

Cepas de *Bacillus* e *Azospirillum* Aumentam o Crescimento e a Absorção de Nutrientes em Milho em Condições Hidropônicas



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Milho e Sorgo
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
184**

**Cepas de *Bacillus* e *Azospirillum* Aumentam
o Crescimento e a Absorção de Nutrientes
em Milho em Condições Hidropônicas**

Sylvia Morais de Sousa
Christiane Abreu de Oliveira
Daniele Luiz Andrade
Chainheny Gomes de Carvalho
Vitória Palhares Ribeiro
Maria Marta Pastina
Ivanildo Evódio Marriel
Ubiraci Gomes de Paula Lana
Eliane Aparecida Gomes

*Embrapa Milho e Sorgo
Sete Lagoas, MG
2018*

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo
Rod. MG 424 Km 45
Caixa Postal 151
CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
Fone: (31) 3027-1100
Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sa

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente
Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo
Elena Charlotte Landau

Membros
Antonio Claudio da Silva Barros, Cynthia Maria Borges Damasceno, Maria Lúcia Ferreira Simeone, Roberto dos Santos Trindade e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto
Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica
Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações
Tânia Mara Assunção Barbosa

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto da capa
Sylvia Moraes de Sousa

1ª edição
Formato digital (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Nome da unidade catalogadora

Cepas de *Bacillus* e *Azospirillum* aumentam o crescimento e a absorção de nutrientes em milho em condições hidropônicas / Sylvia Moraes de Sousa ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2018.
31 p. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 184).

1. *Zea mays*. 2. Bactéria. 3. Inoculação. I. Sousa, Sylvia Moraes de. II. Paiva, Christiane Abreu de Oliveira. III. Andrade, Daniele Luiz. IV. Carvalho, Chainheny Gomes de. V. Ribeiro, Vitória Palhares. VI. Pastina, Maria Marta. VII. Marriel, Ivanildo Evódio. VIII. Lana, Ubiraci Gomes de Paula. IX. Gomes, Eliane Aparecida. VII. Série.

CDD 633.15 (21. ed.)

Sumário

Resumo

Abstract

Introdução.....

Material e Métodos

Resultados e Discussão

Conclusões.....

Referências

Cepas de *Bacillus* e *Azospirillum* Aumentam o Crescimento e a Absorção de Nutrientes em Milho em Condições Hidropônicas

Sylvia Morais de Sousa¹
Christiane Abreu de Oliveira²
Daniele Luiz Andrade³
Chainheny Gomes de Carvalho⁴
Vitória Palhares Ribeiro⁵
Maria Marta Pastina⁶
Ivanildo Evódio Marriel⁷
Ubiraci Gomes de Paula Lana⁸
Eliane Aparecida Gomes⁹

Resumo – Microrganismos promotores de crescimento de plantas podem melhorar o rendimento e a qualidade das culturas e são essenciais para uma agricultura sustentável. Este trabalho teve como objetivo investigar o efeito de oito cepas bacterianas, inoculadas em diferentes concentrações, na promoção do crescimento de milho em solução nutritiva. A raiz de milho foi inoculada com cepas de *Bacillus* ou *Azospirillum* em concentrações que variaram de 10^5 a 10^8 unidades formadoras de colônia mL⁻¹ e cultivadas em hidroponia. Diferentes características de raiz, peso seco e teor de nutrientes foram avaliadas nas plântulas de milho, além da produção, *in vitro*, de ácido indol-acético (AIA) de cada cepa. As linhagens de *Bacillus* e *Azospirillum* na concentração adequada aumentaram o peso seco, a área de superfície radicular e o teor de nutrientes de milho. A análise de componentes principais

¹ Bióloga, DSc., Pesquisadora em Biologia Molecular da Embrapa Milho e Sorgo.

² Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo.

³ Bióloga, Mestranda em Biotecnologia e Gestão da Inovação da UNIFEMM.

⁴ Graduanda em Ciências Biológicas da UNIFEMM.

⁵ Bióloga, MSc. em Bioengenharia, Bolsista CNPq em Microbiologia na Embrapa Milho e Sorgo.

⁶ Eng.-Agrôn., Ph.D., Pesquisadora em Genética e melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo.

⁷ Eng.-Agrôn., D.Sc. em Biologia Celular, Pesquisador em Microbiologia da Embrapa Milho e Sorgo.

⁸ Químico, D.Sc. em Genética, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo.

⁹ Bióloga, DSc. em Genética, Pesquisadora em Microbiologia na Embrapa Milho e Sorgo.

dividiu os microrganismos em três grupos principais. Todas as estirpes que produziram AIA demonstraram um efeito positivo no crescimento das plantas, estimulando o alongamento das raízes. Concluindo, os resultados mostraram que a inoculação bacteriana, em concentração adequada, promoveu a absorção de nutrientes e o crescimento de plantas em solução nutritiva.

Termos para indexação: bactéria promotora de crescimento de plantas, bioestimulante, raiz, *Zea mays*.

Strains of *Bacillus* and *Azospirillum* Increase Growth and Nutrient Uptake in Maize under Hydroponic Conditions

Abstract – Plant growth-promoting microorganisms can improve crop yield and quality, and are key for a sustainable agricultural. This work aimed to investigate the effect of different bacterial strains and their ideal concentrations on promoting maize growth under nutrient solution. Maize root was inoculated with eight strains of *Bacillus* and *Azospirillum* at concentration of 10^5 - 10^7 colony-forming units mL^{-1} and grown in hydroponics. Several root traits, dry weight and nutrient content were measured in maize seedlings. Moreover, bacterial indole-3-acetic acid (IAA) *in vitro* production was evaluated. *Bacillus* and *Azospirillum* strains in proper concentration increased maize dry weight, root surface area, and maize nutrient content. Principal component analysis divided the microorganisms in three main groups. All strains that produced IAA demonstrated a positive effect on plant growth by stimulating root elongation. In conclusion, the results showed that bacterial inoculation, under the proper concentration, promoted nutrient uptake and plant growth under nutrient solution.

Index terms: plant growth promoting bacteria, biostimulant, root, *Zea mays*.

Introdução

O milho possui alta variabilidade genética, o que permite seu cultivo em climas tropicais, subtropicais e temperados. No entanto, os sistemas de produção atuais são altamente dependentes de insumos químicos, incluindo os fertilizantes, pesticidas e herbicidas, que aumentam o custo de produção e causam impacto ambiental, quando usados em excesso. Novas tecnologias têm sido desenvolvidas a cada ano com o objetivo de aumentar a produtividade, reduzir o impacto ambiental e promover a sustentabilidade com maior rentabilidade para os agricultores. Os microrganismos promotores de crescimento de plantas são alternativas atraentes e viáveis para aumentar

a produção agrícola e fazem parte de uma nova revolução verde (Calvo et al. 2014).

Inoculantes microbianos podem ser formulados com uma ou mais cepas de bactérias e/ou fungos, que podem ser de vida livre ou endofíticos isolados de vários ambientes, como solo, plantas, resíduos vegetais e água, e são geralmente aplicados a sementes ou rizosfera, estimulando os processos naturais de desenvolvimento das plantas (Calvo et al., 2014). A maioria dos inoculantes é composta por bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), que atuam direta ou indiretamente no ciclo biológico de nutrientes, na produção de hormônios e na defesa contra patógenos, o que pode levar ao aumento do crescimento vegetativo e radicular (Bashan et al., 2014; Calvo et al., 2014). Os gêneros *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia* e *Azotobacter* apresentam resultados promissores em diversas culturas de gramíneas, como milho, trigo, cana-de-açúcar, sorgo, forrageiras e arroz (Montañez et al., 2012; Calvo et al., 2014; Hungria et al., 2016).

