

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA LUIZA FITZ KAUFMANN

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESPOSTA DE GENÓTIPOS DE TRIGO À INTERAÇÃO COM
AZOSPIRILLUM BRASILENSE

PALOTINA

2025

MARIA LUIZA FITZ KAUFMANN

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA RESPOSTA DE GENÓTIPOS DE TRIGO À INTERAÇÃO COM
AZOSPIRILLUM BRASILENSE

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, Setor de Palotina, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo

PALOTINA

2025

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas.
Biblioteca UFPR Palotina.

K21 Kaufmann, Maria Luiza Fitz
Avaliação *in vitro* da resposta de genótipos de trigo à interação
com *Azospirillum brasilense* / Maria Luiza Fitz Kaufmann.
– Palotina, PR, 2025.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, PR, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.
Orientadora: Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo.

1. *Azospirillum brasilense*. 2. Nitrogênio. 3. Trigo.
I. Vendruscolo, Eliane Cristina Gruszka. II. Universidade Federal
do Paraná. III. Título.

CDU 60

Bibliotecária: Aparecida Pereira dos Santos – CRB 9/1653



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **MARIA LUIZA FITZ KAUFMANN**, intitulada: **AVALIAÇÃO IN VITRO DA RESPOSTA DE GENÓTIPOS DE TRIGO À INTERAÇÃO COM *Azospirillum brasilense***, sob orientação da Profa. Dra. ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 25 de Abril de 2025.

Assinatura Eletrônica

25/04/2025 19:25:29.0

ELIANE CRISTINA GRUSZKA VENDRUSCOLO

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

25/04/2025 16:30:23.0

ROBSON FERNANDO MISSIO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/04/2025 17:40:53.0

RAFAELLA COSTA BONUGLI SANTOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO AMERICANA)

À Deus, por sempre estar presente na minha vida e me direcionar a realizar os meus sonhos. A minha família por me inspirarem e me fornecerem apoio para lutar e estar em constante evolução, dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Eliane Cristina Gruszka Vendruscolo, pela confiança, dedicação e apoio, por estar me incentivando e me auxiliando a persistir nos momentos de dificuldades, por acreditar no meu potencial e estar me desafiando a ser tanto uma pessoa quanto uma profissional melhor e mais dedicada.

Ao LABIOGEN que ofereceu todo o suporte, apoio e materiais necessários, em especial as professoras Eliane Vendruscolo e Marise Fonseca dos Santos por sancionarem as minhas dúvidas, me fornecerem apoio e me auxiliarem com soluções. Obrigada pelo carinho no decorrer do mestrado. A Eloisa, a Flávia e a Laura, que foram pessoas que contribuíram em algum momento da minha pesquisa e me proporcionarem dias mais felizes e alegres.

À Biotrigo por fornecerem as sementes de trigo e acreditarem na minha pesquisa.

À minha família, que são o meu alicerce e bem mais precioso, que me estimulam a estar sempre procurando a minha melhor versão. A minha mãe Lucir por ser o maior exemplo na minha vida, me ensinando a ser guerreira e persistente nos meus sonhos.

À Deus por ser meu guia e atender minhas orações, que no decorrer da jornada colocou pessoas iluminadas na minha vida, que deixaram os meus dias mais leves e descontraídos.

