positivo e de *B. japonicum* como controle negativo. O sistema para cada reação de 50 µL continha 5 µL de tampão da polimerase *Taq* (10x, *Invitrogen*), 2 mM de MgCl₂ (50 mM, *Invitrogen*), 200 µM de dNTPs (10 mM, *Fermentas*), 0,2 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (10 µM), 2 U de *Taq* (6 U µL⁻¹ *Invitrogen*) e água ultrapura estéril. A amplificação foi conduzida no termociclador *Eppendorf Master Cycler Gradient*, constando de um ciclo inicial de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguido de 25 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C, 30 segundos a 72°C e um ciclo de extensão de 10 minutos a 70°C.

Os produtos da amplificação por PCR foram observados em gel de agarose como descrito por Sambrook e Russell (2001). O tampão de corrida foi TBE 1X, a concentração do gel foi de 2% (p/v) e os produtos de amplificação foram misturados com corante FSUDS (5x, composição: glicerol 30%, EDTA500 mM pH 8, azul de bromofenol 0,25%, H₂O DEPC 0,1%). A corrida foi a 90 V durante uma hora. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg.mL⁻¹ durante 20 minutos, retirando o excesso de corante

pela submersão do gel em água durante 5 minutos. O DNA foi visualizado em transiluminador (*Fusion FX, Vilber lourmat*) e a confirmação da especificidade foi determinada pela presença de banda única no tamanho de 90 pb.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de PCR e qPCR.

Oligonucleotídeo iniciador	Sequência	Especificidade	Amplicon (pb)	Referência
Azo-2 F	GCGCGGGAAGTCCTGAAT	Espécie	90	STETS et al., 2015
Azo-2 R	CCCTTCACCATCCAGTCGAT			
Azo-2.1 F	CGCCACCATGCGATCAA	Estirpe	90	STETS et al., 2015
Azo-2.1 R	GCATGCCCAGTACTGCAAGTC			
Azo-2.2 F	CCTTCACCTGGACGGTTCAG	Estirpe	90	STETS et al., 2015
Azo-2.2 R	CGCGGCCAGCAGACTT			
16S rRNA 341 F	CCTACGGGAGGCAGCAG	Bactérias totais	174	BRU; MARTIN-LAURENT; PHILIPPOT, 2008
16S rRNA 534 R	ATTACCGCGGCTGCTGGCA			

3.1.2.6 Geração das curvas de calibração para Azo-2, Azo-2.1 e Azo-2.2

A eficiência (E) da reação de qPCR na presença de cada par de oligonucleotídeos foi verificada a partir de uma curva de calibração. Os parâmetros, número de diluições, volume de diluição, número de repetições técnicas por diluição, entre outros, foram definidos seguindo a recomendação de Burns et al. (2005) e Svec et al. (2015), garantindo assim resultados mais robustos e completos (BUSTIN et al., 2009). As curvas também permitiram estimar os valores de *slope*, R^2 , limites de detecção e de quantificação.

Para obtenção do DNA das diluições para construção da curva foi seguido o protocolo proposto por Couillerot et al. (2010b) com algumas modificações. Resumidamente, 300 g de solo oriundo do mesmo local onde foi realizado o experimento foram autoclavados durante 40 minutos a 120°C. Posteriormente, em sete tubos de extração do kit *PowerSoil DNA isolation* da *MOBIO Laboratories, Inc*, foram colocados 0,25 g de solo autoclavado. Paralelamente, foi realizada uma diluição seriada de 10^8 até 10^2 do inoculante comercial Grap Noda[®] a base de *A. brasilense* AbV5/AbV6, e 1000 µL de cada diluição foram inoculados nos tubos de extração contendo o solo autoclavado. Foram deixados em repouso durante uma hora a 4 °C para promover a interação entre o solo e as bactérias e, finalmente, o DNA foi extraído seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do kit. O DNA foi quantificado e armazenado a -20 °C.

A partir do DNA extraído, foram construídas as curvas, utilizando-se o termociclador *Lyghtcycler[®] Nano Roche*. Cada amostra foi quantificada em duplicata e foram seguidos os

mesmos parâmetros estabelecidos para a quantificação das amostras de campo, os quais estão descritos no tópico a seguir.

3.1.2.7 Quantificação de *A. brasilense* AbV5/AbV6 em amostras de campo

Antes de proceder com as quantificações por qPCR, foi realizada uma PCR convencional para verificar a presença de *A. brasilense* AbV5/AbV6 nas amostras de rizosfera ou raiz.

O sistema para cada reação foi de 20 µL, composto por 2 µL de tampão (10x contendo 15 mM de MgCl₂), 200 µM de dNTPs (10 mM, *Fermentas*), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo iniciador (10 µM), 2,5 U de Taq (5 U µL⁻¹ *HotStarTaq*, Qiagen) e água ultrapura estéril. A amplificação foi conduzida no termociclador *Eppendorf Master Cycler Gradient*, constando de um ciclo inicial de 15 minutos a 95°C para ativação da enzima, seguido por 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C, um minuto a 72°C, e um ciclo de extensão de 10 minutos a 72°C. Os produtos da reação foram analisados por eletroforese, como descrito anteriormente, sempre confirmando a amplificação pela presença de banda única no tamanho de 90 pb.

Uma vez confirmada a presença do inoculante nas amostras, foi procedida a quantificação do número de UFC de *A. brasilense* AbV5/AbV6. Utilizando-se o termociclador *Lightcycler*® *Nano* Roche, cada reação consistiu de 10 µL de SYBR (*FastStart Essential DNA Green Master*), 2,5 µL de água ultrapura estéril, 1 µL de cada par de oligonucleotídeos (10 pmol.µL⁻¹), 0,5 µL de BSA (10 mg.ml⁻¹ *BioLabs*) e 5 µL de DNA (15 – 50 ng. µL⁻¹), para um volume de reação de 20 µL. O programa de corrida para as reações foi um ciclo de 10 minutos a 95° C, seguido de 40 ciclos de três etapas: 15 segundos a 95° C, 20 segundos a 60° C, e uma etapa final de 20 segundos a 72 °C. Para a construção da curva de dissociação (curva de *Melting*) foram aceitas as configurações automáticas do equipamento. A saber, um ciclo de 10 segundos a 95 °C, seguido de uma etapa inicial começando em 60 ° C, com aumento de 0,1 °Cs⁻¹ até atingir a etapa final em 97 °C. A determinação do número de cópias foi realizada automaticamente no software do equipamento *Lightcycler*® *Nano* Software 1.1, utilizando-se a curva de calibração como parâmetro.

Cada amostra foi quantificada em triplicata técnica. Cada corrida também foi realizada em triplicata (ou mais quando necessário) até obter pelo menos uma replicata de cada amostra em que a variação de Cq não fosse superior a 0,5 ciclos e a temperatura do pico da curva de

dissociação fosse a mesma. Todos os produtos de quantificação foram confirmados por eletroforese em gel de agarose como descrito anteriormente.

Além da quantificação de *A. brasilense* AbV5/AbV6, também foi quantificado o gene 16S rRNA para determinar o número aproximado de bactérias nas amostras positivas para a presença do inoculante. Para tal, foi utilizado o par de oligonucleotídeos informados na Tabela 4, e os parâmetros de reação foram os mesmos relatados para *A. brasilense* AbV5/AbV6. Foi utilizada a média de 4,2 cópias do gene 16S rRNA (VĚTROVSKÝ; BALDRIAN, 2013) para converter o valor absoluto de cópias do gene em UFC.

Com a finalidade de padronizar a quantidade de DNA (20 ng μL^{-1}) utilizada em cada amostra e a quantidade de UFC para um grama de solo ou de raiz, os valores de UFC obtidos pela quantificação por qPCR, foram convertidos utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{UFC}{\text{g solo ou raiz}} = 4 \left[\frac{(20 * A)}{(5 * B)} \right]$$

Onde:

UFC = Número de unidades formadoras de colônia

A = número de UFC quantificadas em cada corrida.

B = Concentração da amostra (DNA ng μL^{-1}) quantificado em NanoVue™ Plus

Na fórmula anterior, o número quatro refere-se a quatro partes de 250 mg (massa de cada amostra de solo utilizada para a extração de DNA) para completar um grama de solo; o número 20 refere-se à quantidade de DNA desejada para cada amostra, neste caso 20 ng μL^{-1} ; finalmente, o número 5 refere-se aos μL de DNA utilizados para quantificar cada amostra.

As análises estatísticas foram realizadas no pacote *Agricolae* (DE MEDIBURU, 2019), e *Laercio* (DA SILVA, 2015) no programa R.

3.1.3 Resultados e Discussão

Os resultados do presente capítulo foram publicados na revista *Applied Soil Ecology*, v. 160, 103849. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103849> com o título “*Detection of Azospirillum brasilense by qPCR throughout a maize field trial*”.

3.1.3.1 Ajuste de parâmetros para Azo-2, Azo-2.1 e Azo-2.2

Como relatado por Stets et al. (2015), os oligonucleotídeos testados Azo-2, Azo-2.1 e Azo-2.2 são específicos para *A. brasilense* (Figura 4). Uma vez confirmada a especificidade

dos oligonucleotídeos, foi elaborada a curva de calibração (Figura 5) a qual representa uma regressão linear entre o Cq e o número de UFC g⁻¹ de solo. A curva apresentou valores de eficiência (E), r² e *slope* (Tabela 5) dentro dos limites aceitáveis, isto é, E= 90 – 110%, r²= perto de 1, *slope*= entre -2,98 e -3,65 (BUSTIN et al., 2009; D’HAENE; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010; SVEC et al., 2015).

Além dos parâmetros anteriores, cada curva de calibração foi analisada levando em consideração as curvas de *Melting* e a posterior confirmação dos produtos de amplificação por eletroforese. Tais parâmetros indicam se há amplificação de produtos inespecíficos, quer seja por ação dos oligonucleotídeos ou por contaminantes no mix de reação. Este último foi verificado utilizando um controle sem adição de DNA (NTC do inglês *no template control*). Na Figura 6 são apresentadas as curvas de *Melting* e as respectivas confirmações por eletroforese.

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo dos produtos de PCR para o teste de especificidade dos oligonucleotídeos Azo-2, Azo-2.1 e Azo-2.2. Controle positivo (Cont. +): DNA de colônia de *A. brasilense* FP2. Controle negativo para os oligonucleotídeos (Cont. o. -): DNA de *B. japonicum*. Controle negativo do mix de reação (NTC – *No Template Control*): sem adição de DNA.

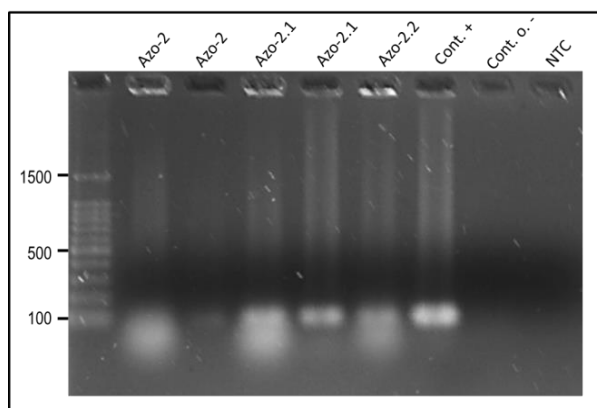


Figura 5 - Curva de calibração para os oligonucleotídeos Azo-2, Azo-2.1 e Azo-2.2 a partir da regressão linear do log UFC g⁻¹ de solo e o Ciclo de quantificação (Cq). Os pontos representam duplicatas do DNA produto da diluição seriada (2x10⁸ – 2x10³) de *A. brasilense* AbV5/AbV6 inoculado em solo estéril.

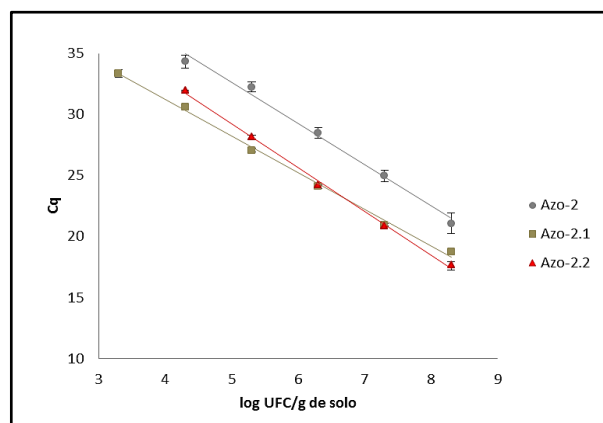
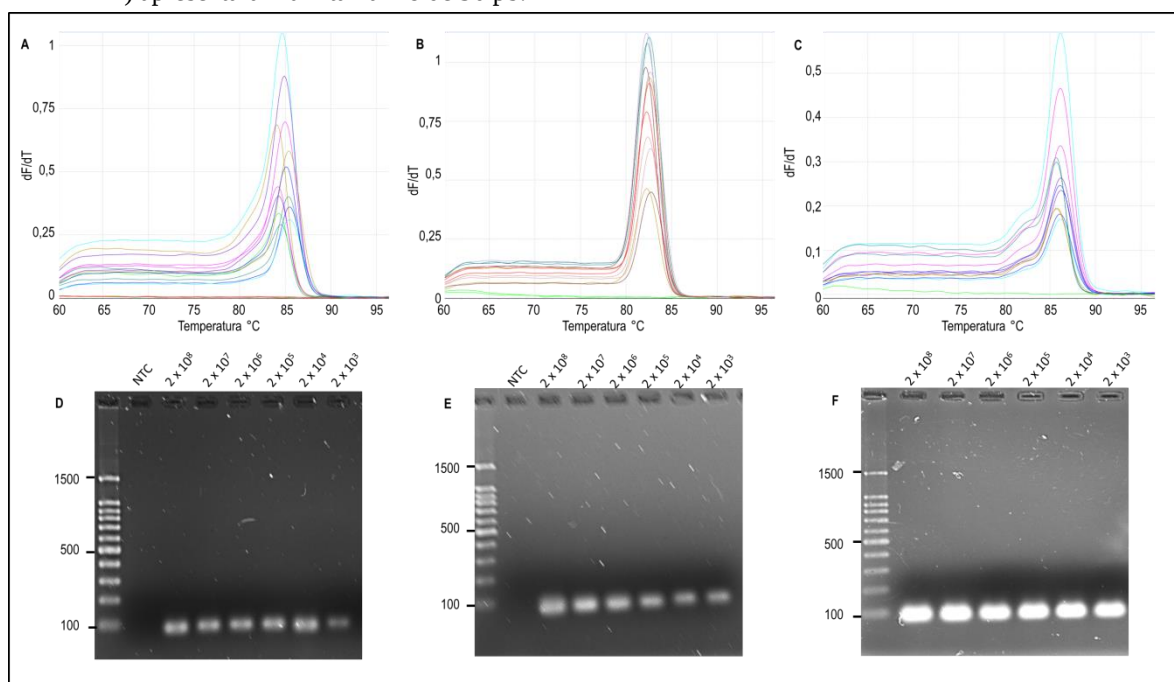


Tabela 5 - Parâmetros para cada par de oligonucleotídeos obtidos a partir da curva de calibração.

Oligonucleotídeo	E (%)	r ²	slope	TM (°C)	Lim. detecção (UFC g ⁻¹ solo)
Azo-2	100,8	0,98	-3,28	85	2x10 ⁸ – 2x10 ³
Azo-2.1	107,5	0,99	-3,01	82,5	2x10 ⁸ – 2x10 ³
Azo-2.2	95	0,99	-3,59	86	2x10 ⁸ – 2x10 ⁴

Notas: TM: temperatura de *Melting*

Figura 6 - Curvas de Melting geradas a partir de cada curva de calibração e posterior confirmação dos produtos por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Azo-2 (A e D), Azo-2.1 (B e E), e Azo-2.2 (C e F). TM de cada pico especificadas na Tabela 5. Todas as bandas observadas (D – F) apresentaram um tamanho de 90 pb.



3.1.3.2 Quantificação por qPCR de *A. brasilense* AbV5/AbV6 e do número aproximado de bactérias totais em amostras de campo

Para a quantificação de *A. brasilense* AbV5/AbV6 por qPCR foi utilizado apenas o par de oligonucleotídeos Azo-2, uma vez que foram observadas bandas inespecíficas ao utilizar os oligonucleotídeos Azo-2.1 e Azo-2.2 e analisar as amostras de campo por PCR convencional.

Os resultados da quantificação de *A. brasilense* AbV5/AbV6 utilizando-se o par de oligonucleotídeos Azo-2, para cada um dos dias amostrados, estão representados por duplicatas provenientes de três corridas independentes (cada amostra quantificada em triplicata em cada corrida). As duplicatas selecionadas seguiram o critério de apresentar uma diferença de $\pm 0,5$ ciclos no valor de Cq (o que reflete valores mais precisos de número de UFC quantificadas), uma TM de 85°C, e bandas de 90 pb observadas em gel de agarose.

A baixa concentração de DNA proveniente de *A. brasilense* AbV5/AbV6 comparada com o DNA total do solo ou da raiz do milho dificultou a quantificação das bactérias de interesse, quando se seguem parâmetros estritos como os descritos anteriormente. Nesse sentido, o principal problema identificado foi referente à variação do valor de Cq. Todas as corridas permitiram detectar *A. brasilense* AbV5/AbV6 em todas as amostras coletadas, geralmente sem formação de produtos inespecíficos, porém, poucas repetições tiveram a variação de Cq aceita. No entanto, o par de oligonucleotídeos Azo-2 foi eficiente para quantificar o *A. brasilense* AbV5/AbV6.

Os resultados da quantificação do número de UFC de *A. brasilense* AbV5/AbV6 e do número aproximado de bactérias totais podem ser observados na Figura 7, na qual, um gráfico do desenvolvimento do milho acompanha cada dia de coleta, como também é apresentada a precipitação pluvial média para cada mês durante o desenvolvimento do experimento.

Foi observado que o número aproximado de bactérias se manteve estável ao longo do experimento com valores na ordem de 10^7 UFC g⁻¹ de solo ou raiz, tanto em amostras de solo como em amostras de raiz (Figura 7).

O número de células de *A. brasilense* AbV5/AbV6 ao longo dos 75 dias do experimento (Figura 7) manteve-se próximo a 10^5 UFC g⁻¹ de solo ou raiz nas amostras de 1 até 7 DAS. Posteriormente, reduziu para 10^4 UFC g⁻¹ de raiz, e se estabilizou nessa densidade até o final do experimento, com exceção da amostra de 11 DAS na qual houve uma diminuição para 10^3 UFC g⁻¹ de raiz. A diminuição no número de UFC aos 11 DAS pode ter sido decorrente da afinidade de *Azospirillum* por colonizar a região de alongação da raiz (BURDMAN; OKON; JURKEVITCH, 2000; SANTOS et al., 2017a; SANTOS et al., 2017b). Assim, com o início do desenvolvimento do sistema radicular pós-embrionário é possível que as bactérias inoculadas estivessem no processo de migração para novas regiões em formação.

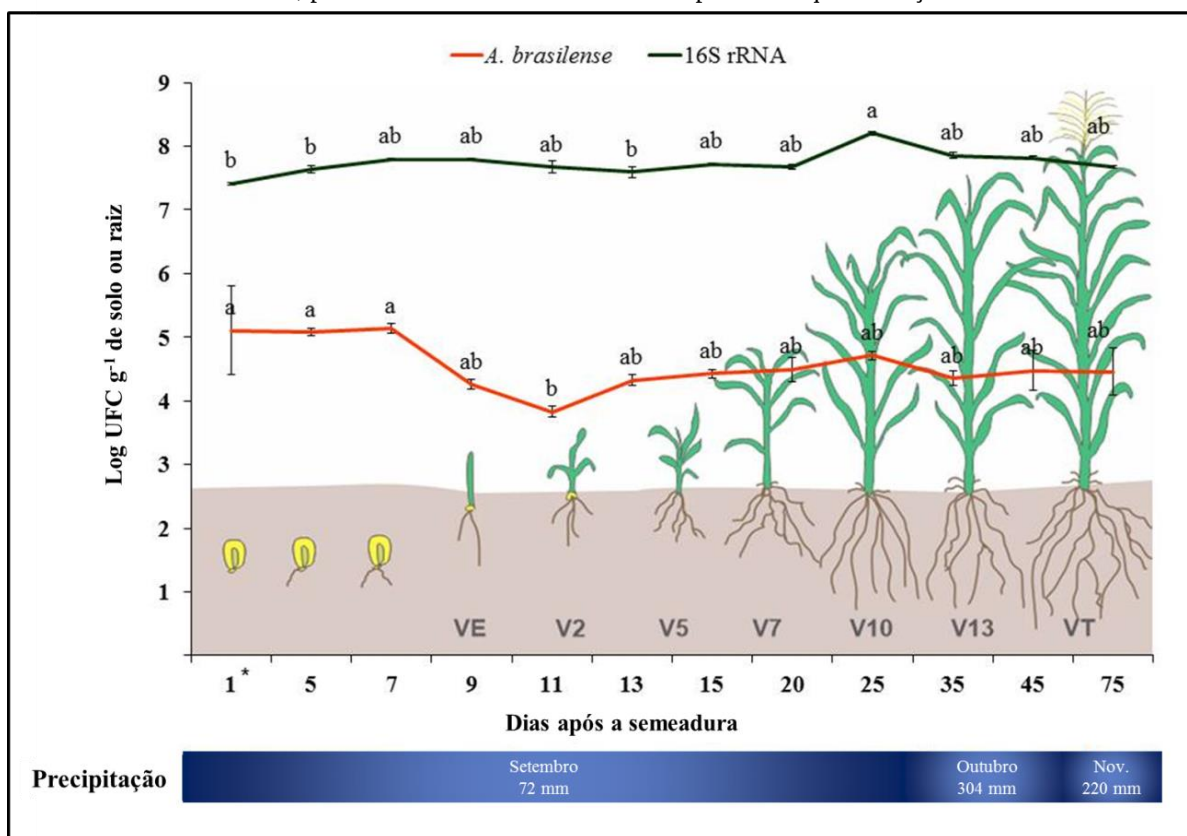
Os valores obtidos nos primeiros dias após inoculação (10^5 UFC) foram satisfatórios, pois no caso do milho, é necessária uma concentração a partir de $10^5 - 10^6$ UFC por semente para que exista uma boa colonização a partir do surgimento do sistema radicular (OKON; ITZIGSOHN, 1995).

No primeiro DAS foi possível monitorar *A. brasilense* no solo. Contudo, a partir de 5 DAS até o final do experimento, unicamente foi possível quantificá-lo nas raízes, pois nas amostras de solo as bactérias alvo se encontravam abaixo do limite de detecção (2×10^3 UFC g⁻¹ solo), gerando produtos inespecíficos (Figura 8).

O fato de a quantificação nas amostras de solo rizosférico após o primeiro dia de semeadura estar abaixo do limite de detecção é indicativo de que as células de *A. brasilense*

AbV5/AbV6 circundantes na semente migraram para a radícula logo após sua emergência. Tal resultado pode ser verificado quando comparado o número de bactérias inoculadas por semente, aproximadamente $5,20 \times 10^5$ UFC, com o número de UFC quantificadas nos dias 1-7, todos os valores na ordem de 10^5 UFC g⁻¹ de solo ou raiz. Os resultados também corroboram a hipótese de que *Azospirillum* não sobrevive por muito tempo no solo (BASHAN et al., 1995; BASHAN; DE-BASHAN, 2015).

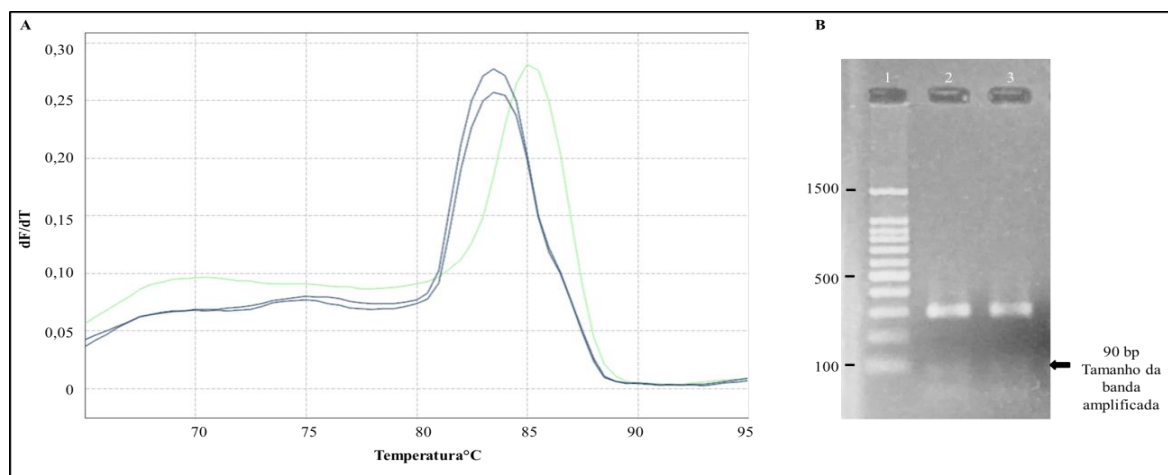
Figura 7 - Quantificação de *A. brasilense* AbV5/AbV6 inoculado em sementes de milho em condições de campo, ao longo do desenvolvimento da cultura durante 75 DAS. O extremo superior da figura representa o desenvolvimento do milho durante os dias de coleta das amostras, e no extremo inferior está indicada a precipitação média durante os meses do experimento. O (*) indica a quantificação em amostras de solo, para os dias 5 – 75 os valores correspondem à quantificação na raiz.



Estirpes filogeneticamente próximas de *A. brasilense* AbV5/AbV6 tais como Sp7, Cd, foram previamente encontradas apenas na superfície da raiz (BASHAN; LEVANONY, 1989; SCHLOTER; HARTMANN, 1998). Embora no presente trabalho não tenha sido verificado se as bactérias inoculadas se encontravam na superfície ou no interior da raiz, é possível confirmar que o *A. brasilense* AbV5/AbV6 apresenta afinidade maior por colonizar as raízes do milho do que habitar a rizosfera. Adicionalmente, foi possível corroborar que o processo de ancoragem à raiz é irreversível (PEREG; DE BASHAN; BASHAN, 2016), devido à

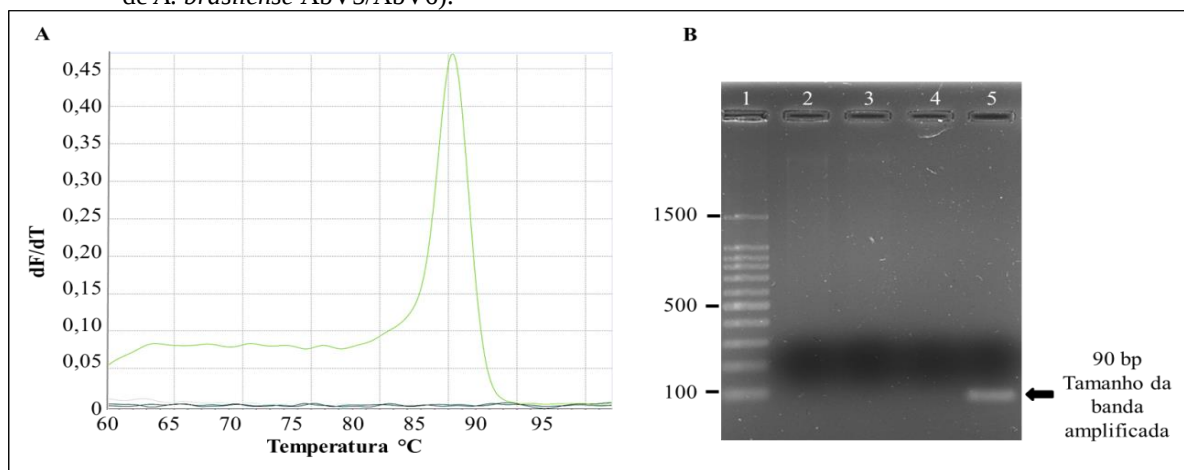
estabilidade no número de UFC quantificadas a partir do dia 13 até o final do experimento aos 75 DAS.

Figura 8 - Detecção de *A. brasilense* AbV5/AbV6 no solo rizosférico 5 dias após a semeadura. A) Curva de Melting. Linha verde = controle positivo (DNA extraído do inoculante comercial a base de *A. brasilense* AbV5/AbV6); linha azul = produtos inespecíficos formados em amostra de solo rizosférico correspondente ao 5 DAS. B) produtos de qPCR observado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Poço-1 = marcador de peso molecular 1500 bp; poços 2-3 = produtos inespecíficos formados em amostra de solo rizosférico correspondente ao 5 DAS.



Com a finalidade de confirmar se os valores de UFC de *A. brasilense* AbV5/AbV6 foram provenientes das bactérias inoculadas e não de outras estirpes naturalmente presentes no solo, foi avaliada uma amostra de solo (0-10 cm) composta por subamostras de cada parcela onde o milho foi inoculado, antes da implementação do experimento. Como pode ser verificado na Figura 9, não houve amplificação da amostra analisada. Também foi verificado que as sementes e as raízes de milho sem inoculação não amplificaram o fragmento de interesse.

Figura 9 - Detecção de *A. brasilense* AbV5/AbV6 no solo (0-10 cm) antes da implementação do experimento e em raízes de milho não inoculado. A) Curva de Melting. Linha verde = controle positivo (DNA extraído do inoculante comercial a base de *A. brasilense* AbV5/AbV6); linha azul = ausência de amplificação na amostra de solo e raiz não inoculados. B) produtos de qPCR observado por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo. Poço-1 = marcador de peso molecular 1500 bp; poço-2 = amostra de solo não inoculado; poço-3 = amostra de raiz de milho não inoculado; poço-4 = NTC; poço-5 = controle positivo (DNA extraído do inoculante comercial a base de *A. brasilense* AbV5/AbV6).