Espécies de *Azospirillum* têm sido usadas como inoculantes em diferentes partes do mundo, inclusive no Brasil (Baldani; Baldani 2005; Fukami et al., 2018). Esses microrganismos são capazes de fixar nitrogênio atmosférico e produzir vários tipos de fito-hormônios, como auxinas, giberelinas e citocininas (Bashan; de-Bashan 2010; Cassán et al., 2014; Fukami et al., 2016). *Bacillus* podem influenciar o crescimento das plantas, aumentar a produção, solubilizar fosfato e potássio e proteger as plantas contra patógenos (Idriss et al., 2002; Wahyudi et al., 2011). Há evidências de que 80% dos microrganismos isolados da rizosfera de diferentes culturas têm a capacidade de produzir auxinas (AIA) usando metabólitos secundários (Chandra; Singh, 2016). Este fito-hormônio promove mudanças no controle do crescimento vegetativo em plantas (Gupta et al., 2015; Chandra; Singh, 2016) e pode levar ao aumento de volume, ramificação e comprimento da raiz, especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento (Cassán et al., 2014) proporcionando, conseqüentemente, maior acesso aos nutrientes do solo e à água.

Diferentes estudos indicam que existem concentrações bacterianas ótimas para que as BPCP tenham efeito positivo na germinação das sementes, no crescimento das plântulas e na morfologia das raízes (Cassán et al., 2009; Fallik et al., 1988; Fages, 1994; Puente et al., 2009), e que, dependendo da concentração de células, os efeitos podem ser inibidores (Fallik et al.,

1988; Arsac et al., 1990; Puente et al., 2009). Embora existam vários estudos sobre as BPCP, poucos trabalhos apresentam resultados detalhados sobre características radiculares no estágio de plântula. O estabelecimento de um sistema radicular robusto nos estágios iniciais de desenvolvimento das plantas pode levar a uma maior resistência a estresses bióticos e abióticos e maior produção de grãos. A hidroponia pode ser um método eficaz e rápido para a triagem de BPCP no estágio de plântula antes dos laboriosos experimentos de campo. Neste estudo, foi avaliado o potencial de cepas de *Azospirillum* e *Bacillus*, em diferentes concentrações, de promoverem o crescimento de plântulas de milho sob condições de hidroponia, além da avaliação da produção de AIA *in vitro* de cada cepa.

Material e Métodos

Cepas bacterianas

Foram utilizadas oito cepas bacterianas dos gêneros *Bacillus* e *Azospirillum*, em diferentes concentrações e a cepa C70, comum a todos os experimentos, como testemunha (Gomes et al., 2014), todas pertencentes à Coleção de Microrganismos Multifuncionais da Embrapa Milho e Sorgo. Um total de 17 tratamentos (Tabela 1), incluindo um inoculante comercial (SimbioseMaíz®) e um controle negativo (não inoculado), foi utilizado para analisar o efeito das cepas na promoção do crescimento do cultivar de milho L521236 da Embrapa Milho e Sorgo.

Preparação de inoculantes microbianos

Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura líquido TSB por três dias a 28 °C sob agitação constante. Após o período de incubação, as culturas foram centrifugadas durante 10 minutos a 6.000 rpm. As suspensões bacterianas foram ajustadas para obter uma concentração de 10^5 a 10^8 unidades formadoras de colônias mL⁻¹ (ufc mL⁻¹) após ressuspensão em solução salina - NaCl 0,85% (m/v). O produto comercial (SimbioseMaíz®) formulado com as cepas Ab-V5 e Ab-V6 de *Azospirillum brasilense* foi também diluído em solução salina para obtenção de 10^7 ufc mL⁻¹.

Tabela 1. Descrição de cepas, gêneros e concentração de células utilizados nos tratamentos com inoculantes microbianos.

Tratamento	Cepa	Gênero	Concentração (ufc mL ⁻¹)
Não inoculado	-	-	0
Testemunha (C70 10 ⁵)	C70	<i>Bacillus</i>	10 ⁵
Testemunha (C70 10 ⁷)	C70	<i>Bacillus</i>	10 ⁷
Testemunha (C70 10 ⁸)	C70	<i>Bacillus</i>	10 ⁸
B2084 10 ⁵	B2084	<i>Bacillus</i>	10 ⁵
B2084 10 ⁷	B2084	<i>Bacillus</i>	10 ⁷
B2084 10 ⁸	B2084	<i>Bacillus</i>	10 ⁸
B116 10 ⁷	B116	<i>Bacillus</i>	10 ⁷
B116 10 ⁸	B116	<i>Bacillus</i>	10 ⁸
B32 10 ⁷	B32	<i>Bacillus</i>	10 ⁷
B32 10 ⁸	B32	<i>Bacillus</i>	10 ⁸
B119 10 ⁷	B119	<i>Bacillus</i>	10 ⁷
B1920 10 ⁷	B1920	<i>Bacillus</i>	10 ⁷
A1626 10 ⁷	A1626	<i>Azospirillum</i>	10 ⁷
A2142 10 ⁷	A2142	<i>Azospirillum</i>	10 ⁷
A1630 10 ⁷	A1630	<i>Azospirillum</i>	10 ⁷
SimbioseMaíz®	SimbioseMaíz®	<i>Azospirillum</i>	10 ⁷

Cultivo de milho em condições de hidroponia

Dezessete tratamentos foram avaliados em seis diferentes experimentos hidropônicos desbalanceados com dois tratamentos comuns, o controle negativo e a testemunha, C70. Cada experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições, e cada parcela experimental foi composta por cinco plântulas de milho. As sementes de milho foram desinfestadas com hipoclorito de sódio a 0,5% (v/v) por cinco minutos, lavadas e imersas por quatro horas em água deionizada e transferidas para rolos de germinação. Após a germinação das sementes por três dias, plântulas uniformes foram transplantadas para bandejas contendo oito litros de solução nutritiva de ½ Hoagland pH 5,65 (Liu et al., 1998) e

mantidas para aclimatização por sete dias. Após a aclimatização, as raízes foram incubadas por seis horas em temperatura ambiente com a suspensão bacteriana, preparada conforme descrito anteriormente. No controle negativo, as plantas foram incubadas em solução salina. As bandejas com plântulas de milho foram manualmente agitadas em intervalos frequentes para facilitar o contato da bactéria com as raízes. Após o período de incubação, o excesso de inóculo foi removido e as plântulas foram incubadas em solução nutritiva. A solução nutritiva foi trocada a cada três dias e as plantas foram mantidas por mais dez dias em câmara de crescimento, com temperatura dia/noite controlada (27/20 °C) com fotoperíodo de 12 h e intensidade luminosa de 330 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Ao final de todos os experimentos, as raízes foram separadas da parte aérea e fotografadas com uma câmara digital (Nikon D300S SLR). As imagens obtidas foram analisadas com os softwares RootReader2D e WinRhizo v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá) para medição das características relacionadas à morfologia radicular, como área de superfície total (cm^2) (AS), área de superfície radicular entre 0-1 mm (cm^2) (AS1), 1-2 mm (cm^2) (AS2) e maior que 2 mm (cm^2) (AS3) (Sousa et al., 2012).

Peso seco e análise de nutrientes

As raízes e parte aérea foram colocadas separadamente em sacos de papel, secas em estufa de circulação forçada a 65 °C e pesadas em balança de precisão até peso constante. O material vegetal foi moído em um moinho Wiley antes de determinar o teor de macro e micronutrientes. As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Análise Química de Plantas da Embrapa Milho e Sorgo, utilizando plasma de argônio por acoplamento indutivo (ICP-OES) (Nogueira; Souza, 2005). O conteúdo de nutrientes na parte aérea e raízes de milho foi calculado multiplicando-se a concentração de nutrientes pelo peso seco. O peso seco total (PST) foi calculado pela soma dos pesos secos da parte aérea (PSPA) e das raízes (PSR).