RESUMO

O trigo é o cereal mais consumido no mundo, sendo um alimento básico para dieta humana. O Brasil apesar de produzir toneladas deste grão, não é suficiente para suprir a demanda do país, necessitando a importação de outros países. Um dos gargalos da produção brasileira é o alto custo de fertilizantes químicos que poderiam ser parcialmente substituídos por bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV). Estas bactérias podem fixar N₂ atmosférico, aumentar a sanidade vegetal, produzir fitohormônios que estimulam o crescimento radicular redundando em uma maior superfície de absorção de nutrientes, promovendo maior crescimento vegetal. *Azospirillum brasilense* é uma proteobactéria gram-negativa, amplamente recomendada em diversas culturas e que possui diversas cepas registradas comercialmente. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense* com duas estirpes distintas AbV5/6 e HM053 com diferentes genótipos Biotrigo, quantificando características morfológicas e verificando as alterações na arquitetura radicular promovidas por esta associação. Na primeira fase foram investigados 8 genótipos Biotrigo, submetidos a 4 tratamentos diferentes, com e sem nitrogênio e com a bactéria *A. brasilense* AbV5/6. Na segunda fase foram selecionados 3 genótipos que apresentaram características de melhor e pior desempenho de crescimento, avaliados em 3 tratamentos: sem nitrogênio e com duas estirpes (AbV5/6 e HM053). Em ambas as etapas, as plântulas cresceram *in vitro* por 21 dias. Foram realizadas as seguintes análises: biomassa fresca e seca, medidas de área e perímetro pelos programas ImageJ e Winrhizo; nitrogênio total (NT%), população epifítica e endofítica. Também foi caracterizada a presença endofítica das estirpes por microscopia de varredura. Como resultados obtidos, pode-se concluir que as medidas morfológicas de comprimento, biomassa fresca e seca não foram eficientes para a distinção de genótipos responsivos ou não responsivos (modelos) à interação planta-bactéria. O uso dos parâmetros de área e perímetro radicular foram mais eficientes para selecionar 3 genótipos entre os 8 avaliados por uma performance distinta: G4 (com resposta negativa à presença de N₂ e/ou *Azospirillum*); G5 e G6 com a melhor e pior área e perímetro radicular na presença de *Azospirillum*, respectivamente. Os resultados demonstram que os genótipos de trigo responderam mais à presença de nitrogênio no meio de cultura do que propriamente à bactéria. As estirpes AbV5/6 e HM053 foram encontradas endofiticamente nos genótipos avaliados com formação de um maciço bacteriano promovido por uma população de 10⁷ a 10⁹ UFC.mL⁻¹. Os resultados da avaliação de área e perímetro radicular pelos softwares ImageJ e Winrhizo foram divergentes pela metodologia inerente a cada um, sendo que o Winrhizo obteve os maiores valores de área e perímetro radicular. Em relação ao efeito das estirpes bacterianas, a estirpe AbV5/6 aumentou a área e o perímetro radicular em todos os genótipos em relação ao controle, enquanto o HM053 diminuiu o perímetro do G4 e G5.

Palavras-chave: Trigo. Nitrogênio. Bactérias promotoras de crescimento vegetal. *Azospirillum brasilense*. AbV5/6. HM053.

ABSTRACT

Wheat is the most consumed cereal in the world, being a basic food for human diet. Despite producing tons of this grain, it is not sufficient to supply the country's demand, requiring imports from other countries. One of the bottlenecks of Brazilian production is the high cost of chemical fertilizers that could be partially replaced by bacteria promoting plant growth (BPCV). These bacteria can fix N_2 atmospheric, increase plant health, produce phytohormones that stimulate root growth in a higher surface of nutrient absorption, resulting in higher plant growth. *Azospirillum brasilense* is a Gram-Negative Proteobacteria, widely recommended in various cultures and has several commercially registered strains. The objective of this paper was to evaluate the effect of the inoculation of the bacteria *Azospirillum brasilense* with two distinct sparkles AbV5/6 and HM053 with different Biotrigo genotypes, quantifying morphological characteristics and checking changes in root architecture promoted by this association. In the first phase, 8 Biotrigo genotypes were investigated, submitted to 4 different treatments, with and without nitrogen and the Bacteria *A. brasilense* AbV5/6. In the second phase 3 genotypes were selected that had better and worse growth performance characteristics, evaluated in 3 treatments: without nitrogen and two strains (AbV5/6 and HM053). In both stages, seedlings grew in vitro for 21 days. The following analyzes were performed: fresh and dry biomass, area and perimeter measurements by Imagej and Winrhizo programs; Total nitrogen (NT%), epiphytic and endophytic population. Also characterized was the endophytic presence of scan microscopy strains. As obtained results, it can be concluded that the morphological measures of length, fresh and dry biomass were not efficient for the distinction of responsive or non-responsive genotypes (models) to plant-bacteria interaction. The use of root area and perimeter parameters were more efficient to select 3 genotypes among the 8 evaluated by a distinct performance: G4 (with a negative response to the presence of N_2 and/or *Azospirillum*); G5 and G6 with the best and worst root area and perimeter in the presence of *Azospirillum*, respectively. The results show that wheat genotypes responded more to the presence of nitrogen in the culture environment than to the bacteria. AbV5/6 and HM053 strains were found endophytically in the genotypes evaluated with a bacterial massive promoted by a population of 10^7 to 10^9 UFC.ML⁻¹. The results of the root area and perimeter evaluation by the Imagej and Winrhizo software were divergent by the methodology inherent in each one, and Winrhizo obtained the highest values of area and root perimeter. Regarding the effect of bacterial strains, AbV5/6 strain increased the area and root perimeter in all genotypes in relation to control, while HM053 decreases the perimeter of G4 and G5.