3.1.3.3 Produtividade do milho e influência da inoculação com *A. brasilense* AbV5/AbV6

As produtividades de grãos de milho (Tabela 6) foram, de modo geral, elevadas, com valores médios acima de $10.000 \text{ kg ha}^{-1}$ e não foram observadas diferenças entre as médias de produtividade das parcelas não inoculadas e inoculadas.

Como informado na Figura 7, a precipitação pluvial média foi baixa (72 mm) durante o mês de setembro em que o experimento foi implantado. Levando em consideração que a disponibilidade hídrica e a movimentação da água para as sementes são fundamentais para a germinação e emergência das plântulas (MOTERLE et al., 2006), foi possível observar que a inoculação com *A. brasilense* AbV5/AbV6 teve um efeito positivo ainda que esse valor não representa uma condição de estresse hídrico para a planta.

Entre os mecanismos de promoção do crescimento vegetal apresentados por *A. brasilense*, a capacidade de conferir maior tolerância à planta em condições de estresse hídrico é um deles (BASHAN; DE BASHAN, 2010). Tal fato foi corroborado por Díaz-Zorita et al. (2012), ao analisarem 298 resultados de experimentos de inoculação com *A. brasilense* no milho, realizados na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. Os autores concluíram que a resposta à inoculação foi mais evidente quando houve estresse hídrico no início do desenvolvimento do milho e que tal resposta foi refletida no maior rendimento da cultura.

Tabela 6 - Produtividade do milho, cultivar DKB 230, inoculado via semente com *A. brasilense* AbV5/AbV6, na área onde foi desenvolvido o experimento.

Tratamentos		Produtividade (kg.ha ⁻¹)
Inoculação (<i>A. brasilense</i> AbV5/AbV6)	Dose N (kg ha ⁻¹)	
Sem inoculação	0	10.755,13 ^a
	80	12.734,31 ^a
	240	11.977,26 ^a
Com inoculação	0	10.001,30 ^a
	80	13.865,81 ^a
	240	13.755,89 ^a

Notas: Valores seguidos pela mesma letra não apresentaram diferença significativa (Tukey, $p \leq 0.05$).

Referente à adubação nitrogenada, o milho é uma das culturas de interesse agrícola que mais demanda nitrogênio (RUIZ DIAZ et al., 2008). Estima-se que para a obtenção de rendimento entre 12.000 e 14.000 kg.ha⁻¹ em sistema plantio direto, as doses de N requeridas podem variar entre 130 e 300 kg ha⁻¹ em função dos teores de matéria orgânica do solo e da cultura antecessora (FONTOURA; BAYER, 2009).

3.1.4 Conclusões

O par de oligonucleotídeos iniciadores Azo-2 é eficiente para a quantificação de *A. brasilense* AbV5/AbV6, bactéria presente em inoculantes comerciais, em condições de campo, o qual representa um avanço para o monitoramento da inoculação.

O número de bactérias quantificadas durante os sete primeiros dias de desenvolvimento do milho (10⁵ UFC g⁻¹ de solo) foi suficiente para promover o crescimento do milho. Esses resultados indicam que em combinação com a inoculação de *A. brasilense* AbV5/AbV6, e em condições de adequado manejo do solo em sistema plantio direto com rotação de culturas, a inoculação pode promover ganhos na produtividade.

Apesar de *A. brasilense* ser classificada como uma espécie de vida livre foi corroborada uma maior afinidade pela raiz. Os resultados também sugerem que a prática de inoculação não aumenta a população de *A. brasilense* no solo, já que não foi possível detectar a espécie em amostras rizosféricas após a formação do sistema radicular definitivo. Tais resultados podem ajudar a esclarecer dúvidas sobre o impacto na estrutura da comunidade microbiana do solo devido ao uso de inoculantes na agricultura, uma preocupação cada vez mais crescente.

3.1.5 Perspectivas para Futuras Pesquisas

A metodologia de quantificação de *A. brasilense* poderia ser aplicada em outras culturas de interesse agrícola, incluindo culturas em que é utilizada a co-inoculação com outras bactérias, como no caso da soja. Desta forma, seria possível avançar no entendimento do comportamento da espécie e a sua resposta às diferentes cultivares nas quais é realizada a inoculação.

3.2 O SISTEMA DE PLANTIO DIRETO DE LONGA DURAÇÃO CONTRIBUI COM A ESTABILIDADE NA ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DA COMUNIDADE MICROBIANA DO SOLO NÃO RIZOSFÉRICO

3.2.1 Introdução

O Brasil é considerado um dos países mais diversos, albergando cerca de 20% da diversidade do planeta (MMA, 2010). Contudo, a diversidade do microbioma do solo ainda permanece pouco explorada (PYLRO et al., 2014), sendo este responsável pelo sustento da biodiversidade dos diferentes biomas brasileiros, bem como pela diversidade edáfica de áreas de interesse agrícola com alta produtividade (ANDREOTE et al., 2017).

A composição do microbioma de solos agrícolas depende da disponibilidade de carbono bem como da energia resultante dos resíduos orgânicos de plantas, incluindo os exsudatos radiculares (KRAMER et al., 2016). Um grande número espécies encontradas em Actinobacteria, Proteobacteria e Firmicutes são considerados importantes degradadores de quitina no solo (BEIER; BERTILSSON, 2013). Nesse sentido, o conhecimento da função ecológica de cada grupo microbiano é fundamental para o entendimento da variação na diversidade e abundância de espécies em resposta às práticas agrícolas.

O impacto da inoculação com BPCV na comunidade microbiana do solo tem sido abordado principalmente desde uma perspectiva composicional; contudo, avaliar o impacto do inoculante e a resiliência da comunidade a partir de uma perspectiva funcional, pode ajudar a determinar se as comunidades nativas do solo mantêm seu funcionamento apesar das mudanças induzidas pelos inoculantes introduzidos no solo (MAWARDA et al., 2020). Para isso, se fazem necessárias abordagens “ômicas” que são independentes de cultivo como a metataxonômica, metagenômica, metatranscriptômica, metabolômica e metaproteômica. Assim, o estudo interdisciplinar da comunidade microbiana do solo permite acessar o

conhecimento de microbiomas essenciais em sistemas agrícolas mais sustentáveis (TOJU et al., 2018).

3.2.1.1 Estudos do microbioma dos solos brasileiros agricultáveis

O principal objetivo de estudos do microbioma do solo de áreas dedicadas à agricultura se baseia na identificação de comunidades microbianas que possam ser utilizadas para aumentar a produtividade agrícola (ANDREOTE et al., 2017). De modo geral, o cerne da composição taxonômica dos principais filos encontrados no solo não varia muito (JANSSEN, 2006). Entretanto, variações intrínsecas na função em resposta ao ambiente se refletem na abundância de diferentes grupos bacterianos dentro de cada filo. Assim, organismos taxonomicamente diferentes podem exercer funções diferentes dependendo do ambiente que eles habitam (DINI-ANDREOTE et al., 2012).

A mudança do uso da terra é uma das atividades que mais impacta a composição e a estrutura da comunidade microbiana do solo (BERKELMANN et al., 2020) devido à alteração dos atributos do solo principalmente aqueles relacionados com a acidez do solo e com a disponibilidade de nutrientes (JESUS et al., 2009). Na transformação da floresta amazônica por exemplo, o processo de desmatamento diminui os teores matéria orgânica do solo e modifica o pH do solo, bem como a saturação por bases. Em resposta, a comunidade microbiana adapta diferentes funções metabólicas, possivelmente servindo como tampão às drásticas mudanças na fertilidade do solo (NAVARRETE et al., 2015).

A comparação entre áreas desmatadas utilizadas para pastagem e produção de soja com áreas de floresta amazônica, evidencia-se que após a intervenção houve diminuição na abundância de grupos microbianos associados à ciclagem de carbono e nitrogênio. No entanto, após 25 anos de uso agrícola dessas áreas, a composição e função do microbioma se adaptou às condições de uso, tornando-se mais estável (LAMMEL et al., 2015).

Merloti et al. (2019) observaram que solos sob transformação de floresta amazônica para produção de soja e milho apresentaram uma riqueza e diversidade semelhante com o solo de floresta; porém, diferenças significativas foram observadas na ciclagem do nitrogênio, sendo que os processos de nitrificação e desnitrificação tiveram um aumento nos solos agricultáveis.

A mudança do uso da terra é indispensável para garantir a segurança alimentar. Entretanto, o uso de práticas mais conservacionistas, como o sistema plantio direto, é primordial para manter a saúde do solo, aumentar a fertilidade em concomitância com a

estabilidade da composição da comunidade microbiana, refletindo-se em maior estoque de carbono, maior aproveitamento de fertilizantes, aumento na produtividade e redução no impacto das mudanças climáticas (SCHMIDT et al., 2018). Adicionalmente, a rotação de culturas é indispensável para manter o controle de microrganismos patogênicos presentes de forma natural no solo (SOUZA et al., 2013).

Souza et al. (2016) avaliaram a composição e função do microbioma do solo em áreas do Cerrado dedicadas durante 23 anos à produção de soja e milho, manejadas pelos sistemas convencional de preparo e plantio direto. Os autores verificaram que a diversidade funcional não necessariamente se associa com a diversidade taxonômica, já que em áreas de preparo convencional foi observada redução no perfil funcional, apesar da alta variedade de OTUs.

O conhecimento do microbioma de solos utilizados para agricultura no Brasil tem sido estudado em função das principais culturas para produção de grãos, bioenergia ou pastagens, tais como cana-de-açúcar (DINI-ANDREOTE et al., 2010; RAMPELOTTO et al., 2013; DE SOUZA et al., 2016; DURRER et al., 2017; ESTRADA-BONILLA; DURRER; CARDOSO, 2021), milho (JOHNSTON-MONJE et al., 2016; SULEIMAN et al., 2016; SILVA et al., 2017), soja (MENDES et al., 2014; BABUJIA et al., 2016; SOUZA et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2017), trigo (ROSSMANN et al., 2020), feijoeiro (MENDES et al., 2011; MENDES et al., 2018), café (CALDWELL et al., 2015) e pastagens (SULEIMAN et al., 2013).

Diante das razões expostas, o presente capítulo foi desenvolvido assumindo a hipótese de que (i) a inoculação com BPCV e a adubação com diferentes doses de nitrogênio impacta negativamente na estrutura e diversidade da comunidade microbiana do solo não rizosférico, e (ii) o comportamento da comunidade bacteriana do solo não rizosférico é influenciada pela cobertura vegetal.

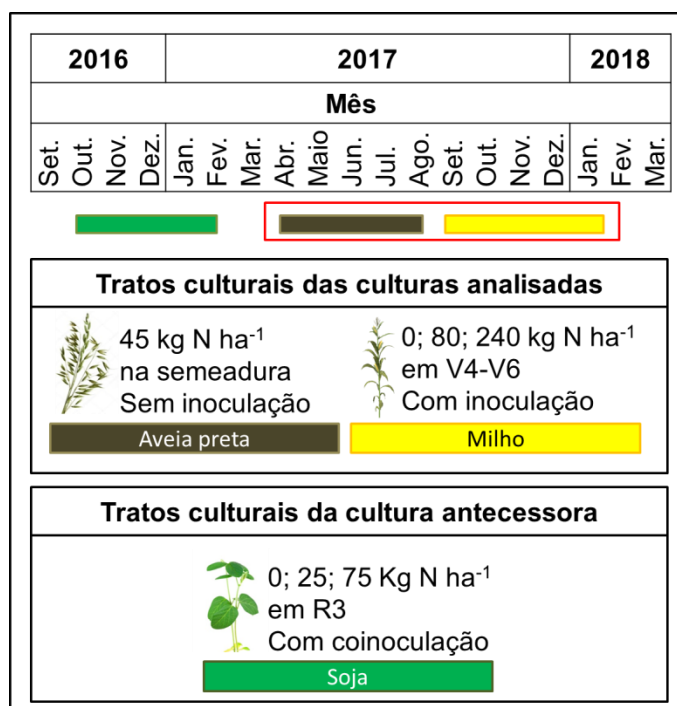
3.2.2 Material e Métodos

No presente capítulo foram avaliadas as culturas de aveia preta no inverno de 2017, como cultura de cobertura, e de milho no verão de 2017/2018, como cultura de produção de grãos (Figura 10). A cultura da aveia preta não recebeu adução nitrogenada nem inoculação com BPCV; já a cultura do milho foi inoculada com *Azospirillum brasilense* via semente e diferentes doses de nitrogênio em cobertura (0 N, baixo N = 80 kg ha⁻¹ e alto N = 240 kg ha⁻¹) foram utilizadas conforme a Tabela 1. Todas as coletas foram realizadas na fase de florescimento de cada cultura.

3.2.2.1 Coleta de amostras de solo para análise molecular

As amostras de solo não rizosférico foram coletadas na camada superficial (0 – 10 cm), na fase de florescimento das culturas. Seguindo o protocolo proposto por Cares e Huang (2008), com o auxílio de um trado calador, foram coletadas 12 subamostras para constituir uma amostra composta por subparcela. As amostras foram transportadas sob refrigeração e armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular Microbiana – LABMOM, numa temperatura de -20 °C.

Figura 10 - Amostragem para análise da composição da comunidade bacteriana do solo não rizosférico das culturas da aveia preta e do milho, as quais se encontram delimitadas no retângulo vermelho. Na cultura do milho foi realizada a inoculação com *Azospirillum brasilense* AbV5/AbV6 (2×10^8 UFC mL⁻¹), utilizando-se a dose de 100 mL para 60000 sementes. Na cultura da soja todas as parcelas receberam inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA5079/5080 (5×10^9 UFC mL⁻¹) e em parcelas que receberam *A. brasilense* AbV5/AbV6 em outras culturas, foi realizada a co-inoculação (*B. japonicum* + *A. brasilense*), utilizando-se a dose de 2,0 mL de cada inoculante por kg de sementes.



3.2.2.2 Extração do DNA total do solo

O DNA total do solo foi extraído utilizando-se o kit *PowerSoil DNA isolation* da *MOBIO Laboratories, Inc.* seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após extração

o DNA total foi quantificado por espectrofotometria em NanoVue™ Plus, e finalmente armazenado a -20 °C.

A qualidade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose como descrito por Sambrook e Russell (2001). O tampão de corrida foi TAE 1X, utilizando-se uma concentração do gel de 0,8 % (p/v). Os produtos de amplificação foram misturados com corante FSUDS (5x). A corrida foi a 50 V durante duas horas. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg mL⁻¹ durante 20 minutos, retirando o excesso de corante pela submersão do gel em água durante 10 minutos.

O DNA foi visualizado em transiluminador (*Fusion FX, Vilber Lourmat*). Foi considerado DNA de boa qualidade quando apareceram bandas intensas acima da primeira banda (10000 bp) do marcador molecular 1kb ladder.

3.2.2.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA utilizando a plataforma Illumina

O sequenciamento das amostras de solo foi realizado pelo Núcleo de Fixação Biológica na Universidade Federal do Paraná. As reações de PCR, *barcodes*, *primers* e sequenciamento na plataforma Illumina seguiram a metodologia proposta por Caporaso et al. (2012). De forma resumida, a região V4 do gene 16S rRNA foi amplificada por PCR usando os *primers* 515F e 806R. Cada reação de 10 µL continha 20 ng de DNA, 1 µM de cada par de *primers*, e 5 µl de KlenTaq DV ReadyMix (Sigma-Aldrich). Os ciclos de PCR consistiram em um ciclo de 3 minutos a 94 °C, seguido por 18 ciclos de 94 °C 45 s, 50 °C 30 s e 68 °C 1 min, finalizando com um ciclo de 10 minutos a 72 °C. Para cada amostra foram realizadas três repetições, os amplicones foram quantificados por qPCR utilizando-se o kit KAPA NGS (Roche). Finalmente, quantidades equimolares das triplicatas técnicas foram misturadas para a reação de sequenciamento, a qual foi realizada utilizando a plataforma Illumina MiSeq e o kit MiSeq 500v2 (Illumina).

3.2.2.4 Análise estatística

As análises das sequências geradas foram realizadas utilizando o sistema QIIME2 core 2020.2 (BOLYEN et al., 2019). De forma resumida, foram gerados arquivos contendo os *barcodes* e *amplicons* para realizar o processo de “demultiplexing” onde cada sequência é atribuída aos seus respectivos *barcodes* e metadados, posteriormente, foi realizado um “trimming” nas posições 70 e 240 e o controle de qualidade das sequências, incluindo a

remoção de duplicatas e quimeras, utilizando-se o algoritmo DADA2 (CALLAHAN et al., 2016). A análise taxonômica dos *amplicons* foi realizada utilizando-se o algoritmo do BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e foi representada na forma de “bar plots”. Para verificar diferenças na composição nos agrupamentos taxonômicos das duas culturas foi realizado o teste *T-student* não pareado comparando cada nível taxonômico entre as duas culturas, seguido pelo teste de Duncan quando foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$), utilizando-se o pacote Laercio v. 1.0-1 (DA SILVA, 2015) no RStudio v. 4.0.0 (R CORE TEAM, 2017).

Os índices de alfa diversidade referentes à riqueza de Unidades Taxonômicas Operacionais (Operational Taxonomic Unit – OTU ou filotipo) foram calculados utilizando a plataforma QIIME2 (BOLYEN et al., 2019) e foram validados pelo teste de Kruskal-Wallis (KRUSKAL; WALLIS, 1952). O índice de beta diversidade foi calculado pelo coeficiente de Jaccard utilizando a plataforma QIIME2 e a visualização foi realizada utilizando a ferramenta EMPeror v. 2019.7.0 (VÁZQUEZ-BAEZA et al., 2013).

3.2.3 Resultados

3.2.3.1 Características químicas do solo

De forma geral, os atributos químicos do solo não tiveram grandes diferenças entre os tratamentos analisados (Tabela 7). O pH variou entre 5,7 e 5,5 indicando adequada correção da acidez. Os teores de C e N orgânico também foram semelhantes entre os tratamentos, não obstante, o tratamento sem inoculação com alto N apresentou o teor mais alto de C orgânico ($29,39 \text{ g dm}^{-3}$) e o tratamento sem inoculação e sem N apresentou o teor mais alto de N orgânico ($4,86 \text{ g kg}^{-1}$). A análise de correlação de Kendall realizada para verificar o impacto das características químicas do solo na abundância e distribuição das OTUs não apresentou significância ($p < 0,05$).

Referente às características granulométricas, os teores de areia, silte e argila numa profundidade de 0 – 20 cm, foram de 91 g kg^{-1} , 349 g kg^{-1} e 560 g kg^{-1} , respectivamente.

Tabela 7 - Atributos químicos do solo não rizosférico superficial (0 – 10 cm), em uma área com 36 anos de plantio direto e rotação de culturas.

Atributos	Tratamentos					
	Sem inoculação			Com inoculação		
	0 N	Baixo N	Alto N	0 N	Baixo N	Alto N
pH (1:2,5 solo:0,01 M suspensão em CaCl_2)	5,70a*	5,47b	5,57ab	5,63ab	5,57ab	5,57ab
Acidez potencial pH 7,0 (H + Al), $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$	4,86ab	5,11ab	5,13a*	4,40ab	4,39b	4,51ab
C orgânico g dm^{-3}	25,81b	25,95a	29,39a*	27,64ab	26,78ab	27,18ab
N orgânico g kg^{-1}	4,86a*	3,86b	4,67ab	4,28ab	4,46ab	4,63ab
P (Mehlich-1), mg dm^{-3}	10,97ab	9,86b	13,35ab	14,53a*	12,29ab	12,72ab
Ca²⁺ $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$	7,63ab	7,13ab	6,93b	8,10a*	7,86ab	7,83ab
Mg²⁺ $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$	2,40ab	2,33ab	2,30b	2,53ab	2,66a*	2,40ab
K⁺ $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$	0,20b	0,21ab	0,30a*	0,26ab	0,27ab	0,29ab
Al³⁺ $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
SO₄⁻² $\text{cmol}_c \text{dm}^{-3}$	3,28ab	3,47a*	3,02ab	3,18ab	2,99b	3,37ab

Notas: O asterisco (*) em negrito indica diferença significativa pelo teste de Duncan ($P < 0,05$). Valores representam a média de três repetições.

3.2.3.2 Estrutura geral da comunidade microbiana

A estrutura da comunidade bacteriana na aveia preta e no milho teve um comportamento semelhante referente ao número total de espécies, evidenciando que os diferentes tratamentos testados não afetaram a riqueza. Apesar disso, o comportamento intrínseco da comunidade bacteriana foi heterogêneo nas duas culturas e respondeu a fatores diferentes.

Os índices de alfa diversidade para a cultura da aveia preta não variaram significativamente entre os tratamentos com e sem inoculação de *A. brasilense* (p -value 0.7962; Figura 11A), nem nas diferentes doses de nitrogênio (p -value 0.5257; Figura 11B).

Devido à aveia preta ser uma cultura de cobertura de inverno, a homogeneidade da riqueza de OTUs era esperada, pois as parcelas não foram tratadas com diferentes doses de N nem as sementes inoculadas com *A. brasilense*.

O índice de beta diversidade representou 20% da variância das OTU's nos dois primeiros eixos (Figura 12). É possível observar que embora as sementes de aveia preta não tenham sido inoculadas com *A. brasilense*, houve um padrão diferente na composição microbiana em parcelas com e sem inoculação (Figura 12A), sendo separados em dois grupos

não clusterizados. Esse resultado pode ser explicado pelo histórico da área, e o agrupamento pode ser devido ao efeito residual da cultura antecessora à aveia preta, a soja, a qual foi co-inoculada utilizando *B. japonicum* e *A. brasilense* (apenas em parcelas identificadas como “com inoculação”). Contudo, a composição da comunidade microbiana não teve um comportamento em resposta ao efeito residual da aplicação de N na soja (0N, baixo N = 25 kg N ha⁻¹, e alto N = 75 kg de N ha⁻¹); assim, os tratamentos com N não evidenciaram um padrão de agrupamento (Figura 12B). Esses resultados permitem inferir que a inoculação com bactérias promotoras do crescimento vegetal como *B. japonicum* e *A. brasilense* podem influenciar a composição microbiana mais do que a adubação nitrogenada.

Seguindo o mesmo comportamento observado na aveia preta, no milho também não houve diferença significativa nos índices de alfa diversidade para os tratamentos com inoculação de *A. brasilense* (*p-value* 0.4529; Figura 13A), nem para as três doses de nitrogênio aplicadas em cobertura (*p-value* 0.3086; Figura 13B). A homogeneidade da riqueza de OTUs refuta a hipótese de que a inoculação via semente com *A. brasilense* e a adubação de cobertura com diferentes doses N-ureia alterariam a estrutura da comunidade microbiana do solo não rizosférico, evidenciando que o número total de espécies não variou devido aos tratamentos estudados.

O índice de beta diversidade explicou 15% da variância das OTUs nos dois primeiros eixos (Figura 14). Não foi observado nenhum padrão de agrupamento nem nas parcelas inoculadas com *A. brasilense* (Figura 14A), nem nas parcelas com adição de diferentes doses de N (Figura 14B), indicando que não existe variação na composição de espécies nos diferentes tratamentos, corroborando novamente a refutação da hipótese do trabalho.

Figura 11 - Variação na riqueza de OTUs determinado pelo índice de Shannon na cultura da aveia preta. A) Parcelas inoculadas com *A. brasilense*. B) Parcelas com diferentes doses de nitrogênio em cobertura residual. A aveia preta foi cultivada como planta de cobertura de inverno sem receber inoculação e adubação nitrogenada.

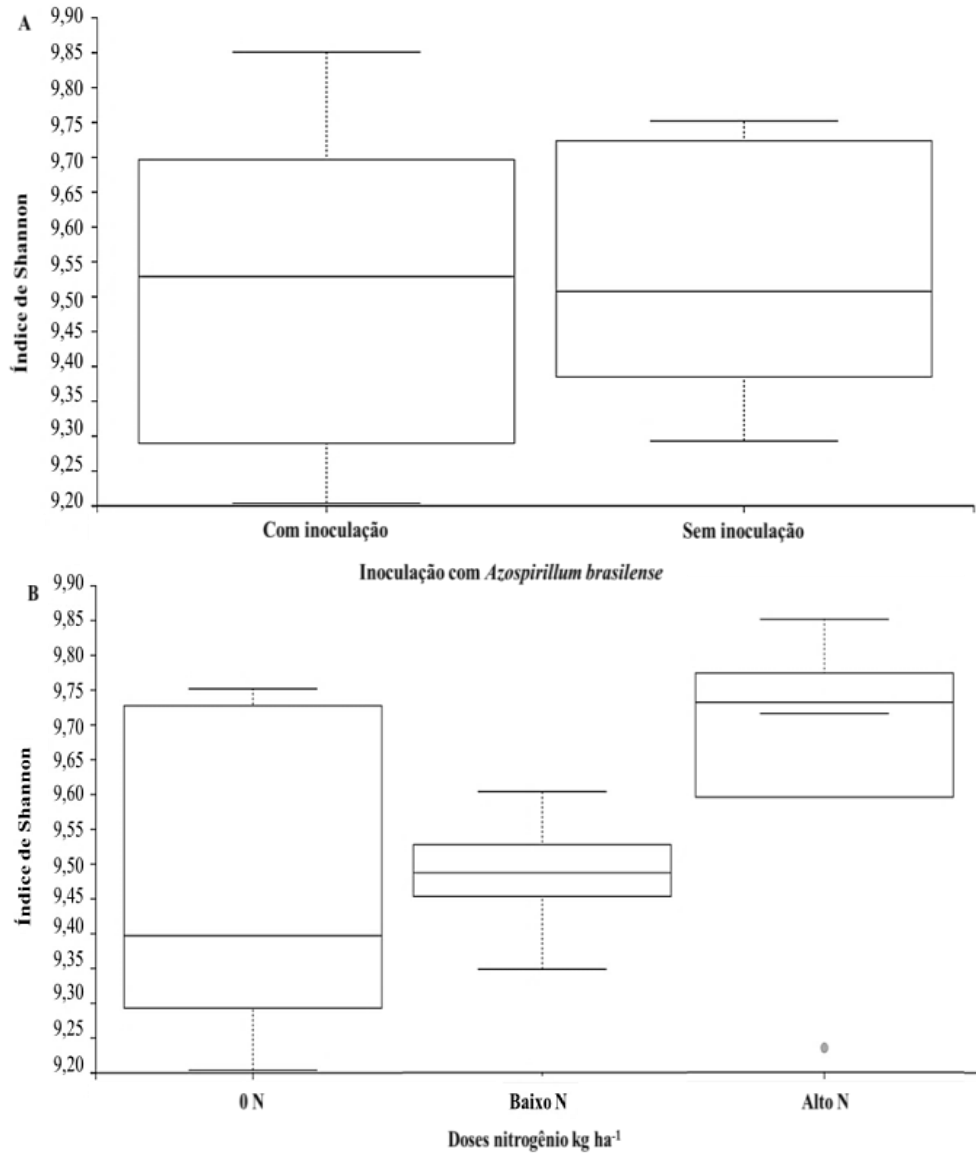


Figura 12 - Distribuição dos tratamentos na cultura da aveia preta em função da similaridade das OTUs calculada pelo coeficiente de Jaccard. A) Parcelas com inoculação de *A. brasilense*. B) Parcelas com diferentes doses de nitrogênio em cobertura residual. A aveia preta foi cultivada como planta de cobertura de inverno sem receber inoculação e adubação nitrogenada.

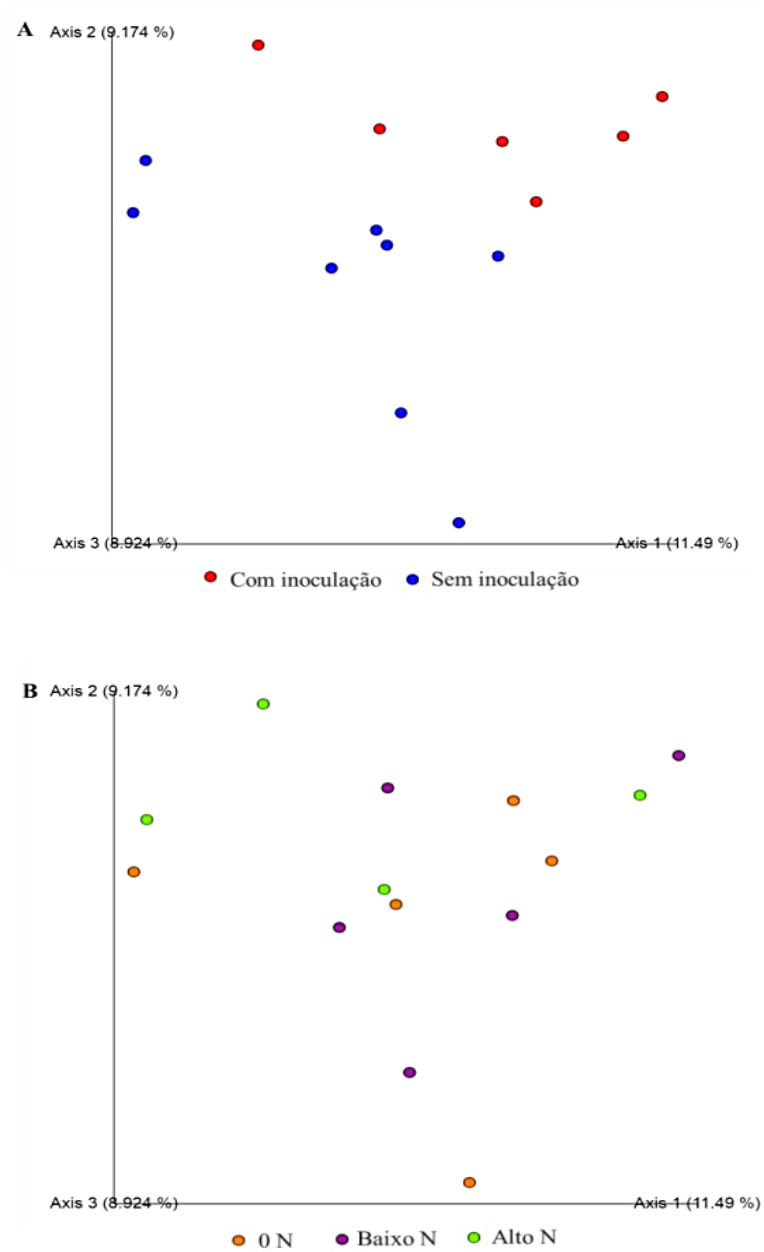


Figura 13 - Variação na riqueza de OTUs determinado pelo índice de Shannon na cultura do milho. A) Parcelas inoculadas com *A. brasilense*. B) Parcelas adubadas com diferentes doses de nitrogênio em cobertura (0N, baixo N = 80 kg N ha⁻¹ e alto N = 240 kg de N ha⁻¹).