Produção *in vitro* de AIA

A produção de AIA dependente de triptofano foi avaliada pelo método colorimétrico de acordo com Patten e Glick (1996). As colônias isoladas

de cada uma das cepas (Tabela 1) foram cultivadas em meio TSB líquido suplementado com 1,0 mg mL⁻¹ de triptofano e incubadas a 30 °C com agitação de 100 rpm durante cinco dias no escuro. Após centrifugação durante 10 min a 5.500 rpm, 0,1 mL do sobrenadante foi misturado com 0,1 mL do reagente Salkowski (Loper; Schroth, 1986) e incubado durante 20 min no escuro. A concentração de AIA no sobrenadante foi determinada colorimetricamente a 540 nm em triplicata e comparada com uma curva padrão, elaborada com AIA (Sigma, EUA) na faixa entre 0 a 100 µg mL⁻¹. A análise de variância foi realizada utilizando o software SISVAR 5.3 (Ferreira, 2011) e as médias foram comparadas pelo teste LSD a 5% de probabilidade.

Análise dos dados

Para análise dos dados de peso seco, conteúdo de nutrientes e morfologia das raízes, a análise de variância foi realizada para o grupo de experimentos, utilizando o seguinte modelo linear univariado no software R (R Core Team, 2018):

$$y_{ij} = \mu + E_j + T_i + \varepsilon_{ij}$$

onde y_{ij} é o fenótipo do tratamento i no experimento j ; μ é a média geral; E_j é o efeito do experimento j ; T_i é o efeito do tratamento i e ε_{ij} é o erro experimental. As médias ajustadas de cada característica foram corrigidas para o efeito dos experimentos.

As diferenças entre as médias de tratamento ajustadas foram comparadas para cada característica pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%, utilizando o pacote R *lsmeans* (Lenth, 2016). As correlações de Pearson foram estimadas para todos os pares de características, usando o pacote R *psych* (Revelle, 2018). A análise de componentes principais (ACP) foi realizada com base nas médias ajustadas de cada característica, usando o pacote R *pcaMethods* (Stacklies et al., 2007), disponível no Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>). Antes da ACP, as características foram padronizadas para ter a mesma distribuição normal, com média e variância iguais a zero e um, respectivamente.

Resultados

Inoculação bacteriana aumenta área de superfície radicular, peso seco e teor de nutrientes de plântulas de milho cultivadas em solução nutritiva

Cepas de *Azospirillum* e *Bacillus*, em diferentes concentrações, foram utilizadas para inoculação de plântulas de milho cultivadas em sistema de hidroponia. Análises de variância mostraram que os tratamentos foram significativos ($p < 0,05$) para todas as características, com um coeficiente de variação de baixo a médio, indicando boa precisão experimental (Tabelas 2, 3, e 4). O teste Tukey ($P < 0,05$) mostrou que os tratamentos B2084 10^7 , B32 10^7 , B119 10^7 , A1626 10^7 e SimbioseMaíz® apresentaram maior área de superfície total (SA) do que o controle (não inoculado). Os tratamentos B2084 10^7 e A1626 10^7 apresentaram maior área superficial da raiz com diâmetro entre 0 -1 mm (SA1). Os tratamentos B2084 10^7 , B119 10^7 , A1626 10^7 apresentaram maior área superficial das raízes com diâmetro entre 1-2 mm (SA2). Em relação à área de superfície de raízes com diâmetro > 2 mm (SA3), os tratamentos B2084 10^7 , B2084 10^8 , B116 10^7 , B119 10^7 , B1920 10^7 , A2142 10^7 e SimbioseMaíz® foram superiores ao tratamento controle (Tabela 2). Os tratamentos B2084 10^7 , B116 10^7 , B32 10^7 , B1920 10^7 , A1626 10^7 e SimbioseMaíz® foram superiores ao controle em relação ao peso seco total, enquanto oito tratamentos, B2084 10^7 , B2084 10^8 , B116 10^7 , B32 10^7 , B119 10^7 , B1920 10^7 , A1626 10^7 e SimbioseMaíz® apresentaram maior peso seco da parte aérea do que o controle (Tabela 2). Em relação ao peso seco da raiz, apenas o B2084 10^7 apresentou um aumento significativo em relação ao controle. É interessante notar que o tratamento B2084 10^7 teve um efeito maior sobre o crescimento das raízes, incluindo a área de superfície total e o peso seco da raiz, e um aumento no peso da parte aérea. Isso pode levar a um aumento no crescimento vegetativo, já que um sistema radicular mais desenvolvido resulta em uma vantagem inicial à planta. O tratamento comercial, SimbioseMaíz®, e os tratamentos B119 10^7 , B32 10^7 e A1626 10^7 tiveram efeito tanto no aumento da área de superfície radicular quanto no peso seco da parte aérea.

Tabela 2. Médias ajustadas* para características de área de raiz e peso seco de raiz e de parte aérea de plântulas de milho cultivadas em condições hidropônicas dez dias após a inoculação com as cepas bacterianas B2084, B116, B32, B119, B1920, A1626, A2142, A1630 e SimbioseMaiz®. AS – área de superfície total da raiz, AS1 – área de superfície das raízes com diâmetro entre 0-1 mm, AS2 – área de superfície das raízes com diâmetro entre 1-2 mm, AS3 – área de superfície das raízes com diâmetro > 2 mm, PSPA – peso seco da parte aérea, PSR – peso seco da raiz, PST – peso seco total.

Tratamento	AS (cm ²)	AS1 (cm ²)	AS2 (cm ²)	AS3 (cm ²)	PSPA (g)	PSR (g)	PST (g)
Não inoculado	143,45	43,37	62,59	23,26	0,117	0,118	0,235
Testemunha (C70 10 ⁷)	176,86	65,11	68,39	24,53	0,107	0,144	0,251
Testemunha (C70 10 ⁷)	153,68	45,51	65,33	27,58	0,132	0,122	0,254
Testemunha (C70 10 ⁸)	131,85	32,74	56,86	29,16	0,151	0,137	0,292
B2084 10 ⁵	153,68	38,46	73,98	26,38	0,118	0,137	0,255
B2084 10 ⁷	192,87	63,93	80,20	29,75	0,143	0,168	0,312
B2084 10 ⁸	137,81	20,18	72,11	33,35	0,142	0,132	0,274
B116 10 ⁷	154,47	39,98	69,66	29,91	0,137	0,129	0,267
B116 10 ⁸	117,99	25,02	52,90	28,97	0,126	0,134	0,259
B32 10 ⁷	171,62	56,24	71,15	26,16	0,143	0,148	0,292
B32 10 ⁸	131,15	30,56	59,38	27,82	0,140	0,136	0,277
B119 10 ⁷	195,66	55,77	85,32	36,60	0,172	0,126	0,299
B1920 10 ⁷	143,40	39,15	58,32	33,15	0,137	0,125	0,262
A1626 10 ⁷	188,86	60,43	82,00	27,07	0,168	0,125	0,294
A2142 10 ⁷	131,36	39,43	49,45	29,99	0,131	0,123	0,254
A1630 10 ⁷	138,60	34,30	61,47	29,52	0,121	0,128	0,249
SimbioseMaiz®	158,68	42,11	69,86	32,49	0,138	0,145	0,283
Média ajustada	154,23	43,08	67,00	29,16	0,137	0,134	0,271
CV (%)	11,24	22,33	14,80	16,62	12,18	18,56	11,51

*As médias ajustadas seguidas pelas mesmas letras indicam que os tratamentos não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Quando o conteúdo de nutrientes foi avaliado para parte aérea (Tabela 3) e raízes (Tabela 4), o tratamento B2084 10⁷ resultou em aumento significativo em todos os nutrientes na parte aérea e A1626 10⁷ mostrou um aumento em todos os nutrientes, exceto K, S e Zn (Tabela 3). Os tratamentos B116 10⁸, B119 10⁷, A1626 10⁷ e SimbioseMaíz®, apresentaram aumento de N na parte aérea. Com exceção dos tratamentos A1626 10⁷ e B2084 10⁵, todos os tratamentos aumentaram o conteúdo de N na raiz e a maioria dos tratamentos apresentou um aumento no conteúdo de vários outros nutrientes.