Keywords: Wheat. Nitrogen. Plant growth promoting bacteria. *Azospirillum brasilense*. AbV5/6. HM053.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 MATERIAL E MÉTODOS	18
2.1 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	18
2.1.1 Genótipos avaliados	18
2.1.1 Assepsia	19
2.1.3 Preparo do pré-inóculo e inóculo bacteriano	19
2.1.4 Tratamentos ou Condições aplicadas	20
2.2 PERFORMANCE DOS GENÓTIPOS FRENTE À INTERAÇÃO COM <i>A. BRASILENSE</i> ABV5/6 - 1ª ETAPA	21
2.2.1 Determinação biomassa seca e fresca	21
2.2.2 Determinação da superfície e área radicular	21
2.2.3 Determinação da população epifítica e endofítica	21
2.2.4 Determinação proteína total (NT)	22
2.2.5 Análises estatísticas	23
2.3 Análises morfológicas e da presença da bactéria nas raízes por imagens - 2ª etapa	23
2.3.1 Visualização da presença bacteriana por Microscopia ótica e eletrônica de varredura	23
3 RESULTADOS	24
3.1 Caracterização da promoção de crescimento vegetal pela presença de N ₂ e <i>A. brasilense</i> AbV5/6 - 1ª Etapa	24
3.2 Efeito de diferentes estirpes de <i>A. brasilense</i> sobre a promoção de crescimento vegetal em diferentes genótipos de trigo- 2ª Etapa	32
3.3 Análise microscópica das raízes	36
4 DISCUSSÃO	40
5 CONCLUSÃO	45
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

O trigo, por ser o principal cereal consumido no mundo, possui grande importância mundial, seguido pelo milho, depois arroz e aveia. No ano de 2022, a produção mundial foi de 800 milhões de toneladas (FAO, 2023). A produção brasileira de trigo, apesar de oscilar por sua grande susceptibilidade climática e econômica, vem aumentando ao longo dos anos. A produção de trigo na safra 2022/2023 foi de 10,5 Mt (USDA, 2024), com uma área pouco maior que 3,4 Mha, porém ainda demandando a importação de 3,34 Mt, para atender o mercado interno brasileiro (Abitrigo, 2024).

A produção deste cereal, tem como gargalo o custo dos fertilizantes químicos exigidos pela cultura (Lamlom, Irshad & Mosa, 2023). Uma das possibilidades para resolver este problema, seria o uso de fertilizantes microbianos ou inoculantes biológicos produzidos a partir de Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal (BPCV) (Wang *et al.*, 2024), podendo substituir parcialmente ou totalmente a aplicação de fertilizantes químicos (Alori & Babalola, 2018; Silva *et al.*, 2022).