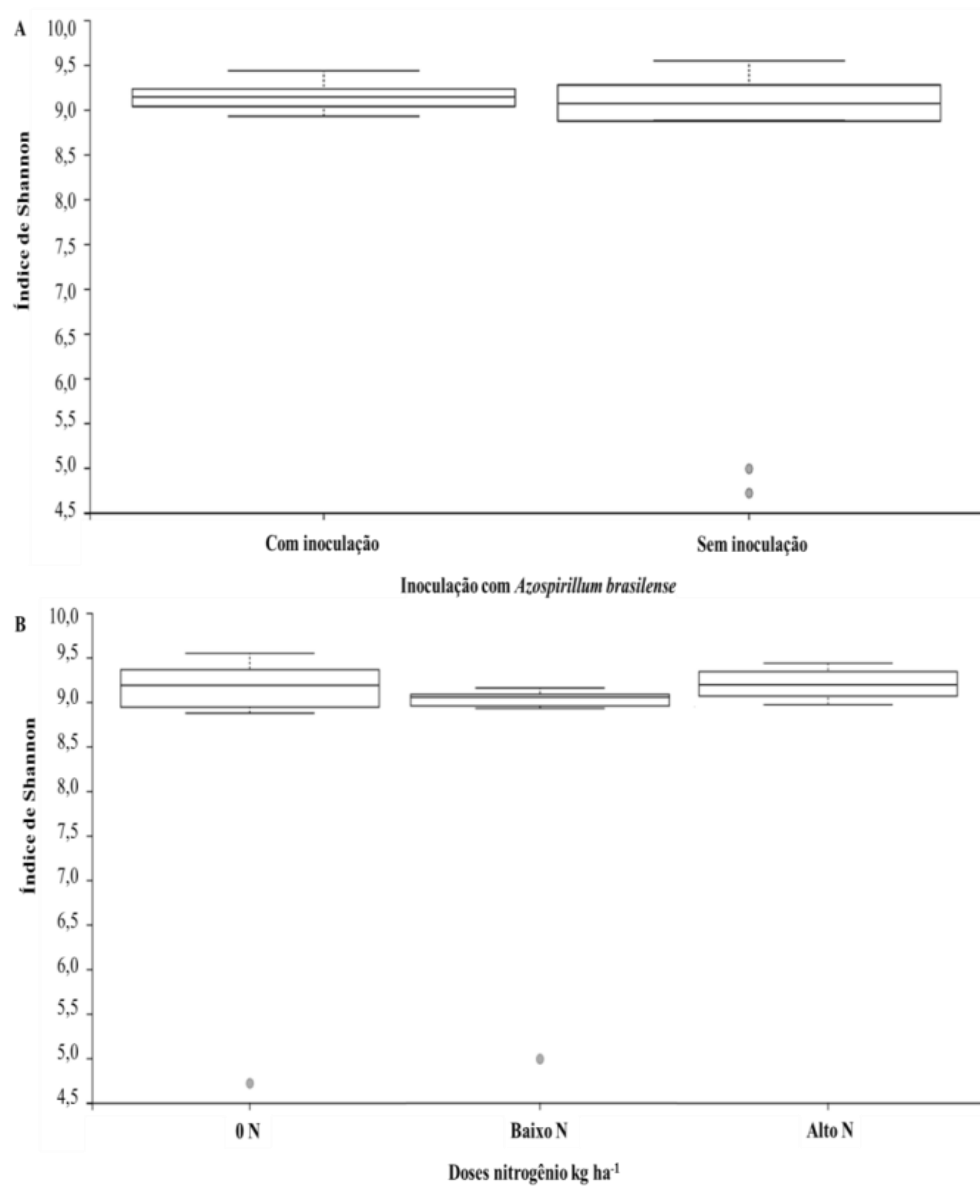
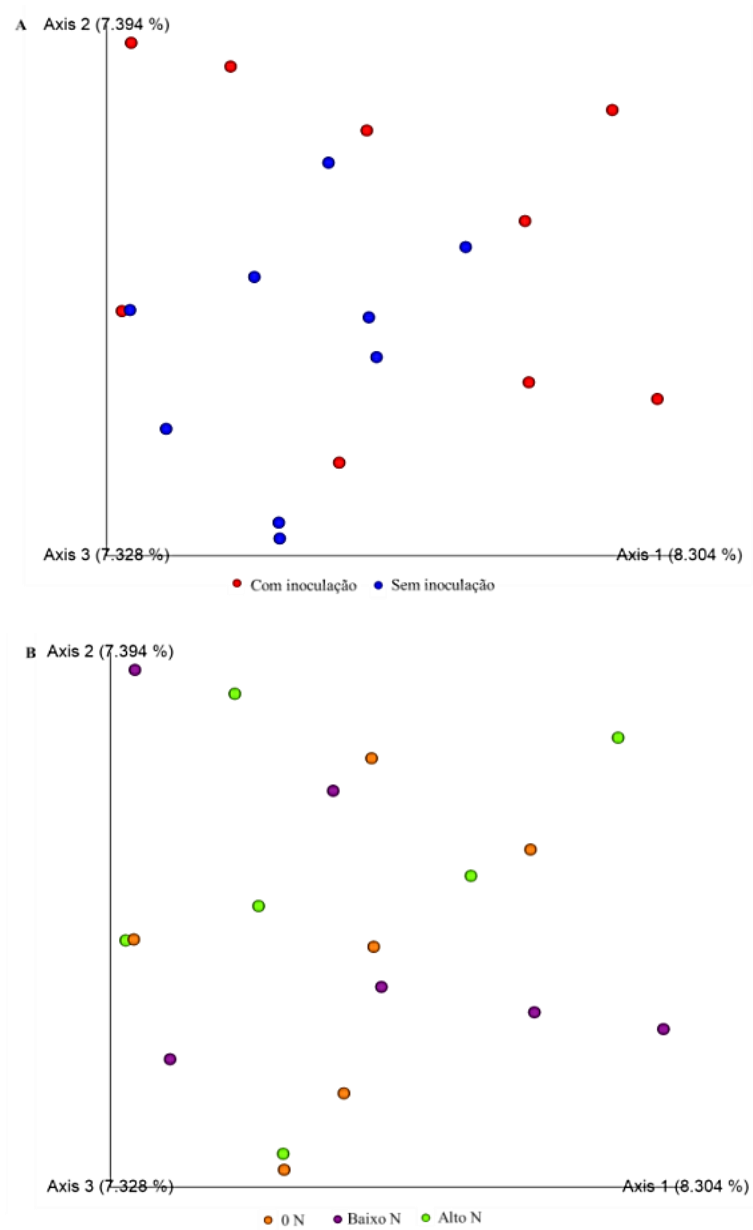


Figura 14 - Distribuição dos tratamentos na cultura do milho em função da similaridade das OTUs calculada pelo coeficiente de Jaccard. A) Parcelas com inoculação de *A. brasilense*. B) Parcelas com diferentes doses de nitrogênio em cobertura (0N; baixo N = 80 kg de N ha⁻¹ e alto N = 240 kg de N ha⁻¹).

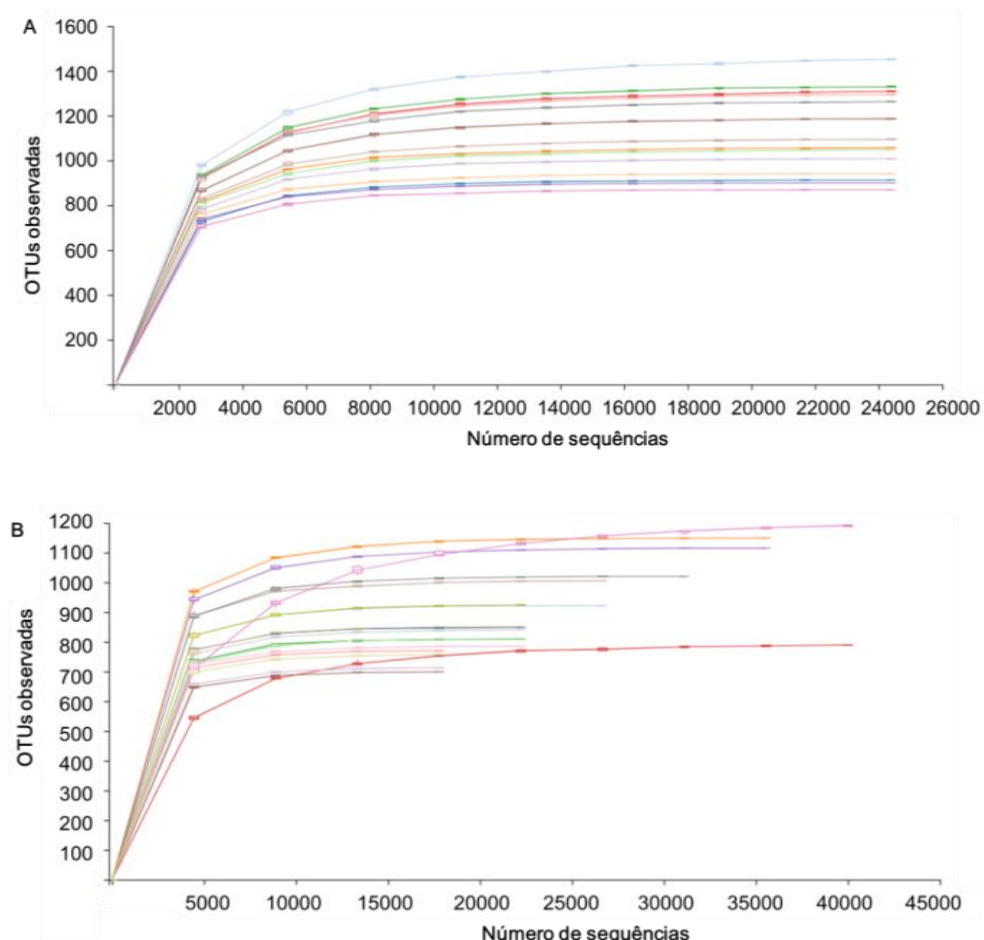


3.2.3.3 Biodiversidade e composição da comunidade microbiana

A diversidade observada na aveia preta e no milho foi muito semelhante com base nas curvas de rarefação, as quais evidenciaram que o esforço amostral foi suficiente para revelar o número total de OTUs na aveia preta (Figura 15A) e no milho (Figura 15B). Adicionalmente, o número total de sequências recuperadas para cada repetição de um tratamento se manteve na ordem de 10^4 em todos os tratamentos analisados.

Como evidenciado pelas análises de alfa diversidade, não existe diferença estatística na estrutura da comunidade microbiana em resposta à inoculação com *A. brasilense* e às diferentes doses de N para as duas culturas analisadas. Esse resultado foi corroborado pela semelhança na abundância relativa dos principais filos e classes encontrados na aveia preta (Figuras 16 – 17) e no milho (Figuras 18 – 19).

Figura 15 - Curvas de rarefação do número de OTUs observadas em função do número de sequências do gene 16S rRNA de amostras de solo não rizosférico de aveia preta (A) e milho (B).



Os filos do domínio Bacteria mais abundantes na cultura da aveia preta (Figura 16) foram Proteobacteria (35,92%), Acidobacteria (18,21%), Actinobacteria (9,81%), Gemmatimonadetes (5,87%), Chloroflexi (5,55%), Planctomycetes (5,41%), Bacteroidetes (5,05%), Verrucomicrobia (4,59%), WS3 (2,44%), Nitrospirae (2,34%), AD3 (1,04%) e Firmicutes (0,31%). Referente ao domínio Archaea, os filos mais abundantes (Figura 16) foram Crenarchaeota (1,34%) e Euryarchaeota (0,33%). Adicionalmente, na figura 17, pode-se observar a abundância relativa das principais classes presentes nos primeiros oito filos mais abundantes (> 0,5%) encontrados na cultura da aveia preta.

Para a cultura do milho, os filos de Bacteria mais abundantes (Figura 18) foram Proteobacteria (36,34%), Acidobacteria (19,65%), Actinobacteria (7,76%), Gemmatimonadetes (6,67%), Chloroflexi (5,21%), Bacteroidetes (4,99%), Planctomycetes (4,63%), Verrucomicrobia (4,26%), Nitrospirae (2,96%), WS3 (2,34%), AD3 (1,21%) e Firmicutes (0,59%). Os filos de Archaea mais abundantes (Figura 18) foram Crenarchaeota (1,49%) e Euryarchaeota (0,20%). Na figura 19 pode ser observada a abundância relativa da composição das classes encontradas nos primeiros oito filos mais abundantes (> 0,5 %) na cultura do milho.

Uma análise pontual pelo teste de *t-student* de cada filo para ambas as culturas (Tabela 8) evidenciou que existe diferença significativa entre os valores médios da composição de Acidobacteria (*p-value* 0,0273), Actinobacteria (*p-value* 0,0111), Gemmatimonadetes (*p-value* 0,0026), Planctomycetes (*p-value* 0,0002), Nitrospirae (*p-value* 0,0004), Firmicutes (0,0201) e Euryarchaeota (0,0003). Da mesma forma, foram encontradas diferenças estatísticas no nível de classe (Tabela 8), as quais corroboraram as diferenças encontradas no nível de filo.

Figura 16 - Abundância e composição dos diferentes filos de Bacteria e Archaea encontrados no solo não rizosférico da cultura da aveia preta. Valores representam três repetições biológicas de cada tratamento.

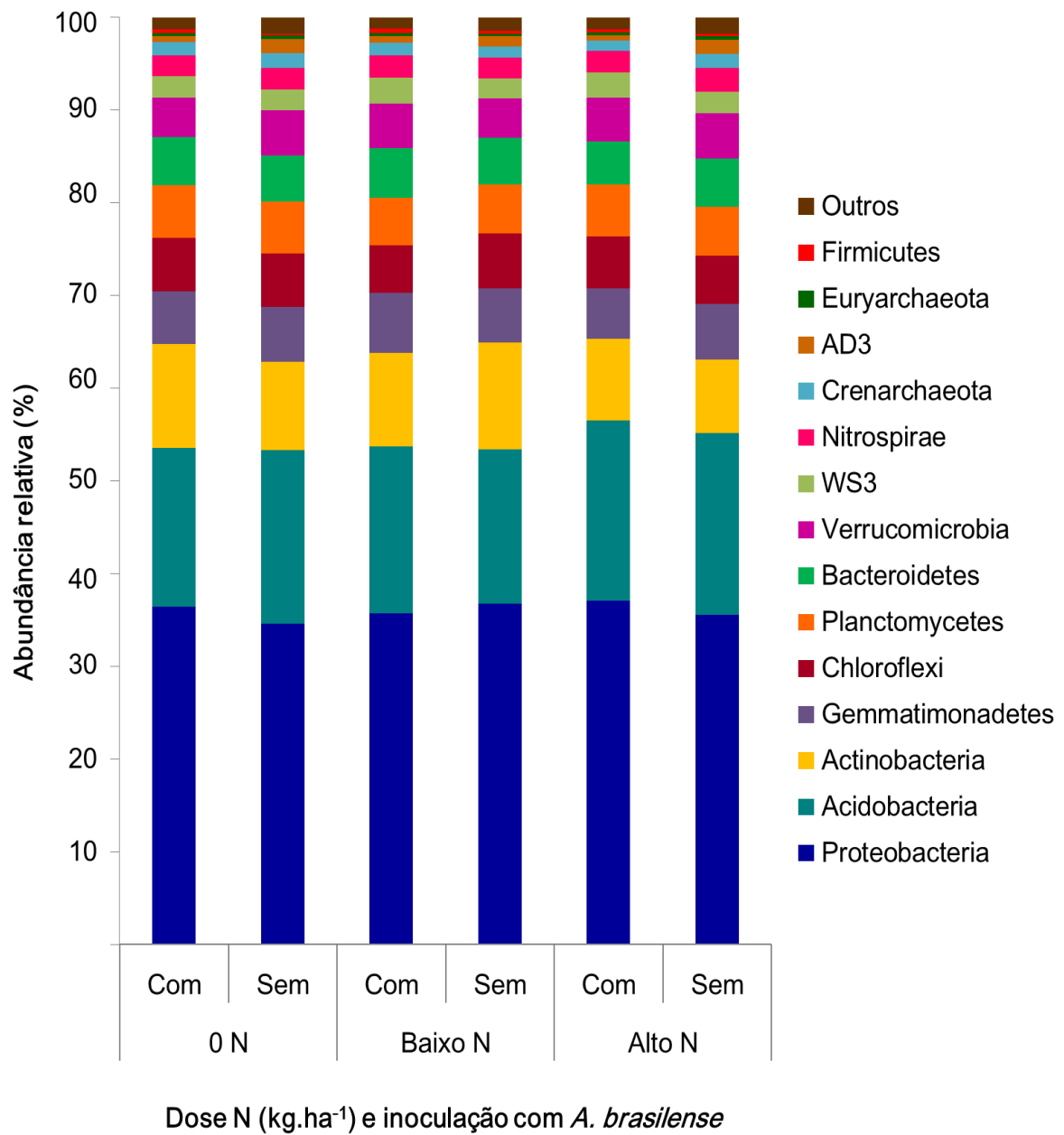
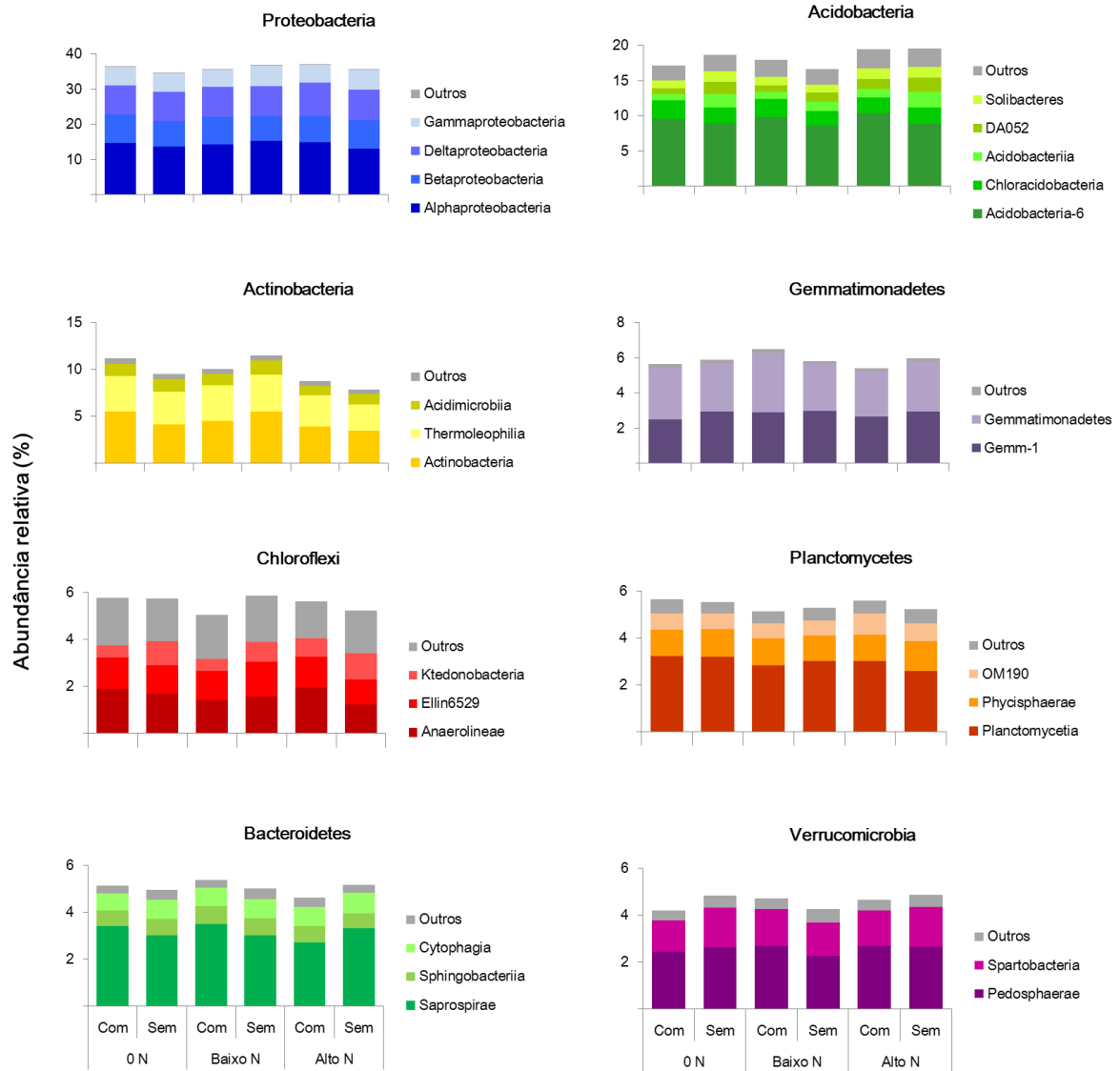


Figura 17 - Abundância relativa no nível de classe encontrados nos oito filos bacterianos mais abundantes no solo não rizosférico da cultura da aveia preta. Valores representam três repetições biológicas de cada tratamento.



Dose N (kg.ha⁻¹) e inoculação com *A. brasilense*

Figura 18 - Abundância e composição dos diferentes filos de Bacteria e Archaea encontrados no solo não rizosférico da cultura milho. Valores representam três repetições biológicas de cada tratamento: com inoculação via semente de *A. brasilense* e três doses de N-ureia aplicadas em cobertura no estágio fisiológico V4 (0N, baixo N = 80 kg de N ha⁻¹ e alto N = 240 kg de N ha⁻¹).

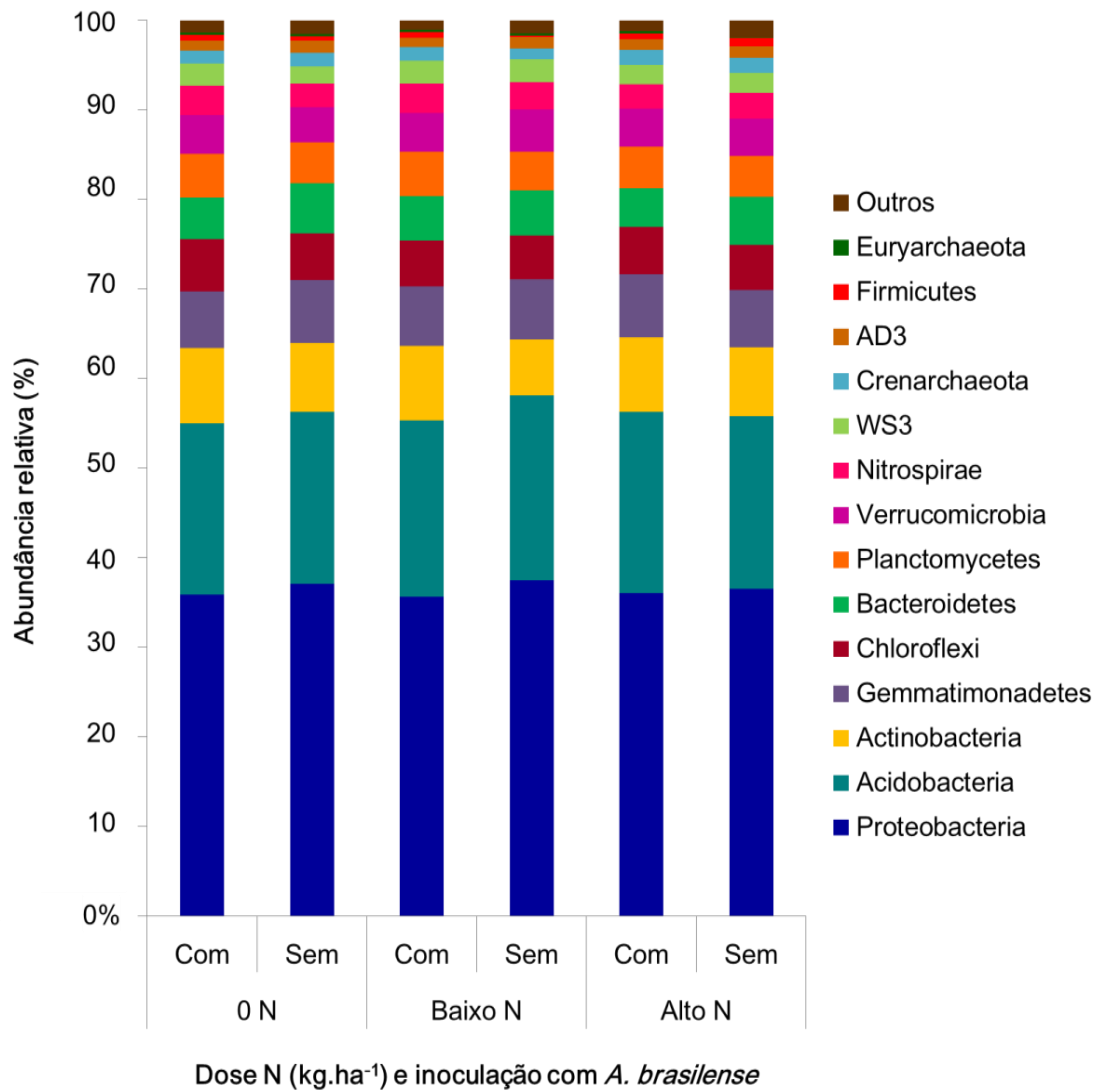


Figura 19 - Abundância relativa no nível de classe encontrados nos oito filos bacterianos mais abundantes no solo não rizosférico da cultura do milho. Valores representam três repetições biológicas de cada tratamento: com inoculação via semente de *A. brasilense* e três doses de N-ureia aplicadas em cobertura no estágio fisiológico V4 (0N, baixo N = 80 kg de N ha⁻¹ e alto N = 240 kg de N ha⁻¹).

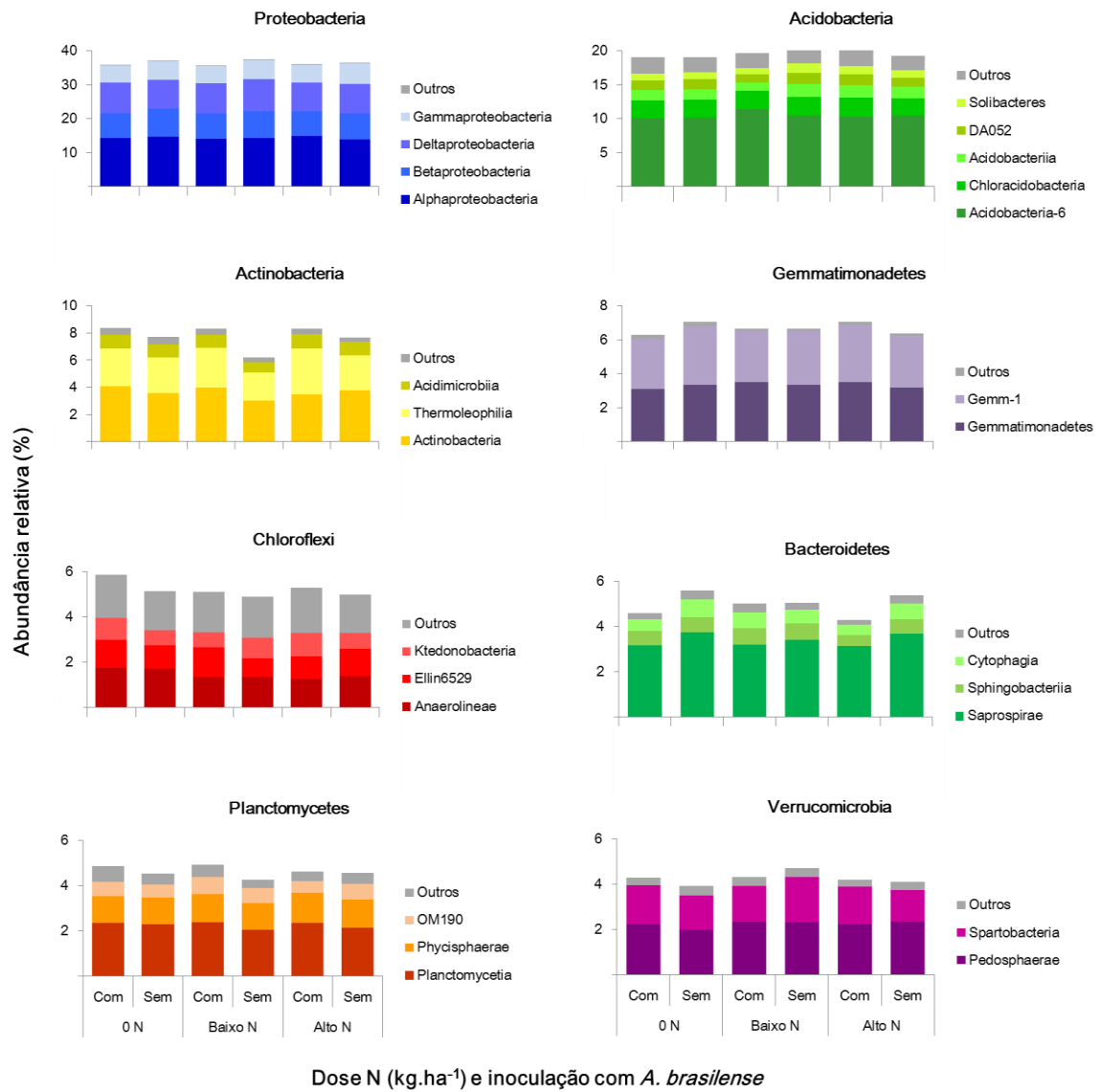


Tabela 8 - Diferença na média da abundância relativa dos principais filos e classes bacterianos encontrados no solo não rizosférico da aveia preta e do milho.