A área total da superfície radicular apresentou uma correlação positiva e significativa com peso seco total, macro e alguns micronutrientes da parte aérea, porém apresentou uma correlação negativa com nutrientes na raiz (Figura 1), indicando que uma plântula de milho com sistema radicular maior pode translocar mais nutrientes para a parte aérea e aumentar seu crescimento vegetativo. Foi observada uma alta correlação entre o conteúdo de nutrientes da parte aérea, assim como entre o conteúdo de nutrientes da raiz, mas foi encontrado que, entre si, os nutrientes da parte aérea e da raiz estão negativamente correlacionados (Figura 1).

Tabela 3. Médias ajustadas* para o conteúdo de macro e micronutriente da parte aérea de milho cultivado sob condições hidropônicas dez dias após a inoculação com cepas bacterianas B2084, B116, B32, B119, B1920, A1626, A2142, A1630 e Simbiose-Maiz®

Tratamento	Parte aérea																			
	N % kg ⁻¹	P g kg ⁻¹	K g kg ⁻¹	Ca g kg ⁻¹	Mg g kg ⁻¹	S g kg ⁻¹	Cu mg kg ⁻¹	Fe mg kg ⁻¹	Mn mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹										
Não inoculado	3,29	e	6,26	cd	35,44	bc	3,12	b	1,96	bc	2,54	de	1,14	c	55,04	c	53,56	c	31,84	bd
Testemunha (C70 10 ⁵)	3,06	de	5,65	cd	32,29	bc	2,82	b	1,65	c	2,17	e	1,17	bc	41,85	c	53,47	c	27,76	bd
Testemunha (C70 10 ⁷)	3,38	e	6,01	ef	36,46	bc	3,25	b	2,03	bc	2,70	cd	1,09	c	57,62	bc	53,23	c	30,61	bd
Testemunha (C70 10 ⁹)	3,47	cd	6,14	cd	39,11	abc	3,44	b	2,26	abc	3,34	abc	1,21	bc	67,31	abc	56,05	bc	36,40	abcd
B2084 10 ⁵	3,32	de	5,52	cd	34,00	bc	3,42	b	1,97	bc	2,52	bcde	1,09	bc	66,00	abc	47,99	bc	27,25	cd
B2084 10 ⁷	4,59	a	9,93	a	50,11	a	5,01	a	2,90	a	3,79	a	1,92	a	75,75	ab	88,55	a	44,73	a
B2084 10 ⁸	3,38	cd	5,74	cd	38,60	abc	3,65	b	2,13	bc	3,31	abc	0,99	c	60,57	abc	51,41	bc	27,95	cd
B116 10 ⁷	3,61	de	5,94	cd	37,21	bc	3,36	b	2,18	bc	3,08	bc	1,14	c	58,99	abc	50,93	c	28,61	cd
B116 10 ⁸	3,73	bd	5,89	cd	36,66	bc	3,25	b	1,98	bc	2,94	abcd	1,22	bc	61,74	abc	57,80	bc	31,32	abcd
B32 10 ⁷	3,98	abcd	8,05	abc	40,44	abc	3,83	b	2,45	ab	3,15	abcd	1,37	bc	62,64	abc	67,63	abc	41,52	ab
B32 10 ⁸	3,31	de	6,28	bd	38,89	abc	3,35	b	2,26	abc	3,37	abc	1,09	bc	66,42	abc	56,07	bc	31,72	abcd
B119 10 ⁷	4,50	abc	7,99	abc	41,54	abc	3,67	b	2,51	ab	3,14	abcd	1,42	abc	62,77	abc	61,29	bc	30,83	bd
B1920 10 ⁷	3,55	de	5,84	cd	37,02	bc	3,27	b	2,13	bc	3,17	b	1,13	c	64,82	abc	49,83	c	27,27	d
A1626 10 ⁷	4,68	ab	9,80	ab	41,46	ab	5,33	a	2,91	a	2,97	abcd	1,77	ab	91,21	a	76,08	ab	39,77	abc
A2142 10 ⁷	3,29	e	5,80	ef	34,44	bc	2,89	b	1,83	c	2,74	cd	0,96	c	69,82	abc	51,52	c	28,99	cd
A1630 10 ⁷	3,23	de	6,10	def	29,41	c	2,92	b	1,99	bc	2,73	bcde	1,03	c	55,95	abc	54,03	bc	25,54	d
SimbioseMaiz®	3,90	bd	7,27	abc	40,31	b	3,33	b	2,27	b	3,04	bc	1,28	bc	66,87	abc	59,50	bc	29,62	bd
Média ajustada	3,66		6,72		37,85		3,52		2,20		2,98		1,24		63,85		58,17		31,87	
CV (%)	16,16		28,38		19,34		20,48		18,55		17,49		30,09		36,98		27,79		26,78	

*As médias ajustadas seguidas pelas mesmas letras indicam que os tratamentos não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Tabela 4. Médias ajustadas* para o conteúdo de macro e micronutrientes das raízes de milho cultivado sob condições hidropônicas dez dias após a inoculação com estirpes bacterianas B2084, B116, B32, B119, B1920, A1626, A2142, A1630 e Simbiose-Maiz®

Tratamento	Raiz															
	N % kg ⁻¹	P g kg ⁻¹	K g kg ⁻¹	Ca g kg ⁻¹	Mg g kg ⁻¹	S g kg ⁻¹	Cu mg kg ⁻¹	Fe mg kg ⁻¹	Mn mg kg ⁻¹	Zn mg kg ⁻¹						
Não inoculado	0,80	1,13	e	4,17	0,48	g	1,00	d	1,06	c	440,70	bode	105,68	e	20,83	de
Testemunha (C70 10 ⁶)	1,07	1,96	a	7,85	1,71	ab	0,80	abcd	1,67	a	580,62	ab	207,07	a	21,21	a
Testemunha (C70 10 ⁷)	0,94	1,27	de	5,35	1,49	abc	0,58	ef	1,33	ab	457,46	bode	118,50	de	25,82	de
Testemunha (C70 10 ⁸)	1,09	1,75	abc	8,36	1,82	a	0,50	abcd	1,75	a	617,70	a	84,07	def	21,54	bode
B2084 10 ⁵	0,95	1,14	de	5,63	1,10	c	0,50	fg	1,42	bod	411,24	cddef	138,92	abcde	18,09	e
B2084 10 ⁷	1,07	1,46	bod	7,05	1,51	abc	0,69	abcdef	1,42	abc	479,73	abcd	195,45	a	25,82	bod
B2084 10 ⁸	1,13	1,64	abcd	7,67	1,50	abc	0,71	abcdef	1,57	abc	442,82	bcddef	110,15	bcddef	25,56	abcde
B116 10 ⁷	1,06	1,46	bod	6,76	1,47	abc	0,67	cddef	1,35	abc	409,26	cddef	127,21	cd	23,85	bode
B116 10 ⁸	1,04	1,84	ab	7,75	1,85	a	0,91	ab	1,65	ab	563,32	abcd	98,87	cddef	24,35	bode
B32 10 ⁷	1,20	1,61	abcd	6,70	1,63	ab	0,78	abcde	1,46	abc	469,40	abcde	189,38	ab	26,69	bod
B32 10 ⁸	1,13	1,81	ab	9,05	1,87	a	0,87	abc	1,79	a	570,45	abc	94,87	def	23,45	bode
B119 10 ⁷	0,89	1,25	de	5,84	1,33	abc	0,55	defg	1,30	abcd	388,72	def	147,96	abcde	19,83	cd
B1920 10 ⁷	1,06	1,48	bod	6,96	1,60	a	0,70	bcddef	1,49	ab	364,38	ef	140,66	bod	22,58	cd
A1626 10 ⁷	0,15	0,01	f	0,21	0,20	d	0,10	h	0,00	e	0,09	d	0,00	g	42,63	f
A2142 10 ⁷	1,05	1,58	abc	6,83	1,58	a	0,75	abc	1,37	abc	408,29	cddef	117,51	de	22,22	cd
A1630 10 ⁷	1,03	1,51	abcde	5,79	1,57	abc	0,65	abcdeh	1,36	abcd	457,46	abcde	117,51	abcde	23,03	bode
SimbioseMaiz®	1,13	1,66	abc	8,27	1,73	a	0,84	a	1,63	a	323,97	f	167,13	abc	27,64	ab
Média ajustada	0,99	1,44	6,48	1,49	1,63	1,25	0,65	1,38	1,25	433,27	129,62	22,12	33,80			
CV (%)	14,13	19,93	26,64	21,14	22,03	21,89	19,87	24,01	22,34							