Todas as plantas hospedam um pool de organismos no solo (bactéria, fungos, archaeas, protistas etc.), estes colonizam primeiramente a região radicular especialmente a rizosfera (porção do solo aderido às raízes); o rizoplano que é a superfície radicular em geral, a endosfera (região interna da raiz) e em menor extensão a filosfera (região ou superfície foliar) (Gamalero, Bona & Glick, 2022). A interação entre plantas e bactérias pode ser de diversos tipos: simbiose, associação, inibição e competição, com efeitos positivo, negativo ou neutro dos membros da microbiota (Madsen, Sørensen & Burmølle, 2018; Coniglio *et al.*, 2019; Naik *et al.*, 2019). Numa interação positiva, a microbiota endofítica deve apresentar um certo grau de intimidade, colonizando os tecidos mais internos e por isso geralmente é menor que a população epifítica (Gamalero, Bona & Glick, 2022).

Também no processo de interação, ocorre a secreção de exsudatos radiculares pelas plantas e o reconhecimento dessas moléculas por microrganismos presentes na microbiota, tornando esta associação mais restrita aos microrganismos específicos e mais próximos (Santoyo, 2022). O desenvolvimento radicular é altamente afetado pelo estabelecimento destas relações, haja visto que, ocorre a liberação de uma imensa quantidade de moléculas ou compostos pela microbiota, disponibilizando macro e micronutrientes e promovendo mudanças químicas na rizosfera e arredores

(pH, água, gradiente de oxigênio, e temperatura) (McBratney, Field & Koch, 2014; Di Benedetto *et al.*, 2017).

Azospirillum brasilense é uma proteobactéria gram-negativa, em forma de bastonete, podendo ser uni-flagelada (flagelo polar) com um movimento vibratório característico, quando crescidas em meio líquido e, quando crescidas em meio sólido, além do flagelo polar desenvolvem flagelos laterais adicionais (Coniglio *et al.*, 2019). São bactérias diazotróficas associativas endofíticas facultativas, mas que podem sobreviver no solo na forma de cistos (Moreira *et al.*, 2010). O gênero *Azospirillum* consiste em mais de 22 espécies (Cassán *et al.*, 2020a) e podem se associar com mais de 113 espécies vegetais de 35 famílias botânicas (Pereg, de-Bashan & Bashan, 2016), mostrando seu grande potencial para uso como inoculante biológico. A presença do *Azospirillum* pode favorecer às plantas principalmente pela sua capacidade de fixar o N₂ atmosférico, sintetizar fitohormônios (citocininas, giberelinas e auxinas, especialmente ácido indol-3-acético), solubilizar P e K entre outros de forma a alterar a arquitetura radicular (Cassán, Vanderleyden & Spaepen, 2014; Raffi & Charyulu, 2021a). Recentemente, um crescente número de estudos atribuiu um importante papel de *Azospirillum* na conferência à tolerância das plantas a estresses abiótico e biótico, mediados por fitohormônios que atuam como moléculas de sinalização (Pinski *et al.*, 2019; Rodriguez, 2023).

Embora diversas estirpes deste gênero tenham sido citadas na literatura (Pereg, de-Bashan & Bashan, 2016; Cassán *et al.*, 2020b), as estirpes AbV5 e AbV6 em separado ou juntas tem sido a base para a formulação de inoculantes no Brasil (Oliveira *et al.*, 2017a, 2022; Santos, Nogueira & Hungria, 2021; Scudeletti *et al.*, 2023). Recentemente uma nova estirpe mutante de *Azospirillum brasilense* HM053 foi apresentada como de maior capacidade excretora de amônia (Pedrosa *et al.*, 2020), porém ainda não foi avaliada experimentalmente na cultura do trigo, apesar de ter sido recentemente registrada comercialmente (Rodriguez, 2023).