Filo	p-value	Classe	p-value
Proteobacteria	0,4084		
Acidobacteria	0,0273*	Acidobacteria-6	0,0092*
		Chloracidobacteria	0,0060*
Actinobacteria	0,0111*	Thermoleophilia	0,0087*
		Acidimicrobiia	0,0094*
Gemmatimonadetes	0,0026*	Gemm-1	0,0116*
		Gemmatimonadetes	0,0094*
Chloroflexi	0,1147		
Bacteroidetes	0,7774	Cytophagia	0,0154*
Planctomycetes	0,0002*	Planctomycetia	0,0002*
Verrucomicrobia	0,0627	Pedosphaerae	0,0071*
Nitrospirae	0,0004*		
WS3	0,5357		
Crenarchaeota	0,1808		
AD3	0,3889		
Firmicutes	0,0201*		
Euryarchaeota	0,0003*		

Notas: O asterisco (*) em negrito para cada tratamento indica diferença significativa entre a composição microbiana das duas culturas pelo teste de T-student no nível de confiança de $p < 0,05$.

3.2.3.4 Abundância de bactérias diazotróficas

Considerando organismos diazotróficos, isto é, aqueles que possuem a capacidade de fixar nitrogênio, quer sejam eles de vida livre, rizosféricos associativos ou noduladores, foi realizada uma busca nas sequências no nível de gênero (Tabela 9), baseando-se em gêneros previamente registrados na literatura e que ocorrem em solos agricultáveis.

Os gêneros mais abundantes foram *Rhodoplanes* (3,0%), *Bradyrhizobium* (1,30%) e *Bacillus* (1,0%). Outros gêneros comumente conhecidos como diazotróficos, tais como, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Rhodospirillum*, e registrados em solos agricultáveis, não foram encontrados no presente estudo.

Tabela 9 - Gêneros bacterianos diazotróficos mais abundantes no solo não rizosférico de aveia preta e milho.

Filo	Classe	Gênero	Abundância relativa (%)
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	<i>Rhodoplanes</i>	3,00
		<i>Bradyrhizobium</i>	1,30
		<i>Hyphomicrobium</i>	0,60
		<i>Balneimonas</i>	0,40
		<i>Mesorhizobium</i>	0,30
		<i>Sphingomonas</i>	0,15
		<i>Rhizobium</i>	< 0,30
		<i>Gluconacetobacter</i>	< 0,10
		<i>Phyllobacterium</i>	<0,001
		<i>Methylobacterium</i>	<0,001
	Betaproteobacteria	<i>Burkholderia</i>	0,20
		<i>Cupriavidus</i>	0,10
		<i>Herbaspirillum</i>	< 0,10
Firmicutes	Deltaproteobacteria	<i>Desulfobivrio</i>	<0,001
	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	0,30
	Bacilli	<i>Bacillus</i>	1,00
		<i>Paenibacillus</i>	0,05
		<i>Clostridium</i>	<0,001
	Clostridia		
Actinobacteria	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>	0,40
		<i>Streptomyces</i>	0,20
Bacteroidetes	Flavobacteriia	<i>Flavobacterium</i>	0,20

3.2.4 Discussão

3.2.4.1 A adubação nitrogenada não afetou a estrutura geral de comunidade microbiana

A adubação com fertilizantes nitrogenados inorgânicos tem sido associada com a diminuição da abundância de comunidades microbianas (GEISSELER; SCOW, 2014; SUN et al., 2015; WANG et al., 2017; WANG et al., 2019). Resultados opostos foram observados quando analisado o solo não rizosférico da aveia preta sem adição de N (Figura 11B) e do milho com três doses de N (Figura 13B), evidenciando que não houve um impacto negativo em resposta à adubação nitrogenada e que as duas culturas se comportaram de forma semelhante.

O efeito da fertilização na estrutura da comunidade microbiana do solo e da sua abundância, frequentemente é associado com mudanças nas características químicas e físicas do solo, principalmente no pH como resultado da fertilização a longo prazo (ZENG et al., 2016; WANG et al., 2017). A área onde foi realizado o experimento possui um histórico de 36

anos de plantio direto com rotação de culturas e durante os últimos oito anos tem sido realizada adubação nitrogenada com doses 0 N, Baixo N e Alto N, conforme os requerimentos de cada cultura. É possível constatar que as diferenças encontradas no pH do solo na área de estudo foram de pequena magnitude (Tabela 7) e não influenciaram a riqueza de espécies nas duas culturas.

3.2.4.2 Efeito da inoculação nos índices de beta diversidade

A inoculação via semente de *A. brasilense* no milho não alterou nem a estrutura nem a composição microbiana do solo não rizosférico (Figura 13A e 14A). *A. brasilense* é uma bactéria de vida livre com a capacidade de impactar positivamente o rendimento de diversas culturas de interesse agrícola (BASHAN; HOLGUIN; DE-BASHAN, 2004). Inoculantes formulados com *Azospirillum* spp., além de causar um efeito positivo na promoção do crescimento das plantas, são pouco invasivos pois não persistem no ambiente e não afetam o processo de resiliência do solo (AMBROSINI; DE SOUZA; PASSAGLIA, 2015), indicando que um inoculante altamente eficiente não é necessariamente invasivo (DA COSTA et al., 2018). No entanto, é importante destacar que o rápido desaparecimento de um inoculante no solo não indica ausência do impacto em longo prazo na comunidade nativa do solo (MAWARDA et al., 2020). Por essa razão, se fazem necessários mais estudos moleculares tanto no solo rizosférico como não rizosférico de diferentes culturas, em diferentes estágios de desenvolvimento e em experimentos de longa duração com rotação de culturas.

O efeito da inoculação com *Azospirillum* na composição de diferentes grupos funcionais é mais evidente no solo rizosférico como observado por Florio et al. (2017), os quais relataram que a abundância de microrganismos heterotróficos desnitrificantes aumentou com a inoculação de *Azospirillum lipoferum* CRT1.

A ausência de efeito no solo não rizosférico do milho se deve principalmente à afinidade de *Azospirillum* pelos exsudatos das plantas (WALKER et al., 2011). Além disso, a sobrevivência de *A. brasilense* no solo não rizosférico é baixa (BASHAN et al., 1995) e, após a germinação das sementes inoculadas e a emergência da sua radícula, *A. brasilense* se adere à superfície da raiz permanecendo em quantidades indetectáveis no solo (URREA-VALENCIA et al., 2020). Finalmente, a busca por gênero nas OTUs do milho confirmou a ausência de *Azospirillum* nas amostras de solo analisadas (Tabela 9).

A resposta da comunidade microbiana ocorreu unicamente em função da variação das espécies baseada no índice de beta diversidade e, como consequência, do efeito residual da

inoculação da soja na cultura sucessora, a aveia preta (Figura 12A). O impacto causado pela inoculação de rizóbios tem demonstrado afetar mais a comunidade microbiana do que a inoculação com bactérias de vida livre (AMBROSINI; DE SOUZA; PASSAGLIA, 2015).

O efeito da inoculação com rizóbios na estrutura da comunidade microbiana do solo não rizosférico tem sido evidenciado em algumas culturas de interesse agrícola como o feijão (ZHANG et al., 2010; TRABELSI et al., 2011; MENDES et al., 2018) e, no mesmo sentido, o efeito residual em decorrência da inoculação com rizóbios tem sido avaliado em gramíneas como o milho (ENRICO et al., 2020).

Embora o efeito da inoculação em sistemas agrícolas ainda possua muitas lacunas e seja variável dependendo da localização geográfica, da planta inoculada e do inóculo, é possível que a resposta da comunidade nativa à inoculação esteja relacionada com a periodicidade em que esta é realizada (AMBROSINI; DE SOUZA; PASSAGLIA, 2015). A influência do efeito residual da inoculação com *Bradyrhizobium* na soja sobre a comunidade microbiana do solo não rizosférico da cultura sucessora ainda não foi reportada na literatura existente e representa um dado importante para a conservação do solo, tendo em vista que corrobora a importância da rotação e o uso de culturas de cobertura de inverno como a aveia preta. Adicionalmente, o entendimento do comportamento da comunidade microbiana do solo não rizosférico é fundamental, já que a partir dele é realizado o recrutamento de bactérias para a rizosfera ativa (BAKKER et al., 2015; VIEIRA et al., 2020) e, por sua vez, o genótipo da planta representa uma força motriz para a seleção de grupos específicos da comunidade microbiana do solo não rizosférico (BAKKER et al., 2013).

3.2.4.3 Efeito do sistema plantio direto na conservação da estrutura da comunidade microbiana

Diferenças na composição microbiana do solo estão associadas principalmente com a mudança do uso da terra (MENDES et al., 2014) e com o tipo de solo (BAKKER et al., 2015). Esses fatores impactam na riqueza de espécies em solo rizosférico e não rizosférico, principalmente em decorrência de mudanças no estoque de nutrientes, os quais respondem ao manejo do solo em sistemas agrícolas subtropicais e tendem a ser mais elevados e estáveis em sistema plantio direto (SÁ et al., 2013).

O longo histórico de plantio direto na área de estudo pode ter sido uma razão para a pouca variação na comunidade microbiana do solo entre as duas culturas, como também a baixa variação dos parâmetros químicos do solo em resposta aos diferentes tratamentos com

N e *A. brasilense*, principalmente nos teores de C e N orgânico (Tabela 7), os quais se mostram estáveis e homogêneos em sistema plantio direto de longa duração com diversificada rotação de culturas (GONÇALVES et al., 2017).

Registros na literatura apontam que práticas de manejo mais conservacionistas refletem em um aumento geral da composição e diversidade microbiana do solo (SCHMIDT et al., 2018), quer seja pela manutenção da estrutura do solo, a qual aumenta a umidade, melhora a aeração e o estoque de nutrientes (WANG et al., 2016); pela acumulação de carbono orgânico na camada superficial, a qual resulta numa maior estabilidade dos agregados do solo (KAURIN et al., 2015); pela conservação de microambientes únicos, o que permite maior diversidade de bactérias habitando-os (SENGUPTA; DICK, 2015); ou pelo depósito da palhada após cada cultura, o qual induz a seleção de bactérias no nível de gênero, com a capacidade para degradar substratos específicos (CHÁVEZ-ROMERO et al., 2016).

3.2.4.4 Diferenças na composição geral da comunidade microbiana

Dentre os filos mais abundantes em bibliotecas genômicas de solos construídas com base no gene 16S rRNA encontram-se Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Verrucomicrobia, Bacteroidetes, Chloroflexi, Planctomycetes, Gemmatimonadetes e Firmicutes (JANSSEN, 2006). A abundância relativa dos principais filos muda conforme as condições de cada estudo e isso se deve principalmente ao conceito de organismos copiotróficos (afinidade por substrato mais lábil) e oligotróficos (consumidores de substratos mais recalcitrantes) (FIERER; BRADFORD; JACKSON, 2007), os quais aproveitam de forma diferente a disponibilidade de carbono no solo. No presente trabalho por exemplo, os filos mais abundantes, mantendo a mesma ordem nas duas culturas, foram Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, Gemmatimonadetes, e Chloroflexi, com uma abundância relativa superior a 5,5%. Contrariamente, filos com percentagens mais baixas não compartilharam a mesma ordem nas duas culturas (Figuras 16 e 18).

Resultados semelhantes foram encontrados em áreas sob sistema plantio direto de longa duração. Schmidt et al. (2018) verificaram que Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi e Planctomycetes foram os filos dominantes em um sistema de rotação com culturas de cobertura (ervilha, fava, rabanete e facélia) e que apenas Firmicutes diminuiu com a rotação de culturas. Wang et al. (2016) compararam três sistemas de cultivo e, novamente, Proteobacteria, Actinobacteria e Acidobacteria foram mais abundantes. Contudo, a maior abundância relativa de Firmicutes apenas foi observada nos tratamentos com escarificação e

plantio direto, enquanto Actinobacteria, Acidobacteria, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria e Chloroflexi foram mais ricos no sistema convencional de preparo com arado. Sengupta e Dick (2015) compararam a composição microbiana do solo não rizosférico em sistema de preparo convencional e em plantio direto, e relataram que, embora Proteobacteria e Acidobacteria sejam predominantes nos sistemas, foram mais abundantes no solo sob plantio direto.

A composição microbiana também pode impactar a produtividade das culturas. No presente experimento não houve evidência de que a composição microbiana impactou a produtividade do milho, pois foi o rendimento de grãos foi semelhante em todos os tratamentos (Tabela 6), possivelmente devido à homogeneidade da estrutura da comunidade nos diferentes tratamentos. Dos Santos et al. (2017) avaliaram a composição microbiana de dois tipos de solo em áreas de alta e baixa produtividade de soja, e evidenciaram que Acidobacteria foi mais abundante em solo não rizosférico de alta produtividade, enquanto Actinobacteria, Gemmatimonadetes, Chloroflexi e Firmicutes foram encontrados em maior percentagem nas amostras de solo da área com baixa produtividade.

3.2.4.5 Diferenças no nível de classe em resposta aos dois genótipos vegetais

O comportamento das quatro classes mais abundantes encontradas em Proteobacteria no presente estudo, Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria e Gammaproteobacteria, não variou entre as duas culturas analisadas. Contudo, foram observadas diferenças na composição de Acidobacteria, apenas nas classes Acidobacteria-6 (*p-value* 0,0092) e Chloracidobacteria (*p-value* 0,0059) (Tabela 8). O grupo 6 de Acidobacteria é dominante em solos agrícolas evidenciando uma correlação positiva com o pH do solo menos ácido (LIU et al., 2016), o que corrobora sua abundância dentro de Acidobacteria no solo de aveia preta (9,37%; Figura 17) e no milho (10,48% Figura 19). Da mesma forma, Chloracidobacteria tem sido relatado em solos com pH mais próximo da neutralidade, enquanto Acidobacteria e DA052 são exclusivamente dominantes em solos com $\text{pH} < 5,0$ (WU et al., 2017).

As classes Thermoleophilia (*p-value* 0,0087) e Acidimicrobiia (*p-value* 0,0094) de Actinobacteria também apresentaram diferenças entre as duas culturas (Tabela 8). O filo Actinobacteria é abundante tanto em solo rizosférico como não rizosférico, isto devido principalmente a sua capacidade de esporular, fato que lhe confere maior permanência em solos agrícolas (SATHYA; VIJAYABHARATHI; GOPALAKRISHNAN, 2017), bem como

uma maior afinidade por ambientes ricos em nutrientes típicos de sistemas agrícolas com plantio convencional (RAMIREZ-VILLANUEVA et al., 2015). Adicionalmente, alguns gêneros de Actinobacteria têm a capacidade de fixar nitrogênio, tais como *Arthrobacter* e *Streptomyces* (SELLSTEDT; RICHAU, 2013), os quais foram identificados no solo de aveia preta e milho (Tabela 9), apresentando uma abundância relativa de 0,40% e 0,20%, respectivamente.

As diferenças observadas em Gemmatimonadetes (*p-value* 0,0026) ocorreram principalmente nas classes Gemm-1 (*p-value* 0,0116) e Gemmatimonadetes (*p-value* 0,0094) (Tabela 8). A abundância relativa do filo varia entre 0,2 e 6,5% em solos agrícolas (DEBRUYN et al., 2011). Foi observado que na aveia preta sua abundância relativa foi de 5,87% e no milho 6,67%. As diferenças na abundância de espécies de Gemmatimonadetes podem responder a diferentes tipos de fertilização. Ge et al. (2008) registraram que a fertilização com estrume orgânico e a adição de fósforo e potássio elevou a abundância relativa do filo a 12,7%, enquanto em tratamentos com fertilização nitrogenada a abundância se manteve ao redor de 6%. Dos Santos et al. (2017) encontraram que o filo é mais abundante (7%) em sistemas de baixa produtividade de soja, tanto no solo rizosférico como não rizosférico.

Finalmente, Planctomycetes também variou nas duas culturas (*p-value* 0,0002). Buckley et al. (2006) registraram que o manejo do solo influencia a diversidade do filo, ao passo que as variações na matéria orgânica, nos teores de cálcio e no pH influenciam a composição da comunidade de Planctomycetes. Contudo, no presente estudo a variação na composição do filo nas duas culturas não se correlacionou com os parâmetros do solo relatados por Buckley et al. (2006).

3.2.4.6 Bactérias diazotróficas identificadas na área de estudo

Pesquisas sobre o comportamento da comunidade diazotrófica em solos agrícolas tem aumentado na última década com o maior acesso a técnicas moleculares independentes de cultivo. Apesar disso, o conhecimento da comunidade microbiana em áreas agrícolas com longo histórico de fertilização ainda é limitado (WANG et al., 2017a). No entanto, fertilizantes nitrogenados de origem orgânica e inorgânica alteram tanto a abundância como a interação entre os gêneros diazotróficos (FENG et al., 2018; WANG et al. 2017).

Os gêneros encontrados no solo de aveia preta e do milho (Tabela 9) não variaram em resposta à adubação nitrogenada nem à inoculação. Contudo, sua abundância relativa variou

quando comparada com outros estudos com manejo do solo semelhante. A ausência de identificação de sequências de *A. brasilense* pode ser explicada com base nos resultados obtidos no capítulo 1, onde foi possível observar que após o desenvolvimento do sistema radicular a bactéria se adere de forma irreversível às raízes da planta. Como a amostragem de solo para este capítulo foi realizada no florescimento e no solo não rizosférico, os resultados obtidos são condizentes com o comportamento de *A. brasilense* discutido no capítulo 1.

Os gêneros diazotróficos encontrados nas duas culturas analisadas (Tabela 9) pertencem principalmente a Alphaproteobacteria, com uma abundância relativa de 5,75% representada em 10 gêneros, sendo que *Rhodoplanes* (3,0%) e *Bradyrhizobium* (1,3%) foram os mais abundantes. Estes dois gêneros são frequentemente encontrados em solos não agricultáveis, com pH mais baixo e com alto teor de matéria orgânica, demonstrando correlação negativa em solos dedicados à agricultura (ZHALNINA et al., 2013). O pH desempenha papel fundamental no processo de seleção e interação de bactérias diazotróficas, tanto no solo rizosférico como não rizosférico de sistemas agrícolas (FAN et al., 2018).

Pershina et al. (2015), avaliando três tipos de solo numa região temperada, oriundos de plantio orgânico, convencional e floresta, verificaram que a abundância de gêneros com capacidade de fixar nitrogênio se comportava de forma diferente dependendo do tipo de solo; assim, *Rhodoplanes* e *Bradyrhizobium* foram mais abundantes no solo de floresta do que nos solos agrícolas. Souza et al. (2013) observaram que gêneros de Rhizobiales (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Mesorhizobium*) foram os mais abundantes em Alphaproteobacteria, em um sistema plantio direto no sul do Brasil. Roesch et al. (2010) constataram que os gêneros diazotróficos mais abundantes no solo não rizosférico em sistema de preparo convencional de milho no Rio Grande do Sul foram *Bradyrhizobium* (17%), *Nitrospira* (14%), *Sphingomonas* (13%) e *Pseudomonas* (7%).

Bacillus com uma abundância relativa de 1,0% foi o gênero mais abundante dentro de Firmicutes nas duas culturas. Espécies desse filo se caracterizam por habitar ambientes com alta disponibilidade de carbono (RODRIGUES et al., 2013), como são os solos bem manejados em sistema plantio direto. Wang et al. (2016) também encontraram alta abundância do gênero em solos sob plantio direto e com tratamento de escarificação em comparação com solos sob preparo convencional.

Finalmente, *Pseudomonas* (Gammaproteobacteria) é abundante em solos agrícolas, sendo altamente influenciado pelo uso e manejo do solo (GARBEVA; VEEN; ELSAS, 2004), podendo variar entre 16,0 e 13,2% em sistemas de preparo convencional e orgânico, respectivamente (PERSHINA et al., 2015). A abundância relativa desse gênero no presente

estudo foi baixa (0,3%). A homogeneidade das características químicas do solo e o longo histórico de plantio direto na área podem explicar a baixa abundância, pois *Pseudomonas* responde rapidamente a mudanças edáficas nas características do solo (LI et al., 2012).

3.2.5 Conclusões

O longo histórico de plantio direto na área de estudo pode ter contribuído com a estabilidade da comunidade microbiana do solo não rizosférico de aveia preta e do milho, em resposta principalmente à fertilidade construída a partir da rotação de culturas, e refletida na homogeneidade dos teores de carbono orgânico e nitrogênio total nos diferentes tratamentos. Nesse sentido, independentemente da fertilização com diferentes doses de N-ureia, a estrutura da comunidade microbiana não variou, evidenciando que aparentemente se encontra bem adaptada aos teores de nitrogênio já presentes no solo.

A inoculação com BPCV como *Azospirillum brasilense* também não refletiu numa mudança na composição microbiana do solo não rizosférico do milho, principalmente devido à sua afinidade pelas raízes das plantas, como discutido no capítulo 1. O contrário foi observado para a inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* na soja, o qual teve um efeito residual na aveia preta, como corroborado pelo índice de beta diversidade. De tal modo, diferenças no número de espécies entre as duas culturas foram confirmadas quando analisados os filos no nível de classe. Contudo, a abundância de gêneros diazotróficos foi semelhante nas duas culturas, evidenciando não variar significativamente entre os tratamentos avaliados. No entanto, estudos mais específicos de quantificação, sequenciamento e expressão do gene *nifH* são necessários para compreender melhor o comportamento desse grupo bacteriano no sistema plantio direto.

Os resultados apontam para a hipótese de que práticas mais conservacionistas na agricultura contribuem para a estabilidade da comunidade microbiana, o que se reflete na saúde do solo e, conseqüentemente, na alta produtividade de culturas de interesse agrícola, como o milho. Finalmente, o conhecimento do comportamento da comunidade microbiana em resposta a diferentes tratamentos de fertilização e inoculação pode contribuir para a identificação de grupos chave envolvidos na ciclagem de diferentes nutrientes, permitindo melhor aproveitamento dos mesmos.

3.2.6 Perspectivas para Futuras Pesquisas

A estabilidade na composição bacteriana observada nas duas culturas analisadas permite inferir que o comportamento poderia ser semelhante nas culturas seguintes (trigo, soja e centeio). Nesse sentido, sugere-se analisar tais culturas, bem como analisar outros sistemas de rotação e de longa duração, em diferentes tipos de solo. Os resultados dessas análises permitiriam confirmar se a rotação de culturas em sistema plantio direto modela o comportamento da comunidade bacteriana. Também seria possível identificar grupos chave fundamentais para o equilíbrio e que contribuem com valores de alta produtividade das culturas, o que representaria um avanço na tecnologia de inoculação, na qual o principal objetivo seria a manutenção de tais grupos.

3.3 EFEITO DA ADUBAÇÃO NITROGENADA E DA INOCULAÇÃO COM BPCV NA ABUNDÂNCIA DE GENES ENVOLVIDOS NO CICLO BIOLÓGICO DO NITROGÊNIO EM SISTEMA PLANTIO DIRETO

3.3.1 Introdução

O nitrogênio é um nutriente essencial para todos os organismos vivos, sendo requerido para a biossíntese de proteínas e ácidos nucleicos. Encontra-se em altas concentrações na forma atmosférica, porém apenas algumas bactérias e arqueias conseguem aproveitá-lo através da fixação biológica. As formas biodisponíveis do nitrogênio (NH_4^+ e NO_3^-) são escassas na maioria dos ambientes, tornando-o um nutriente limitante, cuja produção é controlada principalmente por reações microbianas que alteram o estado de oxidação do nitrogênio (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018).

A ciclagem do nitrogênio nos solos é fortemente controlada por fatores ambientais. O parâmetro mais importante é a disponibilidade de oxigênio, porque determina quais processos dominam. Nesse sentido, solos com altas concentrações de oxigênio promovem a nitrificação, enquanto condições anóxicas ou de baixo oxigênio promovem a desnitrificação, a redução dissimilatória do nitrato a amônia, a oxidação anaeróbica do amônio e a fixação de nitrogênio por bactérias fixadoras de nitrogênio (BRAKER; CONRAD, 2011).

Devido ao nitrogênio ser um fator limitante, a fertilização nitrogenada é uma prática comum na agricultura, a qual é fundamental para incrementar a produtividade das culturas. Contudo, das 115 Tg N aplicadas anualmente na agricultura mundial, aproximadamente entre 50 – 70% são liberadas ao ambiente principalmente por perdas por volatilização de amônia

(NH₃), lixiviação e escoamento de nitrato (NO₃⁻) e por desnitrificação, emitindo gases de efeito estufa como o óxido nitroso (N₂O) (COSKUN et al., 2017). Tais perdas, produto da excessiva adubação nitrogenada, causam sérios problemas ao meio ambiente em nível global (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2013). As práticas de fertilização influenciam a estrutura e abundância da comunidade microbiana do solo, seja de forma direta, alterando as características do solo, ou indiretamente, alterando a resposta da planta por meio dos exsudatos radiculares (GEISSELER; SCOW, 2014; ZENG et al., 2016; WANG et al., 2017).

O uso de BPCV na agricultura como alternativa para diminuir as quantidades de nitrogênio aplicadas nas lavouras vem se mostrando como uma técnica promissória. O reflexo disto verifica-se no drástico aumento de *startups* trabalhando com produtos biológicos (WALTZ, 2017). No entanto, a introdução de microrganismos pode alterar a composição da estrutura da comunidade do solo, devido à alta competitividade e ao volume dos inoculantes aplicados (MAWARDA et al., 2020).

Há ainda muitas lacunas referentes ao verdadeiro impacto do uso de inoculantes na produtividade agrícola. Além disso, não existe um sistema padronizado para produção e comercialização de inoculantes em nível mundial, o que tem gerado dúvidas referentes à compatibilidade ambiental (KAMINSKY et al., 2019). O conhecimento sobre o impacto dos inoculantes na comunidade do solo é fundamental para evitar invasões microbianas, produzidas por patógenos oportunistas, as quais podem vir a ocorrer com uma futura prática de inoculação generalizada na agricultura (JACK et al., 2020).

3.3.1.1 O ciclo do nitrogênio

O ciclo biológico do nitrogênio é um dos mais importantes no ecossistema terrestre. Inclui quatro grandes processos, a saber: fixação de nitrogênio, mineralização, nitrificação e desnitrificação. Muitos microrganismos que realizam esses processos não podem ser cultivados em laboratório. Como alternativa, genes chave de cada um dos processos tem sido monitorados através de técnicas moleculares, por exemplo PCR em tempo real – qPCR. A caracterização de genes funcionais envolvidos em múltiplos processos da ciclagem do nitrogênio permite extrair informações do funcionamento dos ecossistemas (TU et al., 2016).

O ciclo pode ser descrito como uma rede de reações de oxido-redução catalisadas por plantas, fungos, bactérias e arqueias, sendo que estes organismos modelam o estado de oxidação do nitrogênio desde a redução de aminas (amônio, por exemplo) à total oxidação do nitrato (COSKUN et al., 2017).

Fixação do nitrogênio. O N_2 é incorporado naturalmente à vida na terra via fixação biológica pela ação de organismos diazotróficos. Estes organismos podem ser bactérias ou arqueias, de vida livre ou simbióticas (rizóbios e *Frankia*), as quais reduzem o nitrogênio atmosférico a amônia/amônio ($N_2 \rightarrow NH_3/NH_4^+$), e o nitrogênio nessa forma é incorporado nos aminoácidos e, posteriormente, fica depositado em vários compostos orgânicos. O processo é mediado pela metaloenzima nitrogenase. Existem três tipos de nitrogenase, as quais têm sequência, estrutura e função semelhantes; porém, se diferenciam pelo cofator metálico; estas são: ferro-ferro (FeFe), vanádio-ferro (VFe) e molibdênio-ferro (MoFe) (EADY, 1996). O *nifH*, gene que codifica a proteína ferro da nitrogenase, é altamente conservado e, por tal motivo, esse gene pode ser utilizado em estudos filogenéticos (TEIXEIRA; YERGEAU, 2012), como também para a quantificação de organismos fixadores de nitrogênio no ambiente (ZEHR et al., 2003).

Nitrificação. O NH_4^+ pode ser oxidado por microrganismos, produzindo hidroxilamina (NH_2OH), nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) pelo processo de nitrificação. A oxidação da amônia para hidroxilamina $NH_4^+ \rightarrow NH_2OH$ é catalisada pela enzima amônia monooxigenase (AMO), codificada pelo gene funcional *amoA*, presente em bactérias e arqueias anaeróbicas (TREUSCH et al., 2005).

A hidroxilamina é oxidada a óxido nítrico ($NH_2OH \rightarrow NO$) pela enzima hidroxilamina oxidoreductase (HAO) codificada pelo gene *hao* (BRAKER; CONRAD, 2011) e, posteriormente, óxido nítrico é convertido a nitrito ($NO \rightarrow NO_2^-$); porém ainda se desconhece a enzima que catalisa essa reação (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018). Como esse processo é endorgênico (isto é, requer aporte de energia), todas as bactérias que carregam o gene *amo* apresentam também o gene *hao*. Contudo, a mesma situação não acontece em arqueias que carregam o gene *amo*, sendo que a enzima que catalisa a reação ($NH_2OH \rightarrow NO$) ainda permanece desconhecida (SIMON; KLOTZ, 2013).