*As médias ajustadas segundas pelas mesmas letras indicam que os tratamentos não diferem significativamente pelo teste de Tukey (p < 0,05).

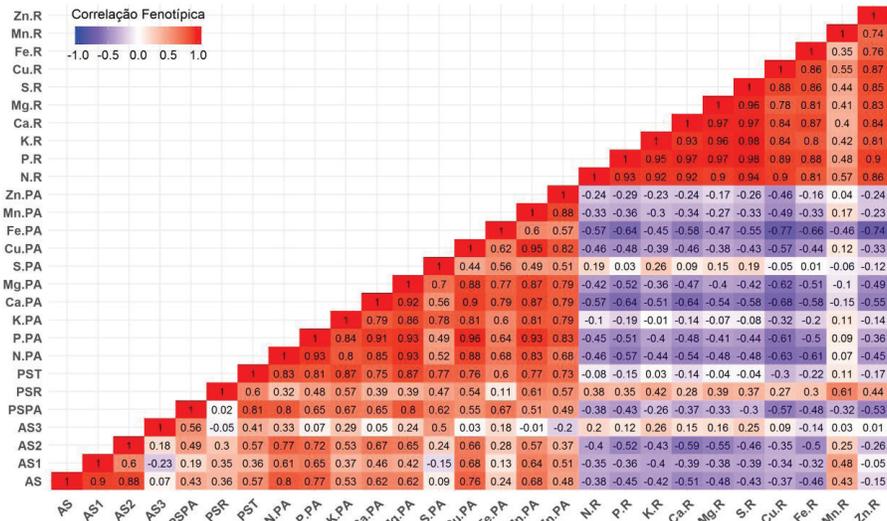


Figura 1. Correlações fenotípicas entre morfologia radicular, peso seco, e nutrientes de plântulas de milho inoculadas com diferentes cepas de microrganismos. AS – área de superfície total da raiz (cm²), AS1 – área de superfície das raízes com diâmetro entre 0-1 mm (cm²), AS2 – área de superfície das raízes com diâmetro entre 1-2 mm (cm²), AS3 – área de superfície das raízes com diâmetro > 2 mm (cm²), PSPA – peso seco da parte aérea (g), PSR – peso seco da raiz (g), PST – peso seco total (g), A – conteúdo de nutriente da parte aérea e R – conteúdo de nutriente da raiz.

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada para a morfologia radicular (AS, AS1, AS2 e AS3), peso seco (raiz, parte aérea e total) e teor de nutrientes (N P K da parte aérea e raiz). Essas características foram selecionadas com base nas análises de variância e de correlação, agrupando os tratamentos em diferentes classes (Figura 2). O primeiro componente principal (CP1) explicou 51,15% da variabilidade fenotípica observada para as características acima e foi explicado, principalmente, pela área de superfície total, raízes com um diâmetro entre 0-1 e 1-2 mm, valores de peso seco e conteúdo de N P K da parte aérea. O segundo componente principal (CP2) explicou 23,87% da variabilidade fenotípica e foi explicado principalmente pela área superficial das raízes com diâmetro > 2 mm, peso seco da raiz e teor de N P K da raiz (Tabela 5). Os tratamentos no quadrante superior direito apresentaram maior área de superfície radicular, peso seco e conteúdo de nutrientes, destacando-se o desempenho de B2084 10⁷, SimbioseMaíz®, B119 10⁷ e B32 10⁷. O tratamento com A1626 10⁷ no quadrante inferior direito

apresentou maior área de superfície total da raiz, raízes com diâmetro de 1-2 mm e > 2 mm e peso seco total. Os tratamentos no quadrante superior esquerdo apresentaram raízes mais grossas, com maior área superficial, raízes mais finas, com menor área superficial, além de maior massa seca total e radicular e maior conteúdo de N P K na raiz. Os tratamentos no quadrante inferior esquerdo mostraram resultados semelhantes ao controle negativo (Figura 2). A concentração de células utilizadas também influenciou o resultado. Por exemplo, B2084 na concentração de 10^7 ufc mL⁻¹ afetou positivamente as plântulas, enquanto que nas concentrações de 10^5 e 10^8 ufc mL⁻¹, as plântulas apresentaram área de superfície radicular similar ou menor. O mesmo foi observado para B32 que contrastou quando utilizado na concentração de 10^7 e 10^8 ufc mL⁻¹. As diferenças entre os tratamentos podem ser observadas nas Figuras 3 e 4, onde podemos visualizar as diferenças entre raízes e parte aérea entre o controle negativo e os tratamentos.

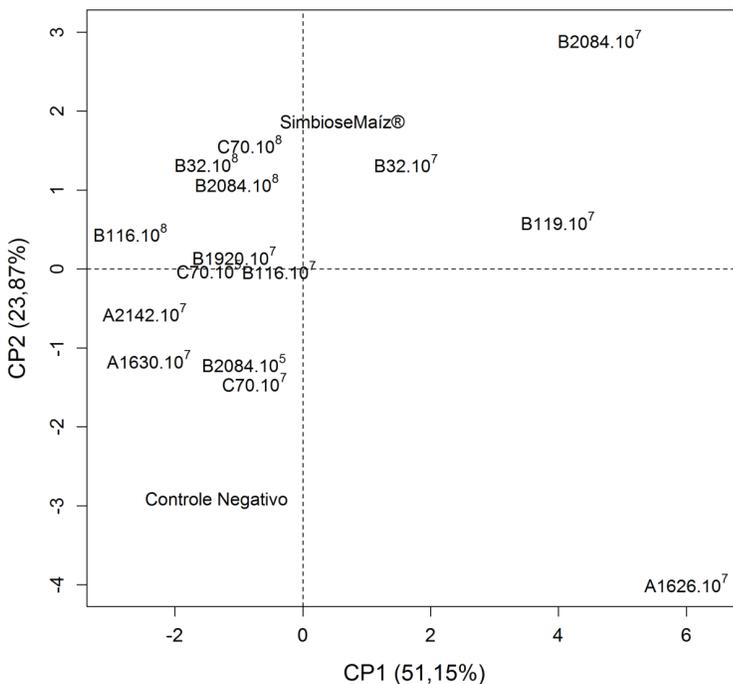


Figura 2. Análise de componentes principais (ACP) para características de raiz (conteúdo de nutriente total e conteúdo de nutriente da raiz com diâmetro entre 0-1, 1-2 e > 2mm), peso seco (total, parte aérea e raiz) e conteúdo de nutrientes da parte aérea e raiz. A proporção cumulativa da variância total de cada componente principal (CP1 e CP2) é mostrada em cada eixo. Identificação das cepas estão na Tabela 1.

Tabela 5. Análise de componentes principais para morfologia, peso seco e conteúdo de nutrientes. Os autovetores e a proporção cumulativa da variância total explicada são mostrados para cada componente principal (CP)

Variáveis	CP1	CP2
Área de superfície total (cm ²)	0,33	-0,005
Raízes com diâmetro entre 0-1 mm (cm ²)	0,27	-0,06
Raízes com diâmetro entre 1-2 mm (cm ²)	0,32	-0,01
Raízes com diâmetro entre > 2 mm (cm ²)	0,07	0,25
Peso seco da parte aérea (g)	0,29	0,08
Peso seco da raiz (g)	0,12	0,41
Peso seco total (g)	0,31	0,30
Conteúdo de N da parte aérea (% kg ⁻¹)	0,38	0,05
Conteúdo de P da parte aérea (g kg ⁻¹)	0,37	0,06
Conteúdo de K da parte aérea (g kg ⁻¹)	0,30	0,27
Conteúdo de N da raiz (% kg ⁻¹)	-0,21	0,44
Conteúdo de P da raiz (g kg ⁻¹)	-0,24	0,41
Conteúdo de K da raiz (g kg ⁻¹)	-0,20	0,48
Variância Cumulativa (%)	51,15	75,02

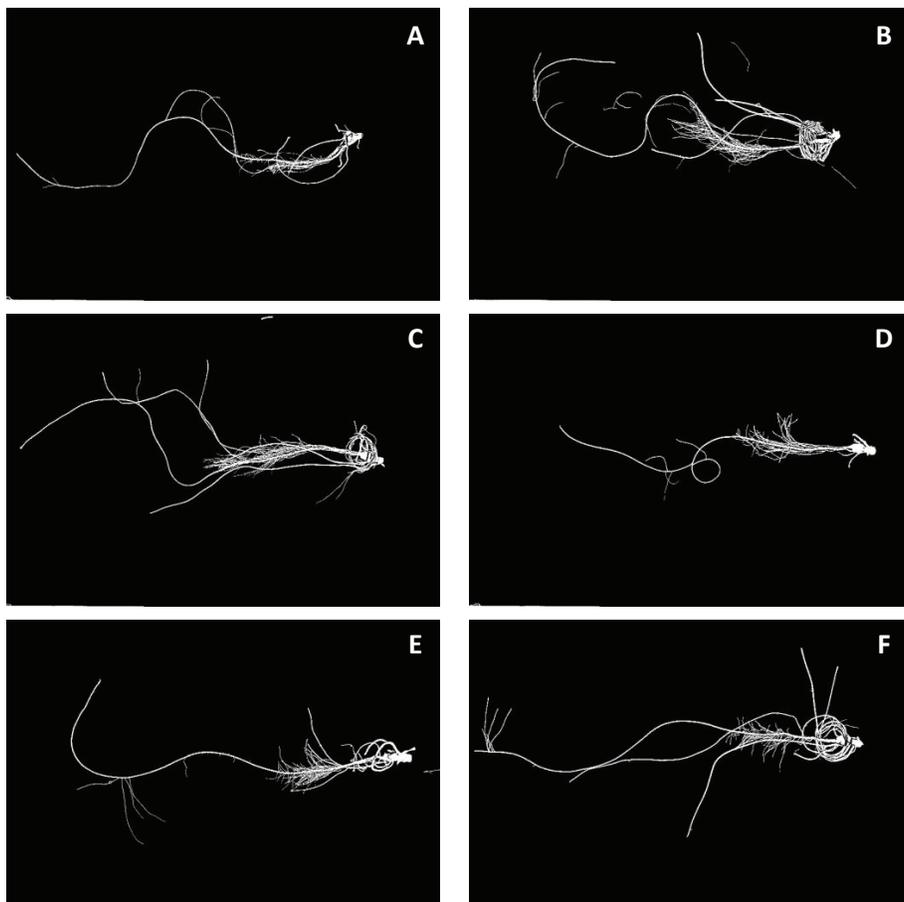


Figura 3. Raízes de milho submetidas a tratamento com inoculante microbiano cultivadas por 10 dias em condições hidropônicas. (A) não inoculada, (B) C70 10^7 , (C) B2084 10^7 , (D) B116 10^7 , (E) A2142 10^7 e (F) B1920 10^7 .



Figura 4. Plântulas de milho submetidas a tratamento com inoculantes microbianos cultivadas por 10 dias em condições hidropônicas. (1) não inoculada, (2) B116 10^7 , (3) B2084 10^7 , (4) A2142 10^7 e (5) B1920 10^7 .

Cepas bacterianas são capazes de produzir AIA *in vitro*

A produção de AIA dependente do triptofano foi confirmada nas nove cepas avaliadas, na faixa entre 1,9 (B32) e 82,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (A1630). Comparadas ao controle (C70), que produziu 32,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$, as linhagens A1630, A1626, A2142, B119 e B116 apresentaram maior produção de AIA (Tabela 6).

Tabela 6. Produção de AIA dependente de triptofano pelas cepas utilizadas como inoculantes microbianos

Cepa	Gênero	AIA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Controle Negativo	-	0,00 ^{e*}
C70	<i>Bacillus</i>	32,39 ^d
B2084	<i>Bacillus</i>	30,16 ^d
B116	<i>Bacillus</i>	49,54 ^c
B32	<i>Bacillus</i>	1,96 ^e
B119	<i>Bacillus</i>	61,67 ^b
B1920	<i>Bacillus</i>	3,18 ^e
A1626	<i>Azospirillum</i>	65,78 ^b
A2142	<i>Azospirillum</i>	52,15 ^c
A1630	<i>Azospirillum</i>	82,12 ^a

*As médias seguidas pelas mesmas letras indicam que os tratamentos não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Discussão

Neste trabalho, foi avaliado o efeito potencial de cepas de *Azospirillum* e *Bacillus* sobre o crescimento de plântulas de milho cultivadas em um sistema hidropônico. Estes dois gêneros são conhecidos e estudados há décadas, *Azospirillum* por causa da sua capacidade de fixação de nitrogênio e produção de fito-hormônios (Hungria et al., 2010; Fukami et al., 2018) e *Bacillus* por sua eficiência em solubilizar fosfato e produzir ácidos orgânicos (Gomes et al., 2014; Abreu et al., 2017). No entanto, ainda são necessários estudos complementares para compreender os efeitos destes microrganismos como promotores de crescimento de plantas em diferentes ambientes.