A oxidação do nitrito a nitrato ($NO_2^- \rightarrow NO_3^-$) é a principal via bioquímica para obtenção do nitrato. Essa reação é mediada pela enzima nitrito oxidoreductase (NXR), a qual é codificada pelo gene *nxrA* (POLY et al., 2008). A atividade dos microrganismos oxidantes de amônia e de nitrito é fundamental em solos agrícolas, uma vez que são responsáveis pela conversão dos fertilizantes nitrogenados à nitrato (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018).

Desnitrificação. O NO_3^- pode ser reduzido a NO_2^- , óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O) e, finalmente, à forma N_2 novamente. Tal processo é mediado tanto por bactérias como por arqueias e fungos. A desnitrificação ocorre em condições anóxicas e é realizada

principalmente por bactérias heterotróficas, diferente da nitrificação que é mediada por bactérias e arqueias autotróficas (BRAKER; CONRAD, 2011).

Inicialmente, a redução de nitrato a nitrito ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$) é catalisada pela enzima nitrato redutase que é codificada pelos genes funcionais *narG* e *napA*. Posteriormente, a redução do nitrito a óxido nítrico ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}$) é catalisada por duas enzimas, a nitrito redutase que contém cobre e é codificada pelo gene *nirK*, ou a nitrito redutase que contém citocromo cd1 e é codificada pelo gene *nirS* (PHILIPPOT; HALLIN; SCHLOTTER, 2007). A seguinte etapa consiste na redução do óxido nítrico a óxido nitroso ($\text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O}$), a qual é catalisada pela enzima óxido nítrico redutase, codificada pelo gene *norB* (BRAKER; CONRAD, 2011).

Finalmente, a redução de óxido nitroso a nitrogênio molecular ($\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$) representa a última etapa da desnitrificação, na qual, o gene funcional *nosZ* codifica a enzima óxido nitroso redutase (PHILIPPOT; HALLIN; SCHLOTTER, 2007). Tanto bactérias como alguns fungos e arqueias podem realizar tal processo, porém apenas alguns organismos são desnitrificadores “clássicos” ou completos, isto é, carregam no seu genoma todos os genes para produzir as enzimas nitrato, nitrito e óxido nítrico redutase.

Os desnitrificantes clássicos são aeróbios facultativos que podem mudar sua respiração para realizar a desnitrificação quando as condições do solo se tornam anóxicas (HAGEMANN; HARTER; BEHRENS, 2016). A maioria de microrganismos que apresentam o gene *nosZ* típico são encontrados no filo Proteobacteria. No entanto, recentemente foi descoberto um novo clado de redutores de N_2O . Esses últimos apresentam uma forma atípica do gene *nosZ*, são fisiologicamente mais diversos, podem colonizar uma maior diversidade de ambientes e se encontram classificados em diferentes filos, como Chloroflexi, Chlorobi e Aquificae (JONES et al., 2014). Devido à ausência dos outros genes que interferem no processo de desnitrificação, tais microrganismos apenas conseguem transformar N_2O a N_2 .

Além dos processos descritos anteriormente, existem duas reações menos entendidas: 1) A oxidação anaeróbica do amônio (anammox pelas suas siglas em inglês) na qual ocorre a síntese de hidrazina (HZS) pela ação dos genes *hzsA* e *hzsB* (KARTAL et al., 2011), presentes apenas em algumas bactérias anaeróbicas pertencentes ao filo Planctomycetes (JETTEN et al., 2010). A hidrazina é então oxidada a gás dinitrogênio pela enzima hidrazina dehidrogenase (HDH) (KUYPERS; MARCHANT; KARTAL, 2018); 2) a redução dissimilatória do nitrato a amônia (DNRA pelas suas siglas em inglês), na qual o NO_3^- é usado como um aceptor de elétrons (BRUNET; GARCIA-GIL, 1996) por bactérias e fungos que o reduzem a NH_3 via NO_2^- em condições anaeróbicas ou de baixa disponibilidade de oxigênio (COSKUN et al.,

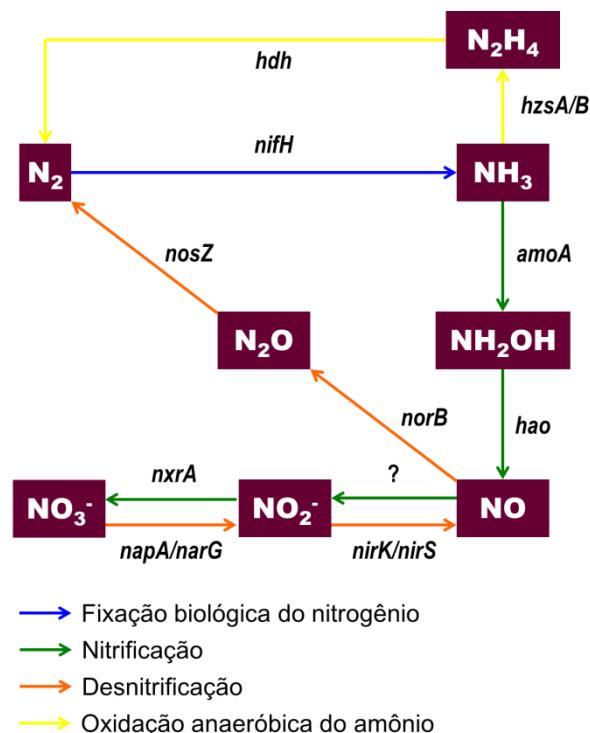
2017). Tal processo é mediado pelo gene *nfrA*. A abundância do gene *nfrA* encontra-se positivamente correlacionada com a umidade e a concentração de nitrito e nitrato no ambiente (ZHAO et al., 2020).

Um esquema simplificado dos principais processos e transformações no ciclo do nitrogênio mediados por microrganismos encontra-se na Figura 20 e inclui os genes utilizados como marcadores para monitorar tais processos por qPCR.

3.3.1.2 Trabalhos que quantificaram genes do ciclo do nitrogênio pela técnica de qPCR

Nos últimos anos, houve um aumento no número de trabalhos que monitoraram as comunidades microbianas envolvidas no ciclo do nitrogênio utilizando a técnica de qPCR. Na Tabela 10 são listados alguns destes trabalhos que têm estudado os três principais processos do ciclo do nitrogênio: fixação, nitrificação e desnitrificação, com foco principal em trabalhos realizados em solos agricultáveis.

Figura 20 - Principais processos do ciclo do nitrogênio mediados por microrganismos e principais genes que participam no ciclo, utilizados como marcadores para monitorar sua abundância no solo pela técnica de qPCR.



O presente capítulo teve como objetivo avaliar a abundância de alguns genes envolvidos na ciclagem do nitrogênio e sua resposta à adubação nitrogenada e à inoculação com BPCV em sistema plantio direto com rotação de culturas.

O trabalho foi desenvolvido a partir das seguintes hipóteses: (i) os inoculantes, as diferentes doses de nitrogênio e o tipo de cultura alteram a abundância de bactérias fixadoras do nitrogênio e desnitrificantes; e (ii) o sistema de manejo do solo, como o plantio direto, estabiliza a população de bactérias fixadoras de nitrogênio e desnitrificantes do solo, o que pode contribuir para um melhor aproveitamento da adubação nitrogenada.

Tabela 10 - Resumo de alguns trabalhos que utilizaram a técnica de qPCR para quantificar genes funcionais do ciclo do nitrogênio.

Função	Gene	Resumo	Referência
Fixação N ₂	<i>nifH</i>	Deteção de <i>nifH</i> na rizosfera do sorgo com dois níveis de adubação nitrogenada: A adubação nitrogenada e o cultivar foram dois fatores importantes que influenciaram a estrutura e quantidade da comunidade diazotrófica na rizosfera do sorgo.	(COELHO et al., 2009)
		Atividade de bactérias diazotróficas em sistema de plantio convencional e orgânico: ambos os tipos de manejo apresentaram efeitos positivos na diversidade e atividade do gene <i>nifH</i> .	(ORR et al., 2011)
Nitrificação	<i>amoA</i>	Efeito do amônio no tamanho da população de AOB no solo: o conhecimento da dinâmica populacional de AOB pode contribuir com o controle das perdas de N em agroecossistemas e pode otimizar o uso de fertilizantes nitrogenados.	(OKANO et al., 2004)
		Arqueias são predominantes entre procariotos oxidantes de amônia no solo: AOA foram mais abundantes do que AOB em 12 análises de solo de diferentes ecossistemas incluindo áreas agrícolas, indicando que provavelmente as AOA sejam os organismos oxidantes de amônia mais abundantes do planeta.	(LEININGER et al., 2006)
		Impacto de pesticidas utilizados na agricultura na quantidade e diversidade de oxidantes de amônia no solo: AOA e AOB podem ser utilizados como bioindicadores, devido à sua sensibilidade à pesticidas.	(FELD et al., 2015)
	<i>nxrA</i>	Desenho de oligonucleotídeos para o gene funcional <i>nxrA</i> : monitoramento da diversidade de <i>Nitrobacter</i> em três tipos de solo	(POLY et al., 2008)
		Resposta da comunidade de nitrificadores à irrigação do solo em condições de laboratório: o número de cópias de <i>nxrA</i> foi encontrado em valores na ordem de 10 ⁵ , respondendo de forma diferente à irrigação em dois tipos de solo.	(PLACELLA; FIRESTONE, 2013)
Desnitrificação	<i>nirK/nirS</i>	Quantificação de bactérias desnitrificantes pelo gene <i>nirK</i> : desenho de oligonucleotídeos iniciadores para o gene funcional.	(HENRY et al., 2004)
		Abundância dos genes <i>nifH</i> , <i>nir</i> e <i>nirK</i> no solo em Canadá: fatores como matéria orgânica, C e N influenciaram o número de cópias do genes.	(LEVY-BOOTH; WINDER, 2010)
	<i>nosZ</i>	Comparação da abundância de 16S rRNA e genes envolvidos no processo de desnitrificação: Desenho de oligonucleotídeos iniciadores para a quantificação do gene.	(HENRY et al., 2006)
Quantificação de diversos genes do ciclo do N em estudos ecológicos			
Transformação de N por bactérias e arqueias em culturas para produção de bioenergia. Genes analisados: 16S rRNA, <i>nifH</i> , <i>amoA</i> , <i>nosZ</i> .			(MAO; YANNARELL; MACKIE, 2011)
Dinâmica temporal e espacial de microrganismos fixadores de nitrogênio, nitrificantes e desnitrificantes em um solo de pastagem não fertilizado. Genes analisados: 16S rRNA, <i>nifH</i> , <i>amoA</i> , <i>nirS</i> , <i>nirK</i> , <i>nosZ</i> .			(REGAN et al., 2017)
Distribuição de comunidades microbianas envolvidas no ciclo do nitrogênio a escala de paisagem. Genes analisados: <i>amoA</i> , <i>narG</i> , <i>napA</i> , <i>nirS</i> , <i>nirK</i> , <i>nosZ</i> .			(BRU et al., 2011)
Variação da comunidade bacteriana desnitrificante. Genes analisados: <i>nirS</i> , <i>nirK</i> , <i>nosZ</i> .			(YANG et al., 2018)

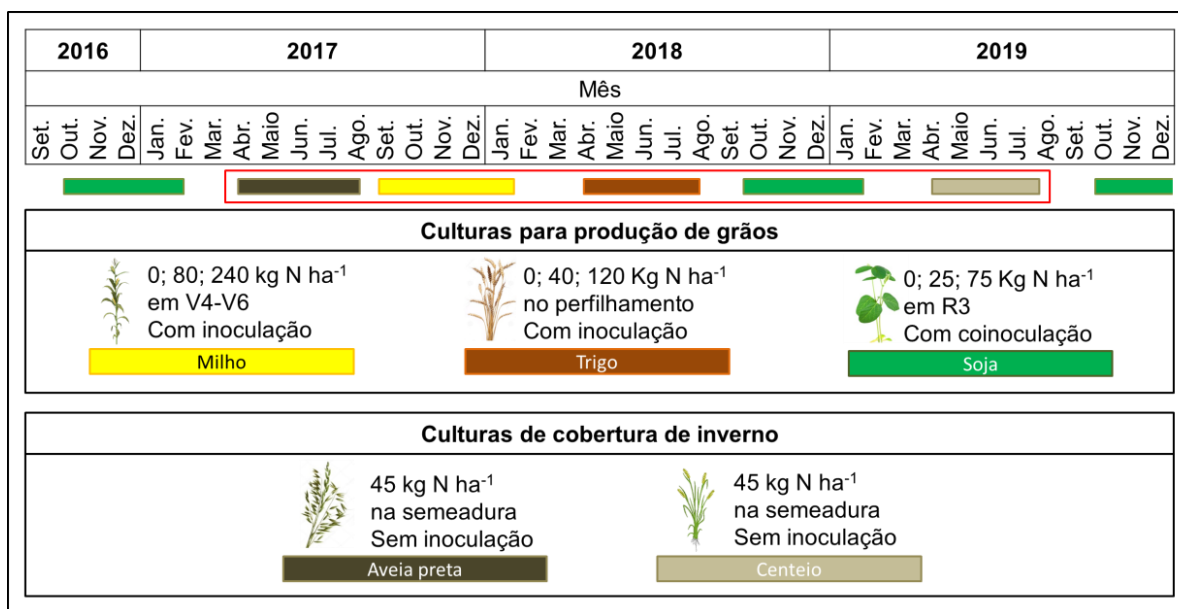
3.3.2 Material e métodos

3.3.2.1 Coleta de amostras

As coletas de solo do presente experimento começaram no inverno de 2017 com a cultura da aveia preta e terminaram em julho de 2019 com a cultura do centeio. Um resumo da sucessão de culturas entre 2016 e 2019, uma descrição da adubação nitrogenada de cada cultura e a inoculação com BPCV se encontram representados na Figura 21.

As amostras de solo foram coletadas durante a fase de florescimento de cada cultura. Com a ajuda de um trado foram coletadas 12 amostras simples numa profundidade de 0 – 10 cm para formar uma amostra composta por parcela, conforme o protocolo de Cares e Huang (2008). As amostras foram transportadas sob-refrigeração e armazenadas no Laboratório de Biologia Molecular Microbiana – LABMOM, numa temperatura de -20 °C.

Figura 21 - Sucessão de culturas em um ciclo de rotação completo, com início em abril de 2017 e fim em julho de 2019 as quais se encontram delimitadas no retângulo vermelho. Nas culturas de milho e trigo foi realizada a inoculação com *Azospirillum brasilense* AbV5/AbV6 (2×10^8 UFC mL⁻¹), utilizando-se as doses de 100mL para 60000 sementes e 2,5 ml por kg de sementes de milho e trigo respectivamente. Na cultura da soja todas as parcelas receberam inoculação com *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA5079/5080 (5×10^9 UFC mL⁻¹) e, em parcelas que receberam *A. brasilense* AbV5/AbV6 em outras culturas, foi realizada a co-inoculação (*B. japonicum* + *A. brasilense*), utilizando-se a dose de 2,0 mL de cada inoculante por kg de sementes.



3.3.2.2 Extração do DNA total do solo

O DNA total do solo foi extraído utilizando-se o kit *PowerSoil DNA isolation* da *MOBIO Laboratories, Inc.* seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após extração

o DNA total foi quantificado por espectrofotometria em NanoVue™ Plus, e finalmente armazenado a -20 °C.

A qualidade do DNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose como descrito por Sambrook e Russell (2001). O tampão de corrida foi TAE 1X, utilizando-se uma concentração do gel de 0,8 % (p/v). Os produtos de amplificação foram misturados com corante FSUDS (5x). A corrida foi a 50 V durante duas horas. Após a eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 0,5 µg mL⁻¹ durante 20 minutos, retirando o excesso de corante pela submersão do gel em água durante 10 minutos.

O DNA foi visualizado em transiluminador (*Fusion FX, Vilber Lourmat*). Foi considerado DNA de boa qualidade quando apareceram bandas intensas acima da primeira banda (10000 bp) do marcador molecular 1kb ladder.

3.3.2.3 Geração das curvas de calibração para *nifH*, *nosZ* e 16S rRNA

Baseando-se na análise dos genomas de *A. brasilense* disponíveis na plataforma NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), foi determinado que a espécie possui uma cópia dos genes *nifH* e *nosZ*. Baseado no anterior, as curvas de calibração para os genes *nifH* e *nosZ*, foram geradas utilizando-se o DNA desta bactéria, como descrito a seguir.

Para obtenção do DNA das diluições para construção da curva foi seguido o protocolo proposto por Couillerot et al. (2010b) com algumas modificações. Resumidamente, 300 g de solo oriundo do mesmo local onde foi realizado o experimento foram autoclavados durante 40 minutos a 120°C. Posteriormente, em sete tubos de extração do kit *PowerSoil DNA isolation* da *MOBIO Laboratories, Inc*, foram colocados 0,25 g de solo autoclavado. Paralelamente, foi realizada uma diluição seriada de 10⁸ até 10² do inoculante comercial Grap Noda® a base de *A. brasilense* AbV5/AbV6, e 1000 µL de cada diluição foram inoculados nos tubos de extração contendo o solo autoclavado. Foram deixados em repouso durante uma hora a 4 °C para promover a interação entre o solo e as bactérias e, finalmente, o DNA foi extraído seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do kit. O DNA foi quantificado e armazenado a -20 °C.

Para o gene 16S rRNA, o qual permite quantificar o número aproximado de bactérias nas amostras coletadas, partiu-se da premissa de que *A. brasilense* AbV5/AbV6 apresenta uma cópia do gene, porém, é possível encontrar ao menos duas cópias do gene devido à presença em diferentes replicons (CABALLERO-MELLADO; LÓPEZ-REYES; BUSTILLOS-CRISTALES, 1999).

As curvas foram geradas no termociclador *Lyghtcycler*[®] Nano Roche para os genes *nifH* e 16S rRNA e no termociclador *Aria Mx* Agilent Technologies para o gene *nosZ*. Cada amostra foi quantificada em duplicata e foram seguidos os seguintes parâmetros:

A- Para as curvas geradas no termociclador *Lyghtcycler*[®] Nano Roche, cada reação consistiu de 10 µL de SYBR (*FastStart Essential DNA Green Master*), 5,5 µL de água ultrapura estéril, 1 µL de cada par de oligonucleotídeos (10 pmol.µL⁻¹), e 2,5 µL de DNA (10 – 50 ng. µL⁻¹), para um volume de reação de 20 µL.

B- Para as curvas geradas no termociclador *Aria Mx* Agilent Technologies, cada reação consistiu de 12,5 µL de SYBR (*Brilliant III Ultra-Fast SYBR*[®] *Green*), 1 µL de cada par de oligonucleotídeos (10 pmol uL⁻¹), 2,5 µL de DNA (10 – 50 ng µL⁻¹), e completou-se com água ultrapura estéril para um volume de reação de 25 µL.

O programa de corrida para as reações foi o mesmo utilizado para a quantificação dos genes, como descrito no próximo tópico.

3.3.2.4 Quantificação dos genes *nifH*, *nosZ* e 16S rRNA em amostras de campo

Os oligonucleotídeos utilizados para a quantificação dos genes *nifH*, *nosZ* e 16S rRNA encontram-se descritos na Tabela 11.

Para os genes *nifH* e 16S rRNA, cada reação consistiu de 10 µL de SYBR (*FastStart Essential DNA Green Master*), 5 µL de água ultrapura estéril, 1 µL de cada par de oligonucleotídeos (10 pmol uL⁻¹), 0,5 µL de BSA (10 mg ml⁻¹ *BioLabs*) e 2,5 µL de DNA (10 – 70 ng µL⁻¹), para um volume de reação de 20 µL.

Para o gene *nosZ*, cada reação consistiu de 12,5 µL de SYBR (*Brilliant III Ultra-Fast SYBR*[®] *Green*), 1 µL de cada par de oligonucleotídeos (10 pmol uL⁻¹), 0,5 µL de BSA (10 mg ml⁻¹ *BioLabs*) e 2,5 µL de DNA (10 – 70 ng µL⁻¹), e completou-se com água ultrapura estéril para um volume de reação de 25 µL.

O programa utilizado no qPCR foi o mesmo para os três genes, apenas com mudança na temperatura de anelamento, a saber, um ciclo de 10 minutos a 95° C, seguido de 40 ciclos de três etapas: 15 segundos a 95° C, 20 segundos a 55; 57 ou 60° C para *nifH*, *nosZ* e 16S rRNA respectivamente, e uma etapa final de 20 segundos a 72° C. Para a construção da curva de dissociação (curva de *Melting*) foram aceitas as configurações automáticas de cada equipamento.

Tabela 11 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nas reações de qPCR para o monitoramento dos genes *nifH*, *nosZ* e 16SrRNA, nas culturas de aveia preta, milho, trigo, soja e centeio.

Oligonucleotídeo iniciador	Gene	Sequência	Amplicon (pb)	Referência
Pol F	<i>nifH</i>	TGC GAY CCS AAR GCBGAC TC	360	(POLY; MONROZIER; BALLY, 2001)
Pol R		ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA		
nosZ F	<i>nosZ</i>	CGY TGT TCM TCG ACA GCC AG	450	(KLOOS et al., 2001)
nosZ 1622R		CGS ACC TTS TTG CCS TYG CG		
341 F	16S	CCT ACG GGA GGC AGC AG	174	(RUIZ-RUEDA; HALLIN; BAÑERAS, 2009)
534 R	rRNA	ATT ACC GCG GCT GCT GGC A		
				BRU; MARTIN-LAURENT; PHILIPPOT, 2008

A determinação do número de cópias foi realizada automaticamente pelo software de cada equipamento, utilizando-se a curva de calibração como parâmetro. Cada amostra foi quantificada em triplicata técnica, e só foram aceitas repetições com uma variação de Cq de $\pm 0,5$ ciclos, sem variações na temperatura do pico da curva de dissociação.

Todos os produtos da quantificação foram confirmados por eletroforese em gel de agarose como descrito anteriormente. O tampão de corrida foi TBE 1X, a concentração do gel foi de 2 % (p/v) e os produtos de amplificação foram misturados com corante FSUDS (5x). A corrida foi a 90 V durante uma hora. A identidade dos produtos foi confirmada pela presença de banda única no tamanho específico para cada par de oligonucleotídeos (Tabela 11).

Com a finalidade de padronizar a quantidade de DNA utilizada em cada amostra, e o número de cópias presentes em um grama de solo, o número de cópias obtido pela quantificação por qPCR, foi convertido utilizando a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{cópias do gene}}{\text{g de solo}} = 4 * \left[\frac{(20 * A)}{(2,5 * B)} \right]$$

onde:

A = número de cópias de cada gene quantificadas por qPCR

B = Concentração da amostra (DNA ng μL^{-1}) quantificado em NanoVue™ Plus

Na fórmula anterior, o número quatro refere-se a quatro partes de 250 mg (peso de cada amostra de solo utilizada para a extração de DNA), para completar um grama de solo; o número 20 refere-se à quantidade de DNA desejada para cada amostra, neste caso 20 ng μL^{-1} ; finalmente, o número 2,5 refere-se aos μL de DNA utilizados para quantificar cada amostra.

Para obter o número de cópias de *nifH* e *nosZ* em relação ou número aproximado de bactérias totais em cada um dos tratamentos analisados, foram calculados os valores relativos para cada gene utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ cópias} = \left(\frac{\text{número de cópias } nifH \text{ ou } nosZ}{\text{número de cópias 16S rRNA}} \right) \times 100$$

Finalmente, as análises estatísticas foram realizadas no pacote Agricolae (DE MEDIBURU, 2019), e Laercio (DA SILVA, 2015) no programa R.

3.3.3 Resultados

Os resultados do presente capítulo correspondem à abundância dos genes *nifH* e *nosZ* em relação ao número total de bactérias encontradas no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio. Inicialmente, o experimento incluía os genes *nirK*, *nirS* e *amoA*. Porém, devido à dificuldade para o ajuste das curvas de calibração, a quantificação para tais genes não foi finalizada até o momento da defesa.

3.3.3.1 Ajuste das curvas de calibração

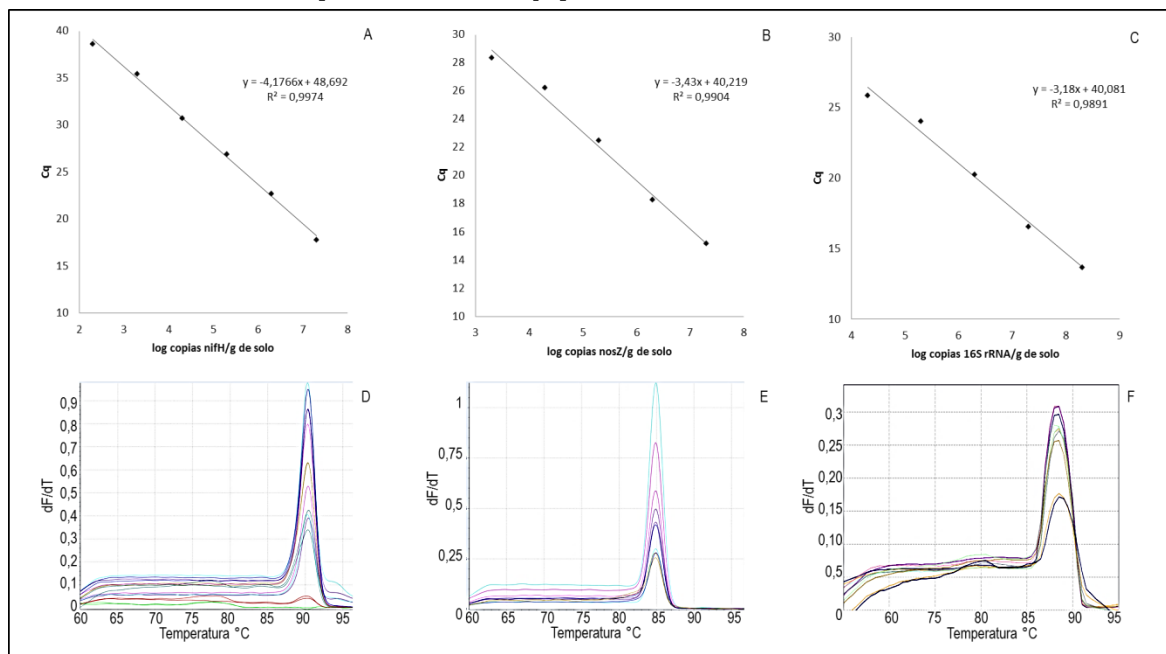
As curvas de calibração geradas para os três pares de oligonucleotídeos representam uma regressão linear entre o Cq e o número de cópias g⁻¹ de solo (Figura 22A; 22B e 22C). As curvas apresentaram valores de eficiência (E), r² e *slope* (Tabela 12) dentro dos limites aceitáveis, isto é, E= 85 – 110%, r²= próximo de 1, *slope*= entre -2,98 e -3,65 (BUSTIN et al., 2009, D’HAENE; VANDESOMPELE; HELLEMANS, 2010, SVEC et al., 2015).

Tabela 12 - Parâmetros para cada par de oligonucleotídeos obtidos a partir da curva de calibração.

Gene	E (%)	r ²	<i>slope</i>	TM (°C)	Lim. detecção (cópias g ⁻¹ solo)
<i>nifH</i>	88	0,99	-4,17	90	2x10 ⁷ – 2x10 ²
<i>nosZ</i>	95	0,99	-3,43	88	2x10 ⁷ – 2x10 ³
16S rRNA	102	0,98	-3,18	85	2x10 ⁸ – 2x10 ⁴

Todas as curvas de *Melting* (Figura 22D; 22E e 22F) apresentaram apenas um pico e não houve amplificação do controle negativo (sem DNA), indicando que não existe formação de produtos inespecíficos, como por exemplo, dímeros de oligonucleotídeos. Os produtos da amplificação foram todos confirmados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo. Foi corroborado que os produtos amplificados corresponderam aos fragmentos de interesse.

Figura 22 - Curvas de calibração para os genes *nifH* (A); *nosZ* (B) e 16S rRNA (C) a partir da regressão linear do log de cópias gene/g de solo e o ciclo de quantificação (Cq). Os pontos representam duplicatas do DNA produto da diluição seriada ($2 \times 10^3 - 2 \times 10^2$) de *A. brasilense* AbV5/AbV6 inoculado em solo estéril. Curvas de *Melting* para os genes *nifH* (D); *nosZ* (E) e 16S rRNA (F) foram geradas automaticamente pelo software dos equipamentos.



3.3.3.2 Abundância dos genes *nifH*, *nosZ* e 16S rRNA

Número aproximado de bactérias totais

O número de cópias do gene 16S rRNA se manteve estável dentro de cada cultura (Figura 23), indicando que a adubação nitrogenada e a inoculação com BPCV não afetaram a abundância de bactérias, como foi corroborado pela análise de variância (Tabela 13). Essa análise não mostrou diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos. Contudo, foram observadas diferenças no número de cópias do gene entre as diferentes culturas (Figura 23). O centeio foi a cultura que apresentou os valores mais baixos de cópias do gene, na ordem de 10^8 . As culturas da aveia preta, milho, trigo e soja apresentaram valores na ordem de 10^9 , sendo encontrado no milho o maior número de cópias do gene (Figura 23).

A análise de componentes principais (Figura 24) incluindo os atributos químicos do solo (Tabela 7) e a produtividade das culturas explicou 37,9% da variação dos dados. Foi observado que a produtividade do trigo esteve relacionada como o número total de bactérias ($1,56 - 1,86 \times 10^9$ cópias do gene 16S rRNA g^{-1} de solo). O número de cópias de 16S rRNA na cultura da soja esteve relacionado com o teor de magnésio no solo; já, no milho, esteve relacionado com o teor de fósforo no solo.