Nossos resultados mostraram um aumento consistente na área da superfície total radicular e no peso seco total das plântulas inoculadas. Dados semelhantes foram obtidos em um estudo com *Pseudomonas* e *Pantoea*, que mostraram um aumento no comprimento e biomassa da raiz em plantas de milho (Viruel et al., 2014) e outro estudo com *A. brasiliense*, cepas Ab-V5 e Ab-V6, utilizando *Brachiaria* (Hungria et al., 2016). O desenvolvimento

de uma área maior de superfície radicular está diretamente relacionado à eficiência da planta para aquisição de nutrientes e água do solo. Raízes finas (< 2 mm) desempenham um papel especialmente importante na ciclagem de água, nutrientes e carbono e constituem um importante investimento de fotossintéticos e recursos vegetais, que reflete em uma maior biomassa e tolerância ao estresse em fases posteriores. Várias bactérias promotoras do crescimento de plantas, incluindo *Bacillus*, podem induzir ou inibir fatores de crescimento da raiz primária, aumentar o número e/ou o comprimento das raízes laterais e alongar os pelos radiculares, o que estimula a aquisição de água e nutrientes e conseqüentemente o crescimento das plantas (Dobbelaere et al., 1999; Contesto et al., 2008; Combes-Meynet et al., 2011; Chamam et al., 2013; Vacheron et al., 2013). Raízes nodais e laterais compreendem a maior parte do sistema radicular do milho e seu desenvolvimento é controlado por sinais ambientais e intrínsecos, nos quais os hormônios vegetais são elementos-chave para sua regulação (Depuydt; Hardtke, 2011; Garay-Arroyo et al., 2012; Vanstraelen; Benková, 2012). Considerando todos os tratamentos que apresentaram maior área de superfície radicular e peso seco, apenas a cepa B1920 apresentou baixa produção de AIA, todas as demais cepas apresentaram alta produção deste fito-hormônio, o que poderia explicar o crescimento promovido na raiz e parte aérea.

Embora tenha sido observada uma correlação positiva entre a produção de AIA *in vitro* e o aumento da matéria seca da raiz e da parte aérea para várias BPCP (Mehnaz; Lazarovits, 2006), incluindo *Bacillus* (Wahyudi et al., 2011; Ikeda et al., 2013), altas concentrações de AIA bacteriana podem inibir o crescimento das raízes, sugerindo que existe um limiar ótimo para estimular o desenvolvimento das plantas. Por exemplo, um isolado de *A. brasilense* que produz altos níveis de AIA não necessariamente, promove maior crescimento, uma vez que a auxina microbiana adicional pode alterar o nível ótimo de auxina endógena e causar inibição do crescimento das plantas em casa de vegetação (Mehnaz; Lazarovits, 2006). Dentre as cepas avaliadas, B2084 e B116 apresentaram o quarto e quinto maiores níveis de produção de AIA e proporcionaram resultados positivos na promoção do crescimento de milho em solução nutritiva.

Considerando as cepas de *Bacillus* que afetaram positivamente o conteúdo de nutrientes das plantas, B32, B116 e B119 foram isoladas da rizosfera de milho (Oliveira et al., 2009), enquanto B2084 e B1920 são bactérias

endofíticas, sendo todas eficientes na solubilização de fontes pouco solúveis de fosfato (Silva et al., 2014; Abreu et al., 2017; Ribeiro et al., 2018). Plantas de milho inoculadas com as cepas *Azospirillum* A1630 e inoculante comercial SimbioseMaíz® também apresentaram maior conteúdo de nutrientes que o controle. Isto indica que uma maior área de superfície de raiz, estimulada por BPCP nos primeiros estágios de crescimento de planta, promoveu maior absorção de nutriente e crescimento de planta.

Os resultados indicam que, além da cepa avaliada, sua respectiva concentração foi um fator significativo para o crescimento das plântulas. A cepa B2084 inoculada na concentração de 10^5 ufc mL⁻¹ teve um efeito menor em comparação com a concentração de 10^7 ufc mL⁻¹. O mesmo foi observado quando B2084 e B32 foram testadas na concentração de 10^8 ufc mL⁻¹ e comparadas com a concentração de 10^7 ufc mL⁻¹. Após avaliar diferentes concentrações de *Bacillus*, a concentração de 10^7 ufc mL⁻¹ foi a que apresentou melhores resultados no aumento do crescimento do milho em nossas condições experimentais. Há relatos na literatura de que a concentração bacteriana ótima para produzir um efeito promotor de crescimento no milho é de 10^7 ufc por planta em condições de campo (Fallik et al., 1988; Fages, 1994). Outro experimento com *Azospirillum* mostrou que a inoculação com a concentração bacteriana ótima promoveu um aumento na altura da planta, comprimento da raiz e peso seco em plantas de milho cultivadas em condições de campo (Puente et al., 2009). Outros autores relataram inibição do crescimento radicular em trigo inoculado com *Azospirillum* em concentrações superiores a 10^8 ufc mL⁻¹ (Kapulnik et al., 1985; Bashan, 1986; Barbieri et al., 1988). Um estudo utilizando *A. lipoferum* em milho analisou três concentrações de inóculo, $0,9 \times 10^5$, $0,9 \times 10^7$ e $0,9 \times 10^9$ ufc mL⁻¹, e observou que a maior concentração não modificou o comprimento da raiz e a menor concentração causou uma redução na altura da parte aérea, elegendo 10^7 ufc mL⁻¹ ou $2,5 \times 10^7$ ufc por planta, o nível ótimo de inóculo (Arsac et al., 1990). O potencial máximo dos inoculantes deve ser testado quanto à competitividade da cepa e ao número de células viáveis que permitem a rápida colonização da raiz (Deaker et al., 2004). A maior concentração de células também pode implicar a maior produção do hormônio vegetal AIA e causar inibição do crescimento, como já relatado anteriormente.

Conclusões

O sistema hidropônico mostrou ser uma estratégia eficiente para selecionar cepas bacterianas promotoras do crescimento de plantas nos estágios iniciais do desenvolvimento do milho. Nossos resultados indicaram que as inoculações de milho com linhagens individuais de *Bacillus*, B116, B119 e B2084, em sua concentração ótima, foram efetivas no aumento da área de superfície radicular e na massa seca da parte aérea de plântulas de milho em sistema hidropônico.

Agradecimentos

Este trabalho teve o suporte financeiro da Fapemig, do CNPq e da Embrapa.

Referências

ABREU, C. S. de; FIGUEIREDO, J. E. F.; OLIVEIRA, C. A.; SANTOS, V. L. dos; GOMES, E. A.; RIBEIRO, V. P.; BARROS, B. de A.; LANA, U. G. de P.; MARRIEL, I. E. Maize endophytic bacteria as mineral phosphate solubilizers. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, p. 1-13, 2017.

ARSAC, J. F.; LAMOTHE, C.; MULARD, D.; FAGES, J. Growth enhancement of maize (*Zea mays* L.) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. **Agronomie**, v. 10, p. 640-654, 1990.

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.

BARBIERI, P. A.; BERNARDI, A.; GALLI, E.; ZANETTI, G. Effects of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on wheat roots development. In: KLINGMULLER, W. (Ed.). **Azospirillum IV: genetics, physiology, ecology**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1988. p. 181-188.

BASHAN, Y. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 18, n. 3, p. 297-301, 1986.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment. **Advances in Agronomy**, v. 108, p. 77-136, 2010.

BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E.; PRABHU, S. R.; HERNANDEZ, J.-P. Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology-formulations and practical perspectives (1998-2013). **Plant and Soil**, v. 378, n. 1/2, p. 1-33, 2014.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPFER, J. W. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant and Soil**, v. 383, n. 1/2, p. 3-41, 2014.

CASSÁN, F.; PERRIG, D.; SGROY, V.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; LUNA, V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 28-35, 2009.

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*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, n. 2, p. 440-459, 2014.

CHAMAM, A.; SANGUIN, H.; BELLVERT, F.; MEIFFREN, G.; COMTE, G.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; BERTRAND, C.; PRIGENT-COMBARET, C. Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum-Oryza sativa* association. **Phytochemistry**, v. 87, p. 65-77, 2013.

CHANDRA, P.; SINGH, E. Applications and mechanisms of plant growth-stimulating rhizobacteria. In: CHOUDHARY, D.; VARMA, A.; TUTEJA, N. (Ed.). **Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture**. Switzerland: Springer, 2016. p. 37-62.