Figura 23 - Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com BPCV no número de cópias do gene 16S rRNA. As doses de N Baixo/Alto correspondem a 80/240 kg N ha⁻¹; 40/120 kg N ha⁻¹ e 25/75 kg N ha⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente. Aveia preta e centeio não receberam doses extras de N por serem culturas de cobertura de inverno. Com: inoculação com *A. brasilense* ou co-inoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum*, Sem: sem inoculação. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre as culturas e letras minúsculas entre os tratamentos dentro de cada cultura (Tukey $p < 0,05$).

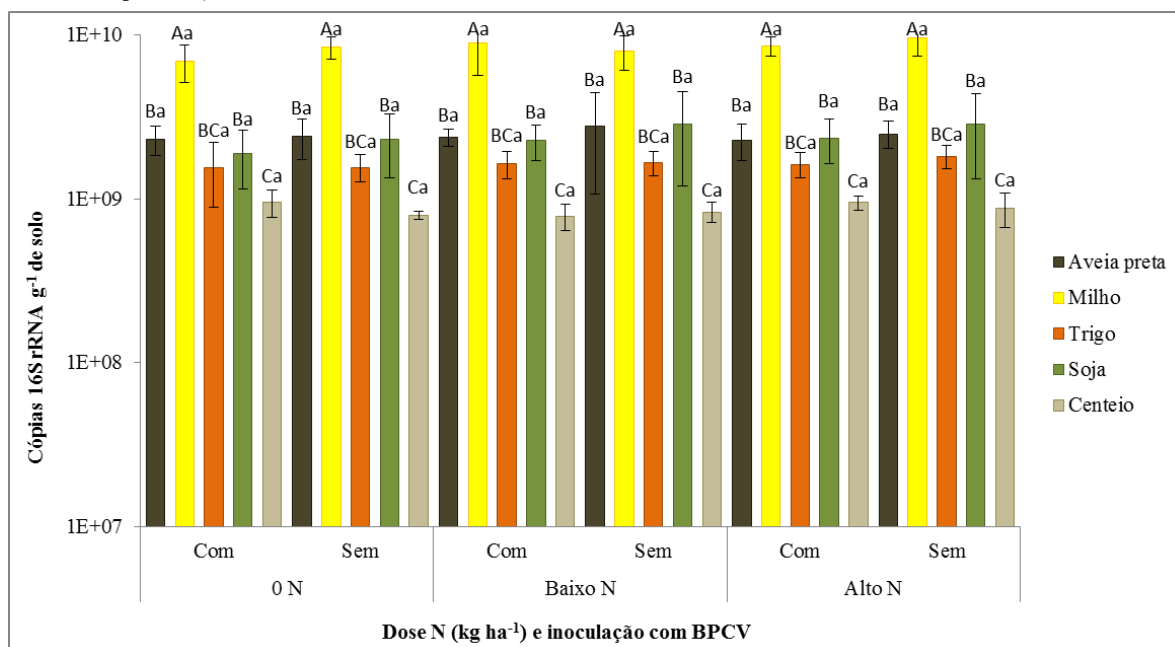
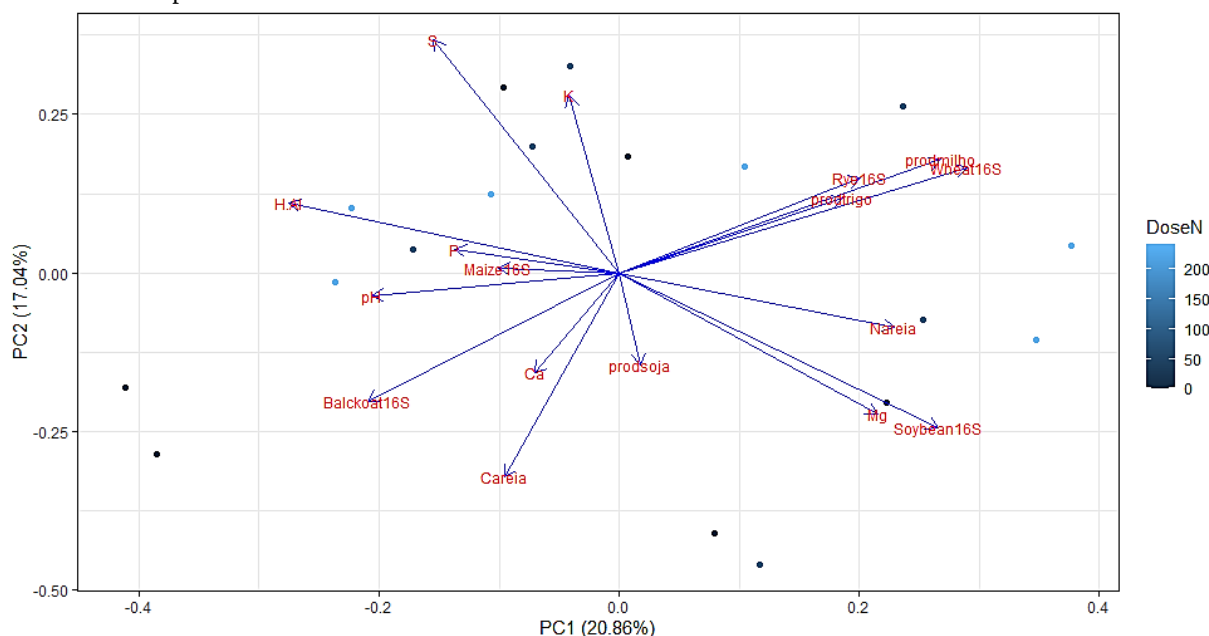


Tabela 13 - Análise de variância para o número de cópias do gene 16S rRNA no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio. As doses de N Baixo/Alto correspondem a 80/240 kg N ha⁻¹; 40/120 kg N ha⁻¹ e 25/75 kg N ha⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente.

Tratamentos	Aveia preta	Milho	Trigo	Soja	Centeio
-----Cópias 16S rRNA g ⁻¹ de solo-----					
Inoculação					
Com BPCV	2,33E+09	8,17E+09	1,61E+09	2,18E+09	8,98E+08
Sem BPCV	2,56E+09	8,72E+09	1,69E+09	2,69E+09	8,35E+08
C.V. (%) parcelas	15,27	14,07	12,08	40,97	12,72
Nitrogênio em cobertura					
0 N	2,37E+09	7,71E+09	1,56E+09	2,11E+09	8,79E+08
Baixo N	2,58E+09	8,49E+09	1,66E+09	2,58E+09	8,09E+08
Alto N	2,40E+09	9,13E+09	1,73E+09	2,61E+09	9,12E+08
C.V. (%) subparcelas	27,61	30,83	12,48	17,12	16,21
-----Nível de significância-----					
Inoculação (I)	ns	ns	ns	ns	ns
Nitrogênio (N)	ns	ns	ns	ns	ns
Interação I x N	ns	ns	ns	ns	ns

Notas: ns: não significativo; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Figura 24 - Análise de componentes principais gerado a partir do número de cópias do gene 16S rRNA, dos atributos químicos do solo e da produtividade do milho, trigo e soja. S: enxofre; K: potássio; P: fósforo; H+Al: acidez potencial; Nareia/ Careia: nitrogênio e carbono disponível, respectivamente; Mg: magnésio; Ca: cálcio; prodmilho/ prodtrigo/ prodsoja: produtividade milho, trigo e soja, respectivamente; Blackoat16S/ Maize16S/ Wheat16S/ Soybean16S/ Rye 16S: número de cópias do gene 16S rRNA no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio, respectivamente.



Número de cópias do gene *nifH*

A abundância do gene *nifH*, gene chave no processo de fixação de N, variou entre as cinco culturas (Figura 25). A soja apresentou o maior número de cópias com valores na ordem de 10^8 em todos os tratamentos. A aveia preta, a soja e o centeio foram as culturas mais estáveis, com valores na ordem de $10^7 - 10^8$ cópias *nifH* g^{-1} de solo. As culturas do milho e do trigo tiveram o comportamento mais variável entre os tratamentos, respondendo de forma diferente à inoculação e à adubação nitrogenada.

O número de cópias do gene *nifH* contabilizado na aveia preta provavelmente reflete o efeito residual da cultura antecessora, a soja, já que a aveia preta não recebeu adubação nitrogenada em cobertura e nem inoculação com BPCV. Embora a análise de variância (Tabela 14) não tenha apontado diferenças significativas entre os tratamentos, o desdobramento das interações (Tabela 15) evidenciou que nas doses 0 N e alto N, o número de cópias foi maior com a inoculação do que sem, efeito que pode ser melhor observado na transformação dos dados em valores relativos do gene, em comparação como número total de cópias de 16S rRNA (Figura 26A).

Figura 25 - Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com BPCV no número de cópias do gene *nifH*. As doses de Baixo/Alto N correspondem a 80/240 kg N ha⁻¹; 40/120 kg N ha⁻¹ e 25/75 kg N ha⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente. Aveia preta e centeio não receberam doses extras de N por serem culturas de cobertura de inverno. Com: inoculação com *A. brasilense* nas culturas de milho e trigo ou co-inoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum* na cultura da soja. Sem: sem inoculação. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre as culturas e letras minúsculas, entre os tratamentos dentro de cada cultura (Tukey $p < 0,05$).

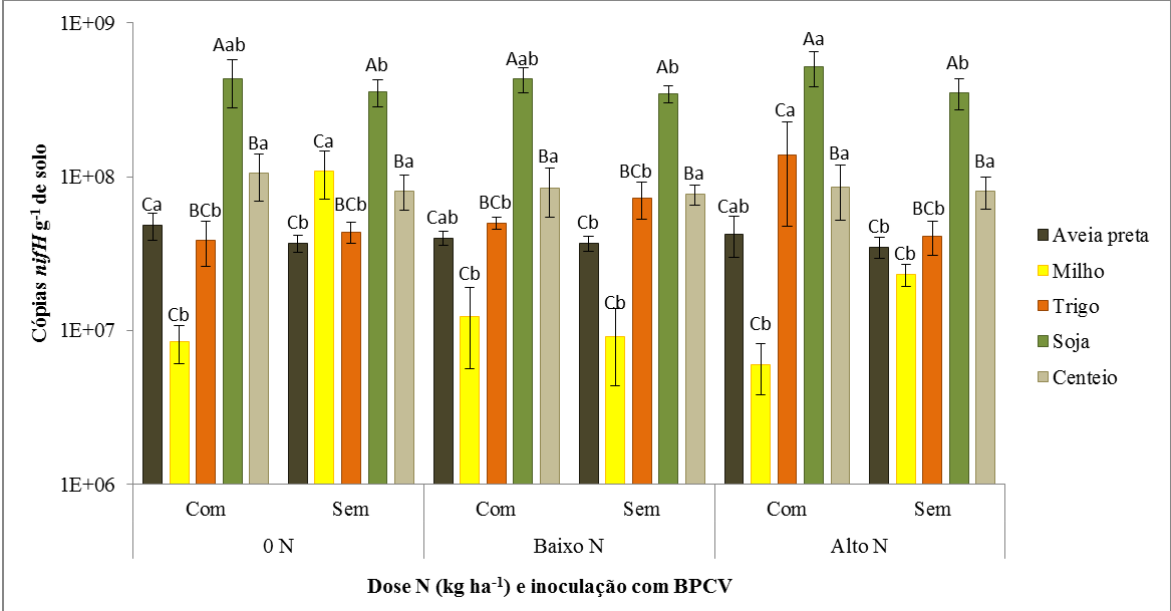


Figura 26 - Valores relativos do gene *nifH* em comparação ao número total de cópias do gene 16S rRNA. A) Aveia preta, B) Milho, C) Trigo, D) Soja e E) Centeio.

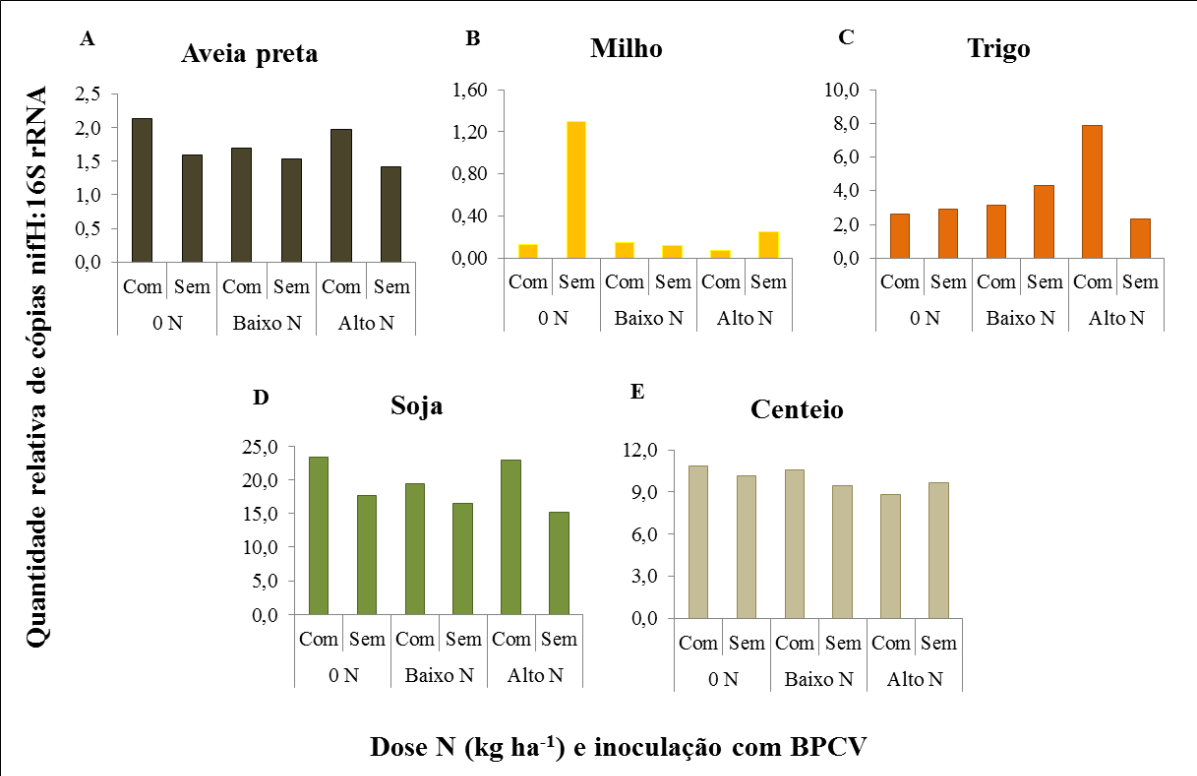


Tabela 14 - Análise de variância para o número de cópias do gene *nifH* no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio. As doses de Baixo/Alto N correspondem a 80/240 kg N ha⁻¹; 40/120 kg N ha⁻¹ e 25/75 kg N ha⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente.

Tratamentos	Aveia preta	Milho	Trigo	Soja	Centeio
-----Cópias <i>nifH</i> g ⁻¹ de solo-----					
Inoculação					
Com BPCV	4,34E+07	8,89E+06	7,53E+07	4,60E+08	9,17E+07
Sem BPCV	3,61E+07	4,70E+07	5,23E+07	3,51E+08	7,94E+07
C.V. (%) parcelas	14,92	29,09	63,49	24,14	24,26
Nitrogênio em cobertura					
0 N	4,24E+07	5,86E+07	4,11E+07	3,93E+08	9,31E+07
BaixoN	3,83E+07	1,07E+07	6,11E+07	3,87E+08	8,04E+07
Alto N	3,85E+07	1,45E+07	8,92E+07	4,36E+08	8,30E+07
C.V. (%) subparcelas	9,41	33,54	64,87	13,42	16,06
-----Nível de significância-----					
Inoculação (I)	ns	**	ns	ns	ns
Nitrogênio (N)	ns	**	ns	ns	ns
Interação I x N	ns	**	ns	ns	ns

Notas: ns: não significativo; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Tabela 15 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura da aveia preta, considerando o efeito residual da inoculação com BPCV e da adubação nitrogenada realizadas na cultura antecessora.

Tratamentos	Nitrogênio em cobertura ⁺		
	-----kg N ha ⁻¹ -----		
Inoculação	0	Baixo	Alto
Com BPCV	4,81E+07a	3,98E+07a	4,23E+07a
Sem BPCV	3,67E+07b	3,67E+07a	3,47E+07b
Efeito	**	ns	*

Notas: ns: não significativo; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

⁺ Não foram adicionadas doses de nitrogênio na aveia preta, as doses aplicadas na cultura antecessora, a soja, foram 25 e 75 kg N ha⁻¹. Todas as parcelas receberam inoculação com *B. japonicum*; as parcelas nomeadas Com BPCV foram coinoculadas *B. japonicum* + *A. brasilense*.

O milho foi a cultura que apresentou as quantificações mais heterogêneas entre os tratamentos, com uma variação entre 10⁶ e 10⁸ cópias de *nifH* g⁻¹ solo (Figura 25) e com valores relativos baixos, entre 0,13% e 1,30% em comparação ao valor aproximado de bactérias totais (Figura 26B). O número de cópias mais alto foi observado nas parcelas que não receberam nitrogênio e nem inoculação com *A. brasilense*. Esse resultado indica que no milho, cultura que recebe as doses mais altas de N, a comunidade de bactérias diazotróficas é negativamente influenciada tanto pela adubação nitrogenada como pela inoculação com *A. brasilense* ($p < 0,01$) (Tabela 14 e Tabela 16).

Tabela 16 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura do milho, considerando a inoculação com *A. brasilense* e três doses de nitrogênio.

Tratamentos	Nitrogênio em cobertura		
	kg N ha ⁻¹		
Inoculação	0	80	240
Com <i>A. brasilense</i>	8,40E+06b	1,23E+07a	6,00E+06a
Sem <i>A. brasilense</i>	1,09E+08a	9,13E+06a	2,30E+07a
Efeito	**	ns	ns

Notas: ns: não significativo; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Para a cultura trigo foi observada uma variação entre 10^7 e 10^8 cópias *nifH* g⁻¹ de solo (Figura 25), apresentando valores relativos altos do gene, entre 2,3% e 7,87% em comparação com o número total cópias do gene 16S rRNA (Figura 26C), sendo que os valores mais altos foram observados nas parcelas que receberam a maior dose de nitrogênio (120 kg N ha⁻¹) e inoculação com *A. brasilense*. Não houve diferença significativa entre os diferentes tratamentos (Tabela 14), porém, no desdobramento das interações (Tabela 17), o tratamento com *A. brasilense* na dose alta se destacou em relação ao tratamento sem inoculação na mesma dose de nitrogênio ($p < 0,05$). Os resultados indicam que a adubação nitrogenada não afetou negativamente o número de cópias de *nifH*.

Tabela 17 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura do trigo, considerando a inoculação com *A. brasilense* e três doses de nitrogênio.

Tratamentos	Nitrogênio em cobertura		
	kg N ha ⁻¹		
Inoculação	0	40	120
Com <i>A. brasilense</i>	3,85E+07a	5,01E+07a	1,37E+08a
Sem <i>A. brasilense</i>	4,37E+07a	7,21E+07a	4,10E+07b
Efeito	ns	ns	*

Notas: ns: não significativo; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

O número de cópias de *nifH* encontrado na cultura da soja se manteve na ordem de 10^8 cópias g⁻¹ de solo em todos os tratamentos (Figura 25), apresentando os valores relativos mais altos das cinco culturas analisadas (Figura 26D), com variação entre 15,24% e 23,29% em comparação com o valor aproximado de bactérias totais. Lembrando que todas as parcelas receberam inoculação com *B. japonicum*. Os resultados evidenciam que a inoculação com *B. japonicum* tem um aporte muito significativo na comunidade de bactérias diazotróficas do solo, já que o valor mais baixo (15,24%) supera todos os valores relativos encontrados nas outras quatro culturas. Embora não tenha havido diferença estatística significativa entre os tratamentos (Tabela 14), o desdobramento das interações entre os tratamentos evidenciou que

na dose alta de nitrogênio (75 kg N ha⁻¹) com co-inoculação, o número de cópias de *nifH* foi mais alto ($p<0,05$) (Tabela 18). Essa resposta indica que a adubação nitrogenada não impacta negativamente a população de bactérias diazotróficas no solo da soja, e que a co-inoculação contribui com o aumento no número de cópias do gene.

Tabela 18 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura da soja, considerando a coinoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum* nas parcelas identificadas com BPCV e três doses de nitrogênio.

Tratamentos	Nitrogênio em cobertura		
	kg N ha ⁻¹		
Inoculação	0	25	75
Com BPCV	4,32E+08a	4,30E+08a	5,19E+08a
Sem BPCV	3,54E+08a	3,44E+08a	3,54E+08b
Efeito	ns	ns	**

Notas: ns: não significativo; ** $p<0,01$; * $p<0,05$. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Na cultura do centeio foram observados valores na ordem de $10^7 - 10^8$ cópias de *nifH* g⁻¹ de solo (Figura 25). Em comparação com o número total de cópias de 16S rRNA, os valores relativos de *nifH* foram altos, variando entre 8% e 10% (Figura 26E), representando, depois da soja, a maior população de bactérias diazotróficas na rotação de culturas estudada. Devido ao centeio ser uma cultura de cobertura de inverno, não recebeu adubação nitrogenada nem inoculação, o que indica que os resultados obtidos são produto do efeito residual da cultura antecessora, a soja. Nenhum dos tratamentos apresentou diferença estatística (Tabela 14) mesmo quando foi realizado o desdobramento da interação dos tratamentos.

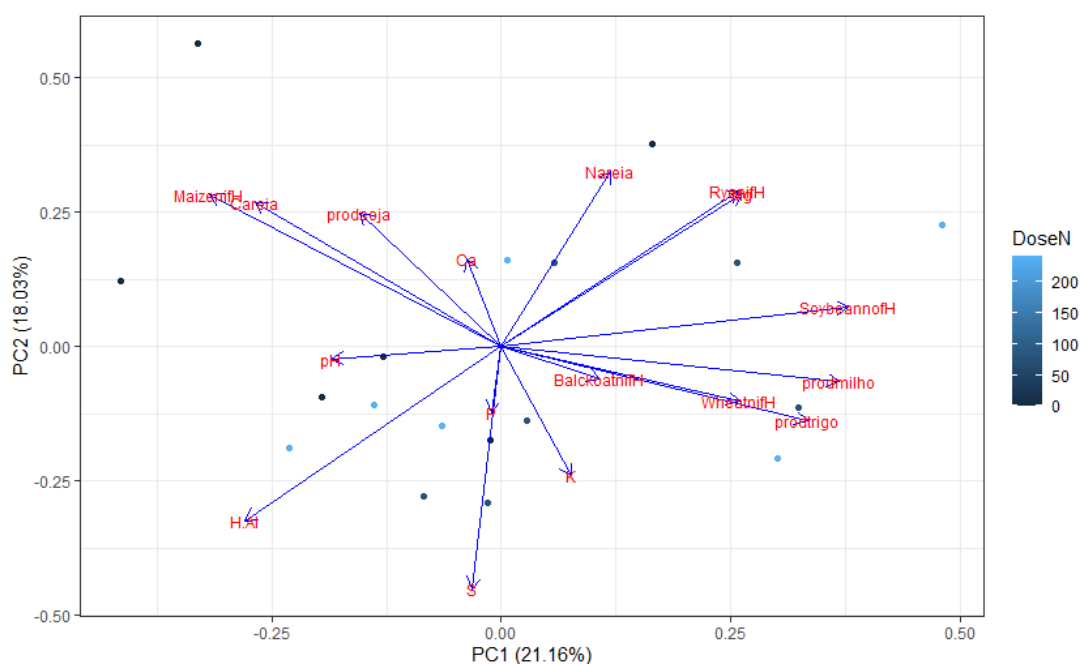
A análise de componentes principais incluindo os atributos químicos do solo e o número de cópias do gene *nifH* (Figura 27) para as cinco culturas estudadas, explicou 39,19% da variação dos dados. Foi observado que o carbono lábil (C-areia) esteve relacionado com o número de cópias do gene no milho. Para a cultura do trigo, a abundância do gene esteve relacionada com a produtividade de grãos e, para a cultura do centeio, o número de cópias foi influenciado pelo teor de magnésio presente no solo.

Número de cópias do gene *nosZ*

A quantificação do gene *nosZ* (Figura 28), gene chave na etapa final da desnitrificação, variou entre 10^5 e 10^7 cópias g⁻¹ de solo. A cultura com valores mais heterogêneos foi a soja. Os valores observados nas outras quatro culturas tiveram um comportamento mais homogêneo em todos os tratamentos (Figura 28). O centeio foi a cultura que apresentou o número de cópias mais elevado, na ordem de 10^7 cópias g⁻¹ de solo, e a aveia preta, o milho e

o trigo tiveram os valores mais baixos, não ultrapassando 10^6 cópias g^{-1} de solo. Os valores relativos do gene *nosZ* em comparação com o número aproximado de bactérias totais foi muito baixo (Figura 29), abaixo de 1% para aveia preta, milho trigo e soja, contrário ao observado no centeio, onde os valores variaram entre 3,23 % e 4,49%.

Figura 27 - Análise de componentes principais gerado a partir do número de cópias do gene *nifH*, dos atributos químicos do solo e da produtividade do milho, trigo e soja. S: enxofre; K: potássio; P: fósforo; H+Al: acidez potencial; Nareia e Careia: nitrogênio e carbono disponível, respectivamente; Mg: magnésio; Ca: cálcio; prodmilho/ prodtrigo/ prodsoja: produtividade milho, trigo e soja, respectivamente; BlackoatniH/ MaizeniH/ WheatnifH/ SoybeannifH/ RyenifH: número de cópias do gene *nifH* no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio, respectivamente.



Para as culturas da aveia preta, milho e trigo não houve diferença estatística entre os diferentes tratamentos (Tabela 19). Na soja, a co-inoculação ($p < 0,05$) e a adubação nitrogenada ($p < 0,01$) impactaram o número de cópias do gene *nosZ*. O desdobramento da interação entre os tratamentos (Tabela 20) evidenciou que tanto a adubação nitrogenada como a co-inoculação contribuíram para o aumento no número de cópias do gene ($p < 0,01$).

Embora o número de cópias do gene tenha sido homogêneo entre os diferentes tratamentos na cultura do centeio (Tabela 19) e não exista um aparente efeito residual da cultura da soja, o desdobramento dos tratamentos (Tabela 21) evidenciou que nas parcelas sem adição de N e com co-inoculação na soja, o número de cópias foi mais alto ($p < 0,01$) (Tabela 21).

Figura 28 - Efeito da adubação nitrogenada e da inoculação com BPCV no número de cópias do gene *nosZ*. As doses de N Baixo/Alto correspondem a 80/240 kg N ha⁻¹; 40/120 kg N ha⁻¹ e 25/75 kg N ha⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente. Aveia preta e centeio não receberam doses extras de N por serem culturas de cobertura de inverno. Com: inoculação com *A. brasilense* nas culturas de milho e trigo ou co-inoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum* na cultura da soja. Sem: sem inoculação. Letras maiúsculas diferentes apresentam diferenças estatísticas entre as culturas e letras minúsculas entre os tratamentos dentro de cada cultura (Tukey $p < 0,05$).

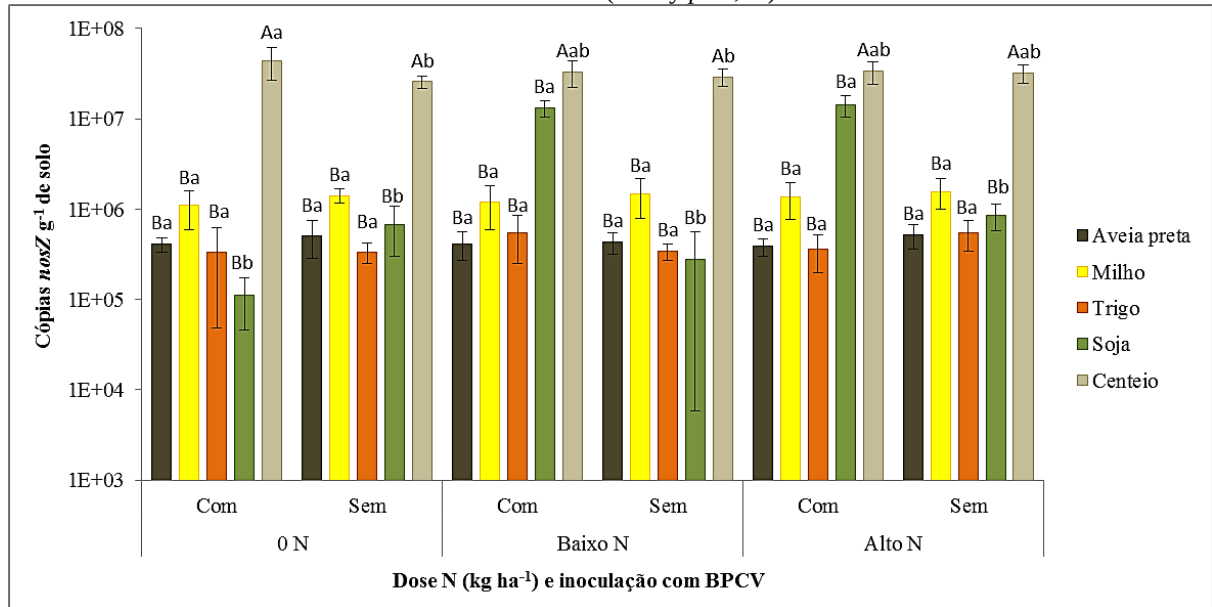
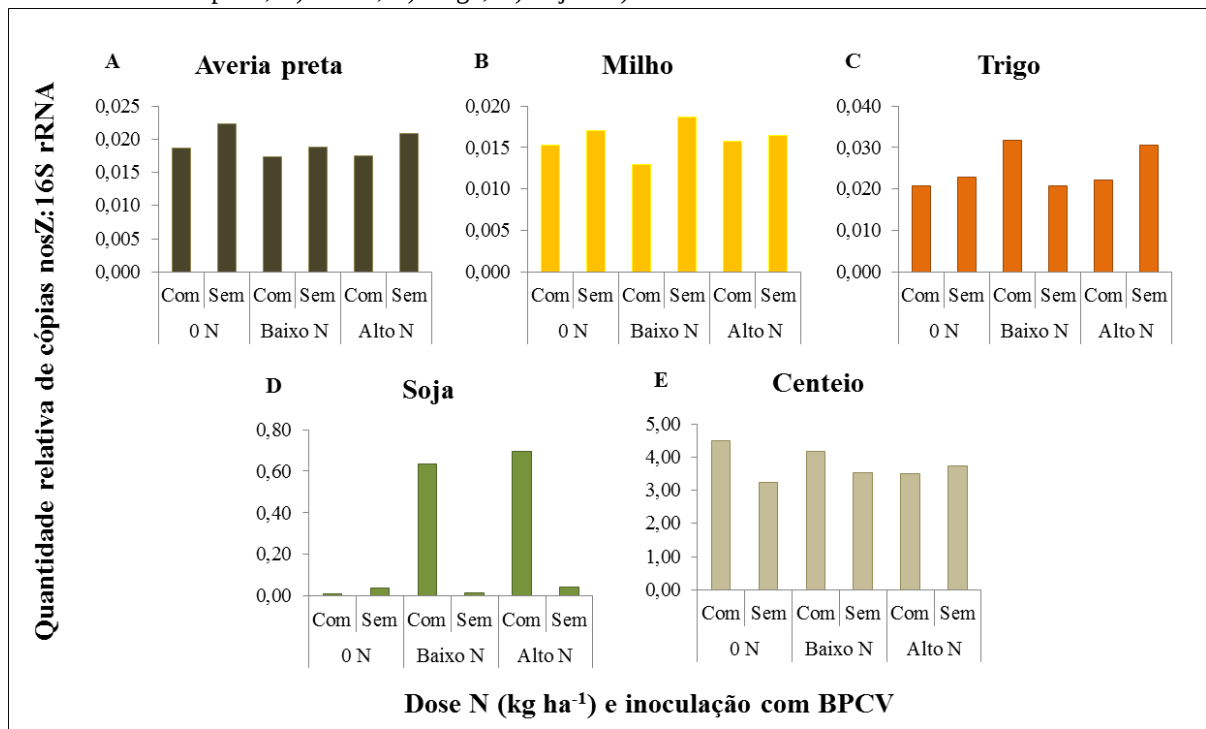


Figura 29 - Valores relativos do gene *nosZ* em comparação ao número total de cópias do gene 16S rRNA. A) Aveia preta, B) Milho, C) Trigo, D) Soja e E) Centeio.



A análise de componentes principais incluindo os atributos químicos do solo (Tabela 7) e o número de cópias do gene *nosZ* explicou 37,7% da variação dos resultados (Figura 30). Os

teores de magnésio e cálcio junto com o nitrogênio lábil (N-areia) exibiram relação positiva com o número de cópias do gene nas culturas do centeio e do trigo. O número de cópias de *nosZ* na cultura do milho apresentou uma relação negativa com o pH e o fósforo.

Tabela 19 - Análise de variância para o número de cópias do gene *nosZ* no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio. As doses de N Baixo/Alto correspondem a 80/240 kg ha⁻¹; 40/120 kg ha⁻¹ e 25/75 kg ha⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente.

Tratamentos	Aveia preta	Milho	Trigo	Soja	Centeio
-----Cópias <i>nosZ</i> g ⁻¹ de solo-----					
Inoculação					
Com BPCV	4,03E+05	1,23E+06	4,13E+05	9,14E+06	3,70E+07
Sem BPCV	4,88E+05	1,49E+06	4,07E+05	6,06E+05	2,90E+07
C.V. (%) parcelas	15,16	46,99	69,49	60,58	33,13
Nitrogênio em cobertura					
0 N	4,60E+05	1,26E+06	3,33E+05	3,97E+05	3,50E+07
BaixoN	4,25E+05	1,35E+06	4,45E+05	6,70E+06	3,12E+07
Alto N	4,51E+05	1,47E+06	4,53E+05	7,52E+06	3,28E+07
C.V. (%) subparcelas	30,24	40,65	50,71	31,13	20,14
-----Nível de significância-----					
Inoculação (I)	ns	ns	ns	*	ns
Nitrogênio (N)	ns	ns	ns	**	ns
Interação I x N	ns	ns	ns	**	ns

Notas: ns: não significativo; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Tabela 20 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura da soja, considerando a coinoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum* nas parcelas identificadas com BPCV e três doses de nitrogênio.

Tratamentos	Nitrogênio em cobertura		
	-----kg N ha ⁻¹ -----		
Inoculação	0	25	75
Com BPCV	1,11E+05a	1,31E+07a	1,42E+07a
Sem BPCV	6,84E+05a	2,81E+05b	8,53E+05b
Efeito	ns	**	**

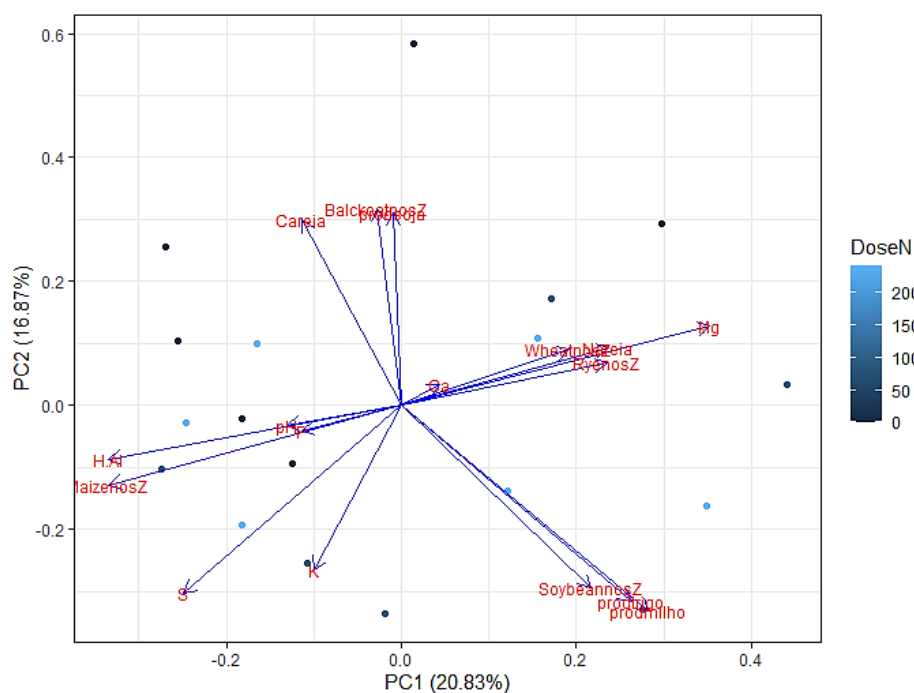
Notas: ns: não significativo; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Tabela 21 - Desdobramento da interação dos tratamentos para a cultura do centeio, considerando o efeito residual da soja referente à coinoculação com *A. brasilense* + *B. japonicum* nas parcelas identificadas com BPCV e três doses de nitrogênio.

Tratamentos	Nitrogênio em cobertura		
	-----kg N ha ⁻¹ -----		
Inoculação	0	25	75
Com BPCV	4,42E+07a	3,31E+07a	3,36E+07a
Sem BPCV	2,57E+07b	2,93E+07a	3,19E+07a
Efeito	**	ns	ns

Notas: ns: não significativo; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey.

Figura 30 - Análise de componentes principais gerado a partir do número de cópias do gene *nosZ*, dos atributos químicos do solo e da produtividade do milho, trigo e soja. S: enxofre; K: potássio; P: fósforo; H+Al: acidez potencial; Nareia/ Careia: nitrogênio e carbono disponível, respectivamente; Mg: magnésio; Ca: cálcio; prodmilho/ prodtrigo/ prodsoja: produtividade milho, trigo e soja, respectivamente; BlackoatnosZ/ MaizenosZ/ WheatnosZ/ SoybeanosZ/ RyenosZ: número de cópias do gene *nifH* no solo não rizosférico das culturas da aveia preta, milho, trigo, soja e centeio, respectivamente.



3.3.3.3 Produtividade de grãos de milho, trigo e soja

As produtividades de grãos de milho e soja não apresentaram diferenças significativas entre as diferentes doses nitrogênio e a inoculação com *A. brasilense* dentro de cada cultura (Tabela 22). A produtividade de grãos de trigo foi mais alta quando inoculado com *A. brasilense* e com adição da dose baixa de nitrogênio (40 kg ha⁻¹).

Tabela 22 - Produtividade do milho, trigo e soja em resposta à inoculação com BPCV e à adubação nitrogenada. As doses de N Baixo/Alto correspondem a 80/240 kg ha⁻¹; 40/120 kg ha⁻¹ e 25/75 kg ha⁻¹ para milho, trigo e soja respectivamente.

Tratamentos		Milho	Trigo	Soja
Inoculação com BPCV	Dose N	-----Produtividade (kg ha ⁻¹) -----		
Com BPCV	0	10.001,30a	3.118,66c	3.394,30a
	Baixo	13.865,81a	4.259,03a	3.285,20a
	Alto	13.755,89a	3.700,26b	3.221,86a
Sem BPCV	0	10.755,13a	2.789,18c	3.581,39a
	Baixo	12.734,31a	3.730,09b	2.970,03a
	Alto	11.977,26a	3.655,71b	3.779,93a

Notas: Letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

3.3.4 Discussão

Tradicionalmente é assumido que a adubação nitrogenada impacta negativamente a comunidade de microrganismos no solo, principalmente as bactérias, reduzindo o número total de cópias do gene 16S rRNA (WANG et al., 2019). No entanto, a abundância de 16S rRNA nas cinco culturas analisadas não foi afetada pelas diferentes doses de N-ureia aplicadas em cobertura, exibindo um comportamento completamente oposto. No milho, cultura que recebeu as maiores doses de nitrogênio, também foi obtido o maior número de cópias de 16S rRNA, e no centeio que não recebeu adubação nitrogenada, foi obtido o menor número (Figura 23). Apesar dessas diferenças em termos de abundância, a diversidade e a composição da comunidade bacteriana não foram afetadas, como mostrado no capítulo 2.

3.3.4.1 A adubação nitrogenada e a inoculação com BPCV impacta de forma diferente a abundância de *nifH* e *nosZ*

De modo geral, os valores de *nifH* encontrados no presente experimento foram altos (Figura 25) quando comparados com registros prévios encontrados na literatura. Mao et al. (2011) e Bouffaud et al. (2016) reportaram valores na ordem de 10^7 cópias g^{-1} de solo para a cultura do milho. Já, para a cultura do trigo, Reardon et al. (2014) registraram valores entre 10^6 e 10^7 cópias g^{-1} de solo e Bouffaud et al. (2016) registraram valores na ordem de 10^7 cópias g^{-1} de solo.

Contrariamente ao observado para o *nifH*, o número de cópias de *nosZ* foi baixo no presente estudo (Figura 28) em comparação com os resultados de outras pesquisas. Mao et al. (2011) registraram valores na ordem de 10^9 cópias g^{-1} de solo na cultura do milho. Waghmode et al. (2018) encontraram valores na ordem de 10^8 cópias g^{-1} de solo em um experimento de aquecimento em um sistema agrícola, em profundidades de 5-20 cm. Yang et al. (2018) encontraram valores na ordem de 10^8 cópias g^{-1} de solo em um sistema com irrigação.

A resposta da comunidade microbiana à adubação nitrogenada em sistemas de rotação de longa duração, como a área onde este estudo foi realizado, depende do tipo de adubação (fertilizantes orgânicos ou minerais) e de fatores ambientais (HAI et al., 2009; GEISSELER; SCOW, 2014; SUN et al., 2015). O uso de fertilizantes nitrogenados impacta de forma diferente a abundância de genes envolvidos na ciclagem do nitrogênio. O *nifH*, por exemplo, não varia com a adição de nitrogênio, enquanto o *nosZ* pode aumentar até 75% (OUYANG et

al., 2018) devido aos fertilizantes nitrogenados promoverem a atividade da comunidade de desnitrificadores em solos agrícolas (PHILIPPOT; HALLIN; SCHLOTTER, 2007).

Os resultados do presente estudo evidenciaram que o número de cópias de *nifH* foi sim negativamente afetado pela adição de nitrogênio no milho (Tabela 16), enquanto no trigo teve um efeito positivo (Tabela 17). A resposta nas duas culturas pode ter sido influenciada pela exsudação radicular em cada cultura. Embora não tenha sido avaliado o solo rizosférico, é sabido que os exsudatos radiculares são o principal mecanismo que direciona o comportamento dos microrganismos rizosféricos que participam no ciclo do nitrogênio, mais do que outras características físico-químicas (SCHMIDT et al., 2019). A relação entre a abundância de *nifH* no milho com o carbono de maior labilidade (C-areia) (Figura 27) sugere que a população de bactérias diazotróficas no milho é influenciada por diferentes fontes de carbono, dentre elas, possivelmente os exsudatos radiculares.

A adubação nitrogenada também não gerou um aumento no número de cópias de *nosZ* nas culturas de aveia preta, milho e trigo (Tabela 19). Embora na soja tenha causado um aumento (Tabela 20), sugere-se que a inoculação com BPCV foi o fator que mais influenciou no aumento da abundância do gene. Tal efeito pode ser melhor observado na cultura do centeio, em que os valores relativos de *nosZ* foram os mais altos (Figura 29E), produto do efeito residual da inoculação e co-inoculação na soja. Tanto *B. japonicum* como *A. brasilense* carregam o gene *nosZ* no genoma; assim, os resíduos orgânicos em decomposição presentes no solo no momento em que foi realizada a coleta do centeio, contribuíram com o número de cópias de *nosZ*. Essa mesma afirmação se aplica para a abundância de *nifH* no centeio, com valores relativos altos (Figura 26E), já que tanto *A. brasilense* como *B. japonicum* têm a capacidade de fixar nitrogênio, ou seja, carregam o gene *nifH* no genoma.

Os resultados da abundância de *nifH* e *nosZ* na rotação das cinco culturas analisadas são insuficientes para inferir sobre o comportamento dos diferentes grupos envolvidos na ciclagem do nitrogênio na área de estudo. Apesar disso, são um primeiro avanço para sugerir que existe um alto potencial para a fixação biológica do nitrogênio (FBN) e que as taxas de desnitrificação poderiam ser baixas. Esse comportamento uniforme da abundância dos genes *nifH* e *nosZ*, e da composição bacteriana (discutida no capítulo 2), sugere que a comunidade bacteriana do solo responde à homogeneidade dos atributos químicos e da fertilidade do solo, construída ao longo dos 36 anos de histórico de plantio direto na área.

3.3.4.2 O plantio direto contribui com a abundância de *nifH* e *nosZ*

Práticas mais conservacionistas como o plantio direto têm sido adotadas no Brasil durante os últimos 40 anos. Embora seja uma prática cada vez mais comum, ainda se conhece pouco sobre o seu impacto nas comunidades microbianas do solo. A rotação de culturas e o uso de culturas de cobertura, além dos benefícios para o solo, direciona a abundância de determinadas populações bacterianas no solo, uma vez que as raízes das plantas representam *hotspots* ricos em diferentes fontes de carbono que contribuem para a seleção de bactérias rizosféricas a partir da comunidade não rizosférica (FAN et al., 2017).

A rotação de culturas em comparação com os sistemas de monocultura tem um efeito positivo na abundância de diferentes genes envolvidos no ciclo do nitrogênio (OUYANG et al., 2018), uma vez que os sistemas de rotação, principalmente os que incluem culturas de cobertura, contribuem para o aumento do estoque de carbono orgânico, do nitrogênio total e da biomassa microbiana (MCDANIEL; TIEMANN; GRANDY, 2014).

Os resultados da abundância de *nifH* na aveia preta e no centeio são chave para evidenciar a importância do uso de culturas de cobertura em sistemas de rotação e a sua contribuição com a fixação biológica do nitrogênio (FBN). Estudos em gramíneas para produção de grãos como milho, arroz e trigo evidenciaram que a FBN contribuiu com 13, 22 e 13 kg N ha⁻¹ respectivamente (LADHA et al., 2016). Embora no presente trabalho não tenha sido avaliada a expressão do gene *nifH*, os valores absolutos do gene indicam que existe um alto potencial para a FBN.

O entendimento dos diferentes fatores que influenciam o comportamento da comunidade microbiana em sistemas de rotação de culturas são fundamentais para aumentar a produtividade fazendo uso de práticas mais conservacionistas (HARTMAN et al., 2018). Os resultados preliminares do presente estudo evidenciaram que a produtividade do trigo esteve relacionada com o número de 16S rRNA e de *nifH* (Figuras 24 e 27, respectivamente). De modo geral, a produtividade do milho, do trigo e da soja (Tabela 22) foi alta quando comparada com a produtividade média dessas culturas no Brasil, 5564 kg ha⁻¹, 2644 kg ha⁻¹ e 3522 kg ha⁻¹ para milho, trigo e soja, respectivamente (CONAB, 2020).

3.3.4.3 Os cátions Ca^{+2} e Mg^{+2} influenciaram na abundância de 16S rRNA, *nifH* e *nosZ*

O cálcio e o magnésio são nutrientes que atuam como co-fatores em diferentes processos celulares e estão presentes em diferentes componentes estruturais das células

(NICOLITCH et al., 2019). Em concentrações adequadas, esses nutrientes estão positivamente correlacionados com a abundância de diferentes filos no solo, tais como Acidobacteria, Actinobacteria, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Nitrospirae, e Proteobacteria (ZHANG et al., 2020).

Como observado na análise de componentes principais, o número de cópias de 16S rRNA na soja (Figura 24) e o número de cópias de *nifH* no centeio (Figura 27) foram positivamente relacionados com os teores de magnésio no solo. Tal comportamento se deve ao fato de o magnésio apresentar um papel fundamental no processo de fixação biológica do nitrogênio em rizóbios, pois baixas concentrações comprometem o processo de nodulação (KISS; STEFANOVITS-BÁNYAI; TAKÁCS-HÁJOS, 2004). Os valores relativos de *nifH* na soja e no centeio (Figura 26D-E) evidenciaram que os teores de magnésio presentes na área de estudo (Tabela 7) foram suficientes para promover a fixação nitrogenada na soja. Adicionalmente, o magnésio participa diretamente nos processos de mobilização do ferro (NICOLITCH et al., 2019), nutriente essencial para o funcionamento da enzima nitrogenase (HARRIS et al., 2018).

O número de cópias de *nosZ* no trigo e no centeio também esteve positivamente relacionado com os teores de cálcio e magnésio no solo (Figura 30). Pelos valores relativos de *nifH* no centeio, associados ao efeito residual da cultura da soja e influenciados pela inoculação com BPCV, é possível confirmar o efeito do magnésio nos valores relativos de *nosZ* no centeio (Figura 29E), devido às bactérias inoculadas, *A. brasilense* e *B. japonicum*, possuírem tanto o gene *nifH* como *nosZ* nos genomas.

3.3.5 Conclusões

O número de cópias dos genes 16S rRNA, *nifH* e *nosZ* respondeu de forma diferente à inoculação com BPCV e à adubação nitrogenada nas cinco culturas analisadas. O efeito dos tratamentos foi mais notório no milho e no trigo, nas quais altas doses de nitrogênio e inoculação com *A. brasilense* diminuíram o número de cópias de *nifH* no milho e o aumentaram no trigo.

Foi comprovada a importância da rotação de culturas e do uso de culturas de cobertura de inverno para manter um equilíbrio no número de cópias do gene *nifH* e *nosZ* e na produtividade das culturas associada aos genes estudados. Os resultados podem contribuir para o desenho de estratégias que permitam um melhor aproveitamento dos nutrientes aplicados, bem como a redução das doses de nitrogênio, visto que o sistema plantio direto de

longa duração bem manejado possui a fertilidade e o microbioma necessários para garantir altos rendimentos de grãos.

Os nutrientes nitrogênio, fósforo e potássio são nobres na adubação e suas concentrações no solo são melhor compreendidas devido ao vasto número de trabalhos no tema. Contudo, nutrientes secundários na adubação como cálcio e magnésio são menos entendidos, e pouco se conhece sobre sua relação com o microbioma do solo. Os resultados apresentados demonstraram de forma preliminar que o magnésio é fundamental para a comunidade microbiana no sistema de rotação estudado.

3.3.6 Perspectivas para Futuras Pesquisas

Visto que os valores absolutos dos genes estudados variaram para cada cultura, é importante conhecer a abundância de outros genes que participam no ciclo do nitrogênio, tais como *nirK*, *nirS*, *norB*, *amoA*, para um melhor entendimento do comportamento de cada gene e sua resposta aos tratamentos culturais ou ao efeito residual. Uma análise mais aprofundada sobre os diferentes genes que participam no ciclo do nitrogênio permitirá correlacionar os dados com a composição da comunidade microbiana e será de grande importância para ajudar a definir doses adequadas de nitrogênio em cobertura, evitando assim perdas por lixiviação, evaporação ou escoamento que, além de contaminar o ambiente, incrementa gastos com o manejo nas culturas.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, G. Chemotaxis in *Azospirillum*. In: CASSÁN, F.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (Eds.). . **Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols**. [s.l.] Springer, 2015. p. 514.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.
- AMBROSINI, A.; DE SOUZA, R.; PASSAGLIA, L. M. P. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. **Plant and Soil**, p. 193–207, 2015.
- ANDREOTE, F. D. et al. The Brazilian Soil Microbiome. In: PYLRO, V. S.; ROESCH, L. (Eds.). . **The Brazilian Microbiome**. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 21–39.
- ANPII. **Estatísticas** – ANPII. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 17 dez. 2020.
- ANPII. **Estatísticas** . Disponível em: <http://www.anpii.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 26 out. 2019.
- ARAUJO, C. S. **A evolução da produção de inoculantes no Brasil – Anpii**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/a-evolucao-da-producao-de-inoculantes-no-brasil/>. Acesso em: 23 abr. 2019.
- ARAUJO, C. S. **Como o Brasil se tornou líder mundial no uso de inoculantes – Anpii**. Disponível em: <http://www.anpii.org.br/como-o-brasil-se-tornou-lider-mundial-no-uso-de-inoculantes/>. Acesso em: 23 abr. 2019.
- BABUJIA, L. C. et al. Impact of long-term cropping of glyphosate-resistant transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] on soil microbiome. **Transgenic Research**, v. 25, n. 4, p. 425–440, 2016.
- BAKKER, M. G. et al. Impacts of bulk soil microbial community structure on rhizosphere microbiomes of *Zea mays*. **Plant Soil**, v. 392, p. 115–126, mar. 2015.
- BAKKER, P. A. H. M. et al. The rhizosphere revisited: Root microbiomics. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 165, 30 maio 2013.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants : special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.
- BANERJEE, S.; SCHLAEPPI, K.; A HEIJDEN, M. G. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. **Nature Reviews Microbiology**, 2018.
- BASHAN, Y. et al. Survival of *Azospirillum brasilense* in the Bulk Soil and Rhizosphere of 23 Soil Types. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 5, p. 1938–45, 1995.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Inoculant Preparation and Formulations for *Azospirillum* spp. In: CASSÁN, F.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (Eds.). . **The Handbook of Azospirillum**. [s.l.] Springer International Publishing Switzerland, 2015.

BASHAN, Y.; DE BASHAN, L. How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth — A Critical Assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, n. 10, p. 77–136, 2010.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Can. J. Microbiol.**, v. 43, p. 103–121, 1997.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521–577, ago. 2004.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; LUZ, E. *Azospirillum* -plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997 – 2003). **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 8, p. 521–577, 2004.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 936–944, 1989.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Can. J. Microbiol.**, v. 36, p. 591–608, 1990.

BEIER, S.; BERTILSSON, S. Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 149, 14 jun. 2013.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D36–D42, 2013.

BERKELMANN, D. et al. Unravelling the effects of tropical land use conversion on the soil microbiome. **Environmental Microbiome**, v. 15, p. 5, 2020.

BINI, A. R. **Adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* para a produção de milho e trigo em sistema plantio direto**. [s.l.] Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2015.

BOLYEN, E. et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 852–857, ago. 2019.

BOTTINI, R. et al. Identification of gibberellins A1, A3, and Iso-A3 in cultures of *azospirillum lipoferum*. **Plant Physiology**, v. 90, n. 1, p. 45–47, 1 maio 1989.

BOUFFAUD, M. et al. Is plant evolutionary history impacting recruitment of diazotrophs and nifH expression in the rhizosphere? **Nature Publishing Group**, n. November 2015, p. 1–9, 2016.

BRAKER, G.; CONRAD, R. Diversity, Structure, and Size of N₂O-Producing Microbial Communities in Soils—What Matters for Their Functioning? **Advances in Applied Microbiology**, v. 75, p. 33–70, 1 jan. 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa N° 13 de 24 de Março de 2011**. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2018/19 a 2028/29 projeções de longo prazo**. Brasília, MAPA/ACE, 2019.

BRU, D. et al. Determinants of the distribution of nitrogen-cycling microbial communities at

the landscape scale. **ISME Journal**, v. 5, n. 3, p. 532–542, 2011.

BRU, D.; MARTIN-LAURENT, F.; PHILIPPOT, L. Quantification of the detrimental effect of a single primer-template mismatch by real-time PCR using the 16S rRNA gene as an example. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1660–1663, 2008.

BRUNET, R. C.; GARCIA-GIL, L. J. Sulfide-induced dissimilatory nitrate reduction to ammonia in anaerobic freshwater sediments. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 21, n. 2, p. 131–138, 1 out. 1996.

BUCKLEY, D. H. et al. Diversity of Planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4522–4531, jul. 2006.

BURDMAN, S.; OKON, Y.; JURKEVITCH, E. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 91–110, 2000.

BURNS, M. J. et al. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. **BMC Biotechnology**, v. 5, n. 31, p. 1–13, 2005.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines : M inimum I nformation for Publication of Q uantitative Real-Time PCR E xperiments. **Clinical Chemistry**, v. 622, p. 611–622, 2009.

CABALLERO-MELLADO, J.; LÓPEZ-REYES, L.; BUSTILLOS-CRISTALES, R. Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 178, n. 2, p. 283–288, 1999.

CALDWELL, A. C. et al. Prokaryotic diversity in the rhizosphere of organic, intensive, and transitional coffee farms in Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–18, 2015.

CALLAHAN, B. J. et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. **Nature Methods**, v. 13, p. 581–583, maio 2016.

CALLBECK, C. M. et al. Improving PCR efficiency for accurate quantification of 16S rRNA genes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 93, n. 2, p. 148–152, 2013.

CANTARELLA, H.; PROCHNOW, L. I. Determinação de sulfato em solos. In: RAIJ, B. VAN et al. (Eds.). . **Análise Química para Avaliação da Fertilidade de Solos Tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. p. 225–230.

CAPORASO, J. G. et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **ISME Journal**, v. 6, n. 8, p. 1621–1624, 8 ago. 2012.

CARDOZO, A. M. **Inoculação de *Azospirillum brasilense*: efeito sobre crescimento de *Zea mays* em solo não estéril e quantificação de DNA bacteriano**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

CARES, J. E.; HUANG, S. P. Soil nematodes. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNALL, D. E. (Eds.). **A handbook of tropical soil biology: sampling and characterization of below-ground biodiversity**. [s.l.: s.n.], p. 97–106.

CASSÁN, F. et al. Producción de fitohormonas por *Azospirillum* sp. Aspectos fisiológicos y

tecnológicos de la promoción del crecimiento vegetal. In: CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. (Ed.) **Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 61-86.

CASSÁN, F. et al. Everything you must know about Azospirillum and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v. 56, p. 461–479, 8 maio 2020.

CASSÁN, F.; DÍAZ-ZORITA, M. Azospirillum sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 103, p. 117–130, 2016.

CASSÁN, F.; VANDERLEYDEN, J.; SPAEPEN, S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus Azospirillum. **J Plant Growth Regul**, v. 33, p. 440–459, 2014.

CATANI, R. A.; KÜPPER, A. Algumas características químicas dos solos do estado de São Paulo e sua interpretação analítica. **Bragantia**, v. 6, n. 4, p. 147–163, 1946.

CEDERLUND, H. et al. Soil carbon quality and nitrogen fertilization structure bacterial communities with predictable responses of major bacterial phyla. **Applied Soil Ecology**, v. 84, p. 62–68, 2014.

CHÁVEZ-ROMERO, Y. et al. 16S metagenomics reveals changes in the soil bacterial community driven by soil organic C, N-fertilizer and tillage-crop residue management. **Soil and Tillage Research**, v. 159, p. 1–8, 1 jun. 2016.

COELHO, M. R. R. et al. Molecular detection and quantification of nifH gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer. **Applied Soil Ecology**, v. 42, n. 1, p. 48–53, 2009.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira 2018/2019. v. 6, n. sexto levantamento, p. 145, 2019.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira 2020/21**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>.

CONAB, C. N. DE A. **Acompanhamento da safra brasileira 2019/20v.7 N.12. Décimo segundo levantamento setembro 2020**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>.

CORREA, O. S. et al. Azospirillum brasilense-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F. D.; DE SALAMONE, I. G. (Eds.). **Azospirillum sp. : cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina**. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p. 87–96.

COSKUN, D. et al. How Plant Root Exudates Shape the Nitrogen Cycle. **Trends in Plant Science**, v. xx, p. 1–13, 2017.