COMBES-MEYNET, E.; POTHIER, J. F.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; PRIGENT-COMBARET, C. The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of

Azospirillum genes involved in plant-growth promotion. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 2, p. 271-284, 2011.

CONTESTO, C.; DESBROSSES, G.; LEFOULON, C.; BÉNA, G.; BOREL, F.; GALLAND, M.; GAMET, L.; VAROQUAUX, F.; TOURAINE, B. Effects of rhizobacterial ACC deaminase activity on Arabidopsis indicate that ethylene mediates local root responses to plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Science**, v. 175, n. 1/2, p. 178-189, 2008.

DEAKER, R.; ROUGHLEY, R. J.; KENNEDY, I. R. Legume seed inoculation technology: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 36, n. 8, p. 1275-1288, 2004.

DEPUYDT, S.; HARDTKE, C. S. Hormone signaling crosstalk in plant growth regulation. **Current Biology**, v. 21, n. 9, p. 365-73, 2011.

DOBBELAERE, S.; CROONENBORGH, A.; THYS, A.; BROEK, A. V.; VANDERLEYDEN, J. Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. **Plant and Soil**, v. 212, n. 2, p. 153-162, 1999.

FAGES, J. *Azospirillum* inoculants and field experiments. In: OKON, Y. (Ed.). **Azospirillum: plant associations**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 88-105.

FALLIK, E. Y.; FISHER, M. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 45-49, 1988.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Express**, v. 8, n. 73, p. 1-12, 2018.

FUKAMI, J.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S.; HUNGRIA, M. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 3, p. 2-13, 2016.

GARAY-ARROYO, A.; DE LA PAZ SANGHEZ, M.; GRACÍA-PONCE, B.; AZPEITIA, E.; ALVAREZ-BUYLLA, E. R. Hormone symphony during root

growth and development. **Developmental Dynamics**, v. 241, n. 12, p. 1867-1885, 2012.

GOMES, E. A.; SILVA, U. de C.; MARRIEL, I. E.; PAIVA, C. A. O.; LANA, U. G. de P. Rock phosphate solubilizing microorganisms isolated from maize rhizosphere soil. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 13, n. 1, p. 69-81, 2014.

GUPTA, S.; RADHAKRISHNAN, A.; RAHARJA-LIU, P.; LIN, G.; STEINMETZ, L. M.; GAGNEUR, J.; SINHA, H. Temporal expression profiling identifies pathways mediating effect of causal variant on phenotype. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 6, p. e1005195, 2015.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; SOUZA, E. M.; PEDROSA, F. O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1/2, p. 413-425, 2010.

HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAÚJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: an environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 221, p. 125-131, 2016.

KAPULNIK, Y. Y.; OKON, Y.; HEMS, Y. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 10, p. 881-887, 1985.

IDRISS, E. E.; MAKAREWICZ, O.; FAROUK, A.; ROSNER, K.; GREINER, R.; BOCHOW, H.; RICHTER, T.; BORRISS, T. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquifaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology**, v. 148, p. 2097-2109, 2002.

IKEDA, A. C.; BASSANI, L. L.; ADAMOSKI, D.; STRINGARI, D.; CORDEIRO, V. K.; GLIENKE, C.; STEFFENS, M. B. R.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Morphological and genetic characterization of endophytic bacteria isolated from roots of different maize genotypes. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 1, p. 154-160, 2013.

LENTH, R. V. Least-Squares Means: the R Package lsmeans. **Journal of Statistical Software**, v. 69, n. 1, p. 1-33, 2016.

LIU, C.; MUCHHAL, U. S.; UTHAPPA, M.; KONONOWICZ, A. K.; RAGHOTHAMA, K. G. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissue by phosphorus. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 91-99, 1998.

LOPER, J. E.; SCHROTH, M. N. Influence of bacterial source of indole-3-acetic acid for root elongation of sugar beet. **Phytopathology**, v. 76, p. 386-389, 1986.

MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans* and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.

MONTAÑEZ, A.; BLANCO, A. R.; BARLOCCO, C.; BERACOCHEA, M.; SICARDI, M. Characterization of cultivable putative endophytic plant growth promoting bacteria associated with maize cultivars (*Zea mays* L.) and their inoculation effects in vitro. **Applied Soil Ecology**, v. 58, p. 21-28, 2012.

NOGUEIRA, A. R. de A.; SOUZA, G. B. de (Ed.). **Manual de laboratórios**: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005. 334 p.

OLIVEIRA, C. A.; ALVES, V. M. C.; MARRIEL, I. E.; GOMES, E. A.; SCOTTI, M. R.; CARNEIRO, N. P.; GUIMARÃES, C. T.; SCHAFFERT, R. E.; SÁ, N. M. H. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1782-1787, 2009.

PATTEN, C.; GLICK, B. R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 207-220, 1996.

PUENTE, M. L.; GARCIA, J. E.; ALEJANDRO, P. Effect of bacterial concentration of *Azospirillum brasilense* in the inoculum and its plant growth regulator compounds on crop yield of corn (*Zea mays* L.) in the field. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 5, p. 604-608, 2009.

R CORE TEAM. **R**: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2018. Disponível em: <<https://www.R-project.org>>. Acesso em: 13 out. 2018.

REVELLE, W. **psych**: procedures for personality and psychological research: version 1.8.4. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/web/packages/psych/index.html>>. Acesso em: 10 out. 2018.

RIBEIRO, V. P.; MARRIEL, I. E.; SOUSA, S. M. de; LANA, U. G. de P.; MATTOS, B. B.; PAIVA, C. A. O.; GOMES, E. A. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49S, p. 40-46, 2018.

SILVA, U. C.; MENDES, G. O.; SILVA, N. M. R.; DUARTE, J. L.; SILVA, I. R.; TÓTOLA, M. R.; COSTA, M. D. Fluoride-tolerant mutants of *Aspergillus niger* show enhanced phosphate solubilization capacity. **PLoS ONE**, v. 9, e110246, 2014.

SOUSA, S. M. de; CLARK, R. T.; MENDES, F. F.; OLIVEIRA, A. C. de; VASCONCELOS, M. J. V. de; PARENTONI, S. N.; KOCHIAN, L. V.; GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V. A role for root morphology and related candidate genes in P acquisition efficiency in maize. **Functional Plant Biology**, v. 39, n. 11, p. 925-935, 2012.

STACKLIES, W.; REDESTIG, H.; SCHOLZ, M.; WALTHER, D.; SELBIG, J. *pcaMethods* - a Bioconductor package providing PCA methods for incomplete data. **Bioinformatics**, v. 23, p. 164-1167, 2007.

VANSTRAELEN, M.; BENKOVÁ, E. Hormonal interactions in the regulation of plant development. **Annual Review of Cell Developmental Biology**, v. 28, p. 463-487, 2012.

VACHERON, J.; DESBROSSES, G.; BOUFFAUD, M. L.; TOURAINÉ, B.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; MULLER, D.; LEGENDRE, L.; WISNIEWSKI-DYÉ, F.; PRIGENT-COMBARET, C. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 1-19, 2013.

VIRUEL, E.; ERAZZÚ, L. E.; MARÍNEZ CALSINA, L.; FERRERO, M. A.; LUCCA, M. E.; SENERIZ, F. Inoculation of maize with phosphate solubilizing bacteria: effect on plant growth and yield. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 14, n. 4, p. 819-831, 2014.

WAHYUDI, A. T.; ASTUTI, R. P.; WIDYAWATI, A. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 3, n. 2, p. 34-40, 2011.

Embrapa

Milho e Sorgo



Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