COTTA, M. S. **Monitoramento de estirpes de Azospirillum brasilense inoculado em culturas de milho**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2015.

COUILLEROT, O. et al. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain Azospirillum lipoferum CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298–2305, 2010a.

COUILLEROT, O. et al. Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 528–538, fev. 2010b.

D'HAENE, B.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. **Methods**, v. 50, n. 4, p. 262–270, 2010.

DA COSTA, P. B. et al. Invasion ecology applied to inoculation of plant growth promoting bacteria through a novel SIMPER-PCA approach. **Plant and Soil**, v. 422, n. 1–2, p. 467–478, 1 jan. 2018.

DA SILVA, L. J. **Package 'laercio'**, 2015.

DE MEDIBURU, F. **Package 'agricolae'**, 2019.

DE SOUZA, R.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n. 4, p. 401–419, 2015.

DE SOUZA, R. S. C. et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–15, 2016.

DEBRUYN, J. M. et al. Global biogeography and quantitative seasonal dynamics of Gemmatimonadetes in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 17, p. 6295–6300, 1 set. 2011.

DELAMUTA, J. R. M. et al. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 63, n. Pt 9, p. 3342–3351, 1 set. 2013.

DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. **Science**, v. 325, p. 320–325, 2018.

DÍAZ-ZORITA, M.; MICUCCI, F. G.; FERNÁNDEZ-CANIGIA, M. V. Field performance of a seed treatment with *Azospirillum brasilense* on corn productivity. In: PEREZ, J. C.; SOLER, A. J.; POSADA, U. L. F. (Eds.). **9th International and 1st Latinamerican PGPR Workshop. "Returning to Our Roots". Quirama, Medellín (Colombia)**. Medellín: [s.n.].

DING, G. et al. Changes of Soil Bacterial Diversity as a Consequence of Agricultural Land Use in a Semi-Arid Ecosystem. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

DINI-ANDREOTE, F. et al. Bacterial soil community in a Brazilian sugarcane field. **Plant and Soil**, v. 336, n. 1, p. 337–349, 2010.

DINI-ANDREOTE, F. et al. Bacterial Genomes: Habitat Specificity and Uncharted Organisms. **Microbial Ecology**, v. 64, p. 1–7, 2012.

DÖBBEREINER, J.; DUQUE, F. F. Contribuição da pesquisa em fixação biológica de nitrogênio para o desenvolvimento do Brasil. **R. Econ. Rural**, v. 18, n. 3, p. 447–460, 1980.

DÖBBEREINER, J.; ANDRADE, V. O.; BALDANI, V. L. **Protocolos para Preparo de Meios de Cultura da Embrapa Agrobiologia**. Seropedica, RJ: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/624371/1/doc110.pdf>>. Acesso em: 7

nov. 2018.

DOS SANTOS, M. DE S. et al. Bacterial Structure of Agricultural Soils with High and Low Yields. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 08, n. 04, 2017.

DU JARDIN, P. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 3-14, 2015

DURRER, A. et al. The drivers underlying biogeographical patterns of bacterial communities in soils under sugarcane cultivation. **Applied Soil Ecology**, v. 110, p. 12–20, 2017.

EADY, R. R. Structure–Function Relationships of Alternative Nitrogenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 3013–3030, jan. 1996.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **História - Embrapa Agrobiologia**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agrobiologia/historia>. Acesso em: 18 dez. 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de métodos de análise do solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

ENRICO, J. M. et al. Biological nitrogen fixation in field pea and vetch: Response to inoculation and residual effect on maize in the Pampean region. **European Journal of Agronomy**, v. 115, p. 126016, 1 abr. 2020.

ESTRADA-BONILLA, G. A.; DURRER, A.; CARDOSO, E. J. B. N. Use of compost and phosphate-solubilizing bacteria affect sugarcane mineral nutrition , phosphorus availability , and the soil bacterial community. **Applied Soil Ecology**, v. 157, p. 103760, 2021.

FALEIRO, A. C. et al. Real time PCR detection targeting nifA gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, v. 61, p. 125–133, 2013.

FAN, K. et al. Rhizosphere-associated bacterial network structure and spatial distribution differ significantly from bulk soil in wheat crop fields. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 113, p. 275–284, 2017.

FAN, K. et al. Soil pH correlates with the co-occurrence and assemblage process of diazotrophic communities in rhizosphere and bulk soils of wheat fields. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 121, p. 185–192, 1 jun. 2018.

FELD, L. et al. Pesticide Side Effects in an Agricultural Soil Ecosystem as Measured by amoA Expression Quantification and Bacterial Diversity Changes. **Plos One** p. 1–21, 2015.

FENG, M. et al. Long-term fertilization influences community assembly processes of soil diazotrophs. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 126, p. 151–158, 1 nov. 2018.

FIERER, N. et al. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 7, p. 4117–4120, 2005.

FIERER, N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, p. 579–590, 2017.

FIERER, N.; BRADFORD, M.; JACKSON, R. B. Toward an ecological classification of soil

bacteria. **Mathematische Zeitschrift**, v. 292, n. 3–4, p. 923–935, 2007.

FLORIO, A. et al. Soil C and N statuses determine the effect of maize inoculation by plant growth-promoting rhizobacteria on nitrifying and denitrifying communities. **Scientific Reports**, v. 7, p. 8411, set. 2017.

FOLEY, J. A. et al. Solutions for a cultivated planet. **Nature**, v. 478, p. 6, 2011.

FONTOURA, S. M. V.; BAYER, C. Adubação nitrogenada para alto rendimento de milho em plantio direto na região centro-sul do Paraná. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 33, p. 1721–1732, 2009.

GANS, J.; WOLINSKY, M.; DUNBAR, J. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. **Science**, v. 309, n. 5739, p. 1387–1390, ago. 2005.

GARBEVA, P.; VEEN, J. A.; ELSAS, J. D. Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 47, n. 1, p. 51–64, 15 jan. 2004.

GE, Y. et al. Long-term fertilization regimes affect bacterial community structure and diversity of an agricultural soil in northern China. **Journal of Soils and Sediments**, v. 8, n. 1, p. 43–50, 21 fev. 2008.

GEISSELER, D.; SCOW, K. M. Long-term effects of mineral fertilizers on soil microorganisms – A review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 75, p. 54–63, 2014.

GENBANK. **16S rRNA - Nucleotide**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/?term=16S+rRNA>. Acesso em: 9 jan. 2021.

GONÇALVES, D. R. P. et al. Soil type and texture impacts on soil organic carbon storage in a sub-tropical agro-ecosystem. **Geoderma**, v. 286, p. 88–97, 2017.

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age : ten years of next- generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, p. 333–351, 2016.

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

GUERRERO-MOLINA, M. F.; WINIK, B. C.; PEDRAZA, R. O. More than rhizosphere colonization of strawberry plants by *Azospirillum brasilense*. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 205–212, 2012.

HAGEMANN, N.; HARTER, J.; BEHRENS, S. Elucidating the Impacts of Biochar Applications on Nitrogen Cycling Microbial Communities. In: RALEBITSO-SENIOR, T. K.; ORR, H. C. (Eds.). **Biochar Application**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 163–198.

HAI, B. et al. Quantification of Key Genes Steering the Microbial Nitrogen Cycle in the Rhizosphere of Sorghum Cultivars in Tropical Agroecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 4993–5000, 2009.

HALPERN, M. et al. The Use of Biostimulants for Enhancing Nutrient Uptake. **Advances in**

Agronomy, v. 130, p. 141–174, 2015.

HARRIS, D. F. et al. Mechanism of N₂ Reduction Catalyzed by Fe-Nitrogenase Involves Reductive Elimination of H₂. **Biochemistry**, v. 57, n. 5, p. 701–710, 6 fev. 2018.

HARTMAN, K. et al. Cropping practices manipulate abundance patterns of root and soil microbiome members paving the way to smart farming. **Microbiome**, v. 6, p. 14, 16 dez. 2018.

HENRY, S. et al. Quantification of denitrifying bacteria in soils by nirK gene targeted real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 59, n. 3, p. 327–335, 2004.

HENRY, S. et al. Quantitative detection of the nosZ gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, narG, nirK, and nosZ genes in soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5181–5189, 2006.

HIGUCHI, R. et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplifications reactions. **Biotechnology**, v. 11, p. 1026–1030, 1993.

HUNGRIA, M. **Inoculação com Azospirillum brasilense: inovação em rendimento a baixo custo** Documentos. EMBRAPA, Doc. 325, 2011.

HUNGRIA, M.; 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.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean Seed Co-Inoculation with Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 6, p. 811–817, 2015.

JACK, C. N. et al. Microbial Inoculants: Silver Bullet or Microbial Jurassic Park? **Trends in Microbiology**, v. In Press, 10 dez. 2020.

JANSSEN, P. H. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1719–1728, 1 mar. 2006.

JESUS, E. C. et al. Changes in land use alter the structure of bacterial communities in Western Amazon soils. **The ISME Journal**, v. 3, p. 1004–1011, 2009.

JETTEN, M. S. M. et al. Description of the order Brocadiales. In: KRIEG, N. R. et al. (Eds.). . **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. vol. 4 ed. Heidelberg: Springer, 2010. p. 506–603.

JOHNSTON-MONJE, D. et al. Bacterial populations in juvenile maize rhizospheres originate from both seed and soil. **Plant and Soil**, v. 405, n. 1–2, p. 337–355, 2016.

JONES, C. M. et al. Recently identified microbial guild mediates soil N₂O sink capacity. **Nature Climate Change**, v. 4, n. 9, p. 801–805, 2014.

KAMINSKY, L. M. et al. The Inherent Conflicts in Developing Soil Microbial Inoculants. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 140–151, 1 fev. 2019.

KARTAL, B. et al. Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. **Nature**, v. 479, n. 7371, p. 127–130, out. 2011.

- KAURIN, A. et al. Consequences of minimum soil tillage on abiotic soil properties and composition of microbial communities in a shallow Cambisol originated from fluvioglacial deposits. **Biology and Fertility of Soils**, v. 51, p. 923–933, jul. 2015.
- KEMNITZ, D.; KOLB, S.; CONRAD, R. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. **FEMS Microbiol Ecol**, v. 60, n. 3, p. 442–448, 2007.
- KISS, S. A.; STEFANOVITS-BÁNYAI, E.; TAKÁCS-HÁJOS, M. Magnesium-Content of Rhizobium Nodules in Different Plants: The Importance of Magnesium in Nitrogen-Fixation of Nodules. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 751S-753S, 1 dez. 2004.
- KLOOS, K. et al. Denitrification within the genus *Azospirillum* and other associative bacteria. **Aust. J. Plant Physiol**, v. 28, p. 991–998, 2001.
- KONSTANTINIDIS, K. T.; ROSSELLÓ-MÓRARA, R. Classifying the uncultivated microbial majority: A place for metagenomic data in the Candidatus proposal. **Systematic and applied microbiology**, v. 38, p. 223–230, 2015.
- KRAMER, S. et al. Resource partitioning between bacteria, fungi, and protists in the detritusphere of an agricultural soil. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1524, 26 set. 2016.
- KRUSKAL, W. H.; WALLIS, W. A. Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. **Journal of the American Statistical Association**, v. 47, n. 260, p. 621, dez. 1952.
- KUYPERS, M. M. M.; MARCHANT, H. K.; KARTAL, B. The microbial nitrogen-cycling network. **Nature Reviews Microbiology**, 2018.
- LADHA, J. K. et al. Global nitrogen budgets in cereals: A 50-year assessment for maize, rice, and wheat production systems. **Scientific Reports**, v. 6, p. 19355, 18 jan. 2016.
- LAMMEL, D. R. et al. Specific microbial gene abundances and soil parameters contribute to C, N, and greenhouse gas process rates after land use change in Southern Amazonian Soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1057, 2015.
- LAND, M. et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. **Funct Integr Genomics**, v. 15, p. 141–161, 2015.
- LAUBER, C. L. et al. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5111–5120, 2009.
- LEININGER, S. et al. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. **Nature**, v. 442, n. 17, p. 806–809, 2006.
- LEVY-BOOTH, D. J.; WINDER, R. S. Quantification of nitrogen reductase and nitrite reductase genes in soil of thinned and clear-cut douglas-fir stands by using real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 21, p. 7116–7125, 2010.
- LI, R. et al. Pyrosequencing Reveals the Influence of Organic and Conventional Farming Systems on Bacterial Communities. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e51897, 19 dez. 2012.
- LIU, J. et al. Diversity and distribution patterns of acidobacterial communities in the black soil zone of northeast China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 95, p. 212–222, 1 abr. 2016.

LIU, L. et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. ID 251364, 2012.

MAO, Y.; YANNARELL, A. C.; MACKIE, R. I. Changes in N-Transforming Archaea and Bacteria in Soil during the Establishment of Bioenergy Crops. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 2–3, 2011.

MAWARDA, P. C. et al. Deliberate introduction of invisible invaders: A critical appraisal of the impact of microbial inoculants on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, p. 107874, jun. 2020.

MCDANIEL, M. D.; TIEMANN, L. K.; GRANDY, A. S. Does agricultural crop diversity enhance soil microbial biomass and organic matter dynamics? A meta-analysis. **Ecological Applications**, v. 24, n. 3, p. 560–570, 1 abr. 2014.

MENDES, L. W. et al. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **ISME Journal**, v. 8, n. 8, p. 1577–1587, 2014.

MENDES, L. W. et al. Influence of resistance breeding in common bean on rhizosphere microbiome composition and function. **ISME Journal**, v. 12, p. 212–224, 1 out. 2018.

MENDES, R. et al. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. **Science**, v. 332, n. 6033, p. 1097–1100, 2011.

MERLOTI, L. F. et al. Forest-to-agriculture conversion in Amazon drives soil microbial communities and N-cycle. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 137, p. 107567, 2019.

MMA. **Fourth National Report to the Convention on Biological Diversity: Brazil**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <https://www.cbd.int/doc/world/br/br-nr-04-en.pdf>. Acesso em: 9 jan. 2021

MOTERLE, L. M. et al. GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE PLÂNTULAS DE CULTIVARES DE MILHO-PIPOCA SUBMETIDAS AO ESTRESSE HÍDRICO E SALINO. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 169–176, 2006.

NAVARRETE, A. A. et al. Soil microbiome responses to the short-term effects of Amazonian deforestation. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 10, p. 2433–2448, 2015.

NCBI. **Genome list - Prokaryotes**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse#!/prokaryotes/>. Acesso em: 9 jan. 2021.

NICOLITCH, O. et al. A microcosm approach highlights the response of soil mineral weathering bacterial communities to an increase of K and Mg availability. **Scientific Reports**, v. 9, p. 14403, 1 dez. 2019.

NOLAN, T.; HANDS, R. E.; BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1559–1582, 2006.

OKANO, Y. et al. Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1008–1016, 2004.

OKON, Y.; ITZIGSOHN, R. The Development of Azospirillum as a commercial inoculant for improving crop yields. **Biotechnology Advances**, v. 13, n. 3, p. 415–424, 1995.

OKON, Y.; KAPULNIK, Y. Development and function of Azospirillum-inoculated roots. **Plant and Soil**, v. 90, p. 3–16, 1986.

ONA, O. et al. The effect of pH on indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis of Azospirillum brasilense sp7. **Symbiosis**, v. 35, p. 199–208, 2003.

ORR, C. H. et al. Diversity and activity of free-living nitrogen-fixing bacteria and total bacteria in organic and conventionally managed soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 911–919, 2011.

OUYANG, Y. et al. Effect of nitrogen fertilization on the abundance of nitrogen cycling genes in agricultural soils : A meta-analysis of field studies. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 127, n. August, p. 71–78, 2018.

PAVAN, M. A. et al. Manual de análise química de solo e controle de qualidade. **Londrina, Instituto Agronômico do Paraná**, p. 38, 1992.

PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of Azospirillum brasilense by nifA and ntr (gln) type gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, n. 1, p. 95–101, 1 jun. 1984.

PEEL, M. C.; FINLAYSON, B. L.; MCMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v. 11, n. 5, p. 1633–1644, 11 out. 2007.

PEREG, L.; DE BASHAN, L.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of Azospirillum for plants. **Plant and Soil**, v. 399, p. 389–414, 2016.

PEREG, L.; MCMILLAN, M. Molecular Tools to Study Azospirillum sp. and Other Related Plant Growth Promoting Rhizobacteria. In: CASSÁN, F.; OKON, Y.; CREUS, C. M. (Eds.). . **Handbook for Azospirillum: Technical Issues and Protocols**. [s.l.] Springer, 2015.

PERRIG, D. et al. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of Azospirillum brasilense, and implications for inoculant formulation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 75, n. 5, p. 1143–1150.

PERSHINA, E. et al. Comparative analysis of prokaryotic communities associated with organic and conventional farming systems. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0145072.

PHILIPPOT, L. et al. Spatial patterns of bacterial taxa in nature reflect ecological traits of deep branches of the 16S rRNA bacterial tree. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 3096–3104, 2009.

PHILIPPOT, L.; HALLIN, S.; SCHLOTTER, M. Ecology of Denitrifying Prokaryotes in Agricultural Soil. In: **Advances in Agronomy**. [s.l.: s.n.]. v. 96p. 249–305.

PLACELLA, S. A.; FIRESTONE, M. K. Transcriptional Response of Nitrifying Communities to Wetting of Dry Soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 10, p. 3294–3302, 2013.

POLY, F. et al. First exploration of Nitrobacter diversity in soils by a PCR cloning-sequencing approach targeting functional gene nxrA. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 63, n. 1, p. 132–140, jan. 2008.

POLY, F.; MONROZIER, L. J.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Res. Microbiol**, v. 152, p. 95–103, 2001.

PYLRO, V. S. et al. Brazilian Microbiome Project: Revealing the Unexplored Microbial Diversity-Challenges and Prospects. **Microbial Ecology**, v. 67, n. 2, p. 237–241, 2014.

R CORE TEAM. **R: The R Project for Statistical Computing** ViennaR Foundation for Statistical Computing, , 2017. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 27 maio. 2020

RAMIREZ-VILLANUEVA, D. A. et al. Bacterial community structure in maize residue amended soil with contrasting management practices. **Applied Soil Ecology**, v. 90, p. 49–59, 1 jun. 2015.

RAMPELOTTO, P. H. et al. Changes in Diversity, Abundance, and Structure of Soil Bacterial Communities in Brazilian Savanna Under Different Land Use Systems. **Microbial Ecology**, v. 66, n. 3, p. 593–607, 2013.

REARDON, C. L.; GOLLANY, H. T.; WUEST, S. B. Diazotroph community structure and abundance in wheat-fallow and wheat-pea crop rotations. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 69, p. 406–412, 2014.

REGAN, K. et al. Soil Biology & Biochemistry Spatial and temporal dynamics of nitrogen fixing , nitrifying and denitrifying microbes in an unfertilized grassland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 109, p. 214–226, 2017.

REIS, V. M. **O inoculante para gramíneas**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/2099661/artigo-o-inoculante-para-gramineas>. Acesso em: 23 abr. 2019.

RODRIGUES, J. L. M. et al. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 3, p. 988–993, 15 jan. 2013.

RODRIGUEZ, H. et al. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552–555, 20 nov. 2004.

ROESCH, L. F. W. et al. Biogeography of diazotrophic bacteria in soils. **World J Microbiol Biotechnol** , v. 26, p. 1503–1508, fev. 2010.

ROSSMANN, M. et al. Multitrophic interactions in the rhizosphere microbiome of wheat : from bacteria and fungi to protists. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 96, n. 4, p. f1aa032, 2020.

ROTHAUWE, J.; WITZEL, K.; LIESACK, W. The Ammonia Monooxygenase Structural Gene amoA as a Functional Marker : Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. **Appl Environ Microbiol**, v. 63, n. 12, p. 4704–4712, 1997.

RUBIN, R. L.; GROENIGEN, K. J. VAN; HUNGATE, B. A. Plant growth promoting rhizobacteria are more effective under drought : a meta-analysis. **Plant and Soil**, p. 1–15, 2017.

RUIZ-RUEDA, O.; HALLIN, S.; BAÑERAS, L. Structure and function of denitrifying and

nitrifying bacterial communities in relation to the plant species in a constructed wetland. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, p. 308–319, 2009.

RUIZ DIAZ, D. A. et al. Evaluation of in-season nitrogen management strategies for corn production. **Agronomy Journal**, v. 100, n. 6, p. 1711–1719, 2008.

SÁ, J. C. DE M. et al. Soil-Specific Inventories of Landscape Carbon and Nitrogen Stocks under No-till and Native Vegetation to Estimate Carbon Offset in a Subtropical Ecosystem. **Soil Science Society of America Journal**, v. 77, n. 6, p. 2094–2110, 1 nov. 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTOS, A. R. S. et al. Labeled Azospirillum brasilense wild type and excretion-ammonium strains in association with barley roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 118, p. 422–426, 2017a.

SANTOS, H. G. ET AL. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. - Portal Embrapa**. [s.l.] EMBRAPA, 2018.

SANTOS, K. F. D. N. et al. Wheat colonization by an Azospirillum brasilense ammonium-excreting strain reveals upregulation of nitrogenase and superior plant growth promotion. **Plant and Soil**, v. 415, n. 1–2, p. 245–255, 2017b.

SATHYA, A.; VIJAYABHARATHI, R.; GOPALAKRISHNAN, S. Plant growth-promoting actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. **3 Biotech**, v. 7, n. 2, p. 102, 1 jun. 2017.

SCHLOSS, P. D. et al. Status of the Archaeal and Bacterial Census : an Update. **mBio**, v. 7, n. 3, p. e00201-16, 2016.

SCHLOTTER, M.; HARTMANN, A. Endophytic and surface colonization of wheat roots (*Triticum aestivum*) by different Azospirillum brasilense strains studied with strain-specific monoclonal antibodies. **Symbiosis**, v. 25, p. 159–179, 1998.

SCHMIDT, J. E. et al. Agricultural management and plant selection interactively affect rhizosphere microbial community structure and nitrogen cycling. **Microbiome**, v. 7, n. 1, p. 146, 7 nov. 2019.

SCHMIDT, R. et al. Long-term use of cover crops and no-till shift soil microbial community life strategies in agricultural soil. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0192953, 15 fev. 2018.

SELLSTEDT, A.; RICHAU, K. H. Aspects of nitrogen-fixing Actinobacteria, in particular free-living and symbiotic Frankia. **FEMS Microbiology Letters**, v. 342, n. 2, p. 179–186, 1 maio 2013.

SENGUPTA, A.; DICK, W. A. Bacterial Community Diversity in Soil Under two Tillage Practices as Determined by Pyrosequencing. **Microbial Ecology**, v. 70, p. 853–859, 1 maio 2015.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 10, p. 1135–1145, 2008.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. **History of Research on Nitrogen Fixation in Soybeans**

(1887-2018): extensively annotated bibliography and sourcebook. Lafayette, CA: Soyinfo Center, 2018.

SILVA, U. C. et al. Long-term rock phosphate fertilization impacts the microbial communities of maize rhizosphere. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–11, 2017.

SIMON, J.; KLOTZ, M. G. Diversity and evolution of bioenergetic systems involved in microbial nitrogen compound transformations. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1827, n. 2, p. 114–135, 1 fev. 2013.

SMITH, C. J.; OSBORN, A. M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n. 1, p. 6–20, 2009.

SOUZA, R. C. et al. Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. **Applied Soil Ecology**, v. 72, p. 49–61, 2013.

SOUZA, R. C. et al. Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: How fragile is the Brazilian Cerrado? **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 42, 2016.

STETS, M. I. et al. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 Bacteria in Wheat Roots by Strain-Specific Quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700–6709, 2015.

STRZELCZYK, E.; KAMPERT, M.; LI, C. Y. Cytokinin-like substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v. 149, n. 1, p. 55–60, 1 abr. 1994.

SUL, W. J. et al. Tropical agricultural land management influences on soil microbial communities through its effect on soil organic carbon. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 65, p. 33–38, 2013.

SULEIMAN, A. K. A. et al. Shifts in soil bacterial community after eight years of land-use change. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 137–144, 2013.

SULEIMAN, A. K. A. et al. Temporal variability of soil microbial communities after application of dicyandiamide-treated swine slurry and mineral fertilizers. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 97, p. 71–82, 2016.

SUN, R. et al. Effects of long-term application of chemical and organic fertilizers on the abundance of microbial communities involved in the nitrogen cycle. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 171–178, 2015.

SVEC, D. et al. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. **Biomolecular Detection and Quantification**, v. 3, p. 9–16, 2015.

TEIXEIRA, L. C. R. S.; YERGEAU, E. Quantification of Microorganisms Using a Functional Gene Approach. In: FILION, M. (Ed.). **Quantitative Real-time PCR in Applied Microbiology**. [s.l.] Caister Academic Press, 2012. p. 107–120.

THROBÄCK, I. N. et al. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, n. 3, p. 401–417, 2004.

TIEDJE, J. M. et al. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, v. 13, n. 2, p. 109–122, 1 out. 1999.

TIEN, T. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H. Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.) . **Applied and Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 1016–1024, 1979.

TILMAN, D. et al. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 50, p. 20260–20264, 13 dez. 2011.

TOJU, H. et al. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. **Nature Plants**, 2018.

TRABELSI, D. et al. Effect of on-field inoculation of *Phaseolus vulgaris* with rhizobia on soil bacterial communities. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 77, n. 1, p. 211–222, 1 jul. 2011.

TREUSCH, A. H. et al. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 1985–1995, 27 set. 2005.

TU, Q. et al. The Diversity and Co-occurrence Patterns of N₂-Fixing Communities in a CO₂-Enriched Grassland Ecosystem. **Microbial Ecology**, v. 71, p. 604–615, 1 ago. 2016.

URREA-VALENCIA, S. et al. Effects of nitrogen addition and bacterial inoculation on structure and composition of the bulk soil microbiome in a long-term continuous no-till system. **Manuscript in preparation**, 2020.

VACHERON, J. et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. September, p. 1–19, 2013.

VARGAS, M. A. T. et al. **Duas novas estirpes de rizóbio para a inoculação da Soja**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/549345/1/comtec62.pdf>. Acesso em: 6 nov. 2018.

VÁZQUEZ-BAEZA, Y. et al. EMPeror: A tool for visualizing high-throughput microbial community data. **GigaScience**, v. 2, n. 1, p. 16, nov. 2013.

VERMA, M.; MISHRA, J.; ARORA, N. K. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Diversity and Applications. In: SOBTI, R.; ARORA, N.; KOTHARI, R. (Eds.). . **Environmental Biotechnology: For Sustainable Future**. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 129–173.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571–586, 2003.

VĚTROVSKÝ, T.; BALDRIAN, P. The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. e57923, 27 fev. 2013.

VIEIRA, S. et al. Drivers of the composition of active rhizosphere bacterial communities in temperate grasslands. **ISME Journal**, v. 14, p. 463–475, 1 out. 2020.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. [s.l.]

International Biological Programme Handbook, 15, 1970.

WAGHMODE, T. R. et al. Response of nitrifier and denitrifier abundance and microbial community structure to experimental warming in an agricultural ecosystem. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 1–12, 2018.

WALKER, V. et al. Host plant secondary metabolite profiling shows a complex, strain-dependent response of maize to plant growth-promoting rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. **New Phytologist**, v. 189, n. 2, p. 494–506, 1 out. 2011.

WALTZ, E. A new crop of microbe startups raises big bucks, takes on the establishment. **Nature biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1120–1122, 2017.

WANG, C. et al. Impact of 25 years of inorganic fertilization on diazotrophic abundance and community structure in an acidic soil in southern China. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 113, p. 240–249, 2017a.

WANG, H. et al. Quantitative response relationships between net nitrogen transformation rates and nitrogen functional genes during artificial vegetation restoration following agricultural abandonment. **Scientific Reports**, n. 3, p. 1–8, 2017b.

WANG, Q. et al. Impact of 36 years of nitrogen fertilization on microbial community composition and soil carbon cycling-related enzyme activities in rhizospheres and bulk soils in northeast China. **Applied Soil Ecology**, v. 136, p. 148–157, 1 dez. 2019.

WANG, Z. et al. Conservation tillage increases soil bacterial diversity in the dryland of northern China. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 36, p. 1–9, 1 jun. 2016.

WIECZOREK, A. S. et al. Ecological Functions of Agricultural Soil Bacteria and Microeukaryotes in Chitin Degradation: A Case Study. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1293, 20 jun. 2019.

WU, Y. et al. PH is the primary determinant of the bacterial community structure in agricultural soils impacted by polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. **Scientific Reports**, v. 7, p. 40093, 4 jan. 2017.

YANG, Y. D. et al. Variations of the nirS-, nirK-, and nosZ-denitrifying bacterial communities in a northern Chinese soil as affected by different long-term irrigation regimes. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 14057–14067, 2018.

ZEHR, J. P. et al. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: A cross-system comparison. **Environmental Microbiology**. **Environ Microbiol.**, v.5, n. 7, p.539-554, 2003.

ZENG, J. et al. Nitrogen fertilization directly affects soil bacterial diversity and indirectly affects bacterial community composition. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 92, p. 41–49, 2016.

ZHALNINA, K. et al. Ca. nitrososphaera and bradyrhizobium are inversely correlated and related to agricultural practices in long-term field experiments. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, n. MAY, p. 1–13, 2013.

ZHANG, D. et al. The relationship between soil bacteria and metal nutrient availability for uptake of apple trees in Chinese orchards. **Plant Growth Regulation**, v. 92, p. 181–193, 1

nov. 2020.

ZHANG, N. N. et al. Effects of intercropping and Rhizobium inoculation on yield and rhizosphere bacterial community of faba bean (*Vicia faba* L.). **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, n. 6, p. 625–639, 17 jun. 2010.

ZHAO, Y. et al. Survey of dissimilatory nitrate reduction to ammonium microbial community at national wetland of Shanghai, China. **Chemosphere**, v. 250, p. 126195, 1 jul. 2020.