Estudos sobre a interação de genótipos de trigo e BPCV são fundamentais para uma recomendação customizada da inoculação e ganhos produtivos maiores. As análises bioquímicas/fisiológicas assim como análises genômicas, podem nos ajudar a aumentar a compreensão de como ocorre uma interação eficiente entre as BPCV e cultivares de trigo, em especial as variedades brasileiras atualmente comercializadas em várias regiões do país. Vários trabalhos trazem a seleção de estirpes de *Azospirillum*

com maior aptidão associativa (Coniglio *et al.*, 2019; Raffi & Charyulu, 2021b; Santos, Nogueira & Hungria, 2021), a importância do genótipo vegetal para a interação, já que a planta pode recrutar uma microbiota específica pelos exsudados e metabolitos secretados (Arsac *et al.*, 1990; Araújo *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2022). Estudos relacionados à interação do gênero *Azospirillum brasilense* (AbV5 e 6) com cultivares de trigo CD 104 e a CD 120 (Neiverth, 2011; Furlan *et al.*, 2017) mostraram que as interações entre essas variedades e a bactéria são distintas, e afetadas pela presença ou não nitrogênio. Também, estudos realizados a campo em diversos cereais, mostram que esta interação pode ser percebida na produtividade (Oliveira *et al.*, 2017b; Zeffa *et al.*, 2019; Ludwig *et al.*, 2022) ou não (Galindo *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da interação de diferentes genótipos de trigo com a inoculação da bactéria *Azospirillum brasilense* com duas estirpes distintas AbV5/6 e HM053, *in vitro*, quantificando características morfológicas e verificando as alterações na arquitetura radicular promovidas por esta associação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo *in vitro*

2.1.1 Genótipos avaliados

O experimento *in vitro* foi conduzido no Laboratório de Bioquímica e Genética (LABIOGEN) da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, utilizando sementes de cultivares comerciais cedidas pela Biotrigo™, empresa de melhoramento genético de trigo, sediada em Campo Mourão, PR (Tabela 1). Neste estudo, foram avaliados oito genótipos comerciais de trigo em 2 etapas de avaliação: A 1ª etapa teve como objetivo determinar genótipos de melhor e a pior resposta associativa em termos de crescimento vegetal e, a 2ª etapa, a partir desses genótipos escolhidos, determinar diferenças na interação com 2 diferentes estirpes de *A. brasilense*.

Tabela 1. Descrição dos genótipos de trigo avaliados.

Genótipo/Cultivar	Nome Comercial	Ciclo	Classificação
1	TBIO Triunfo	Precoce	Pão

2	TBIO Motriz	Médio/Tardio	Pão/Melhorador
3	Biotrigo Titan	Médio	Pão/Melhorador
4	TBIO Audaz	Precoce	Melhorador
5	Biotrigo Talismã	Precoce	Melhorador
6	TBIO Calibre	Superprecoce	Pão/Melhorador
7	TBIO Blanc	Médio/Tardio	Branqueador
8	TBIO Ponteiro	Tardio	Pão

Superprecoce <90 dias; Precoce: 90 -110dias; Médio :110-130; Tardio>130 dias

2.1.2 Assepsia

Sementes de cada genótipo (G1 a G8) foram submetidas ao processo de assepsia utilizando solução de hipoclorito acidificado. Este procedimento envolveu imersão em álcool 70%, agitação por 1 min, aplicação de hipoclorito acidificado e agitação por 5 min seguido por lavagens em água destilada/autoclavada e um período de 4 h com água destilada/autoclavada na geladeira. As etapas 2 e 3 foram repetidas, com um intervalo de 5 min em peróxido de hidrogênio (35% p/v). Após a lavagem, as sementes foram dispostas para secar em uma placa Petri grande com papel filtro. Utilizando uma pinça, as sementes foram posicionadas em placas com ágar-água, armazenadas no escuro a 28°C por aproximadamente 24 h.

2.1.3 Preparo do pré-inóculo e inóculo bacteriano

Para a preparação do inóculo, foram utilizadas bactérias *Azospirillum brasilense* estirpes AbV5/6 e HM053 (cedidas pelo Prof Emanuel Maltempi de Souza-UFPR/Curitiba-PR). As bactérias foram replicadas e colocadas para crescer em meio NFB-lactato sólido. Com o auxílio de um palito, realizou-se a raspagem da bactéria, inserindo-a em tubos falcon com meio Dygs líquido, agitando no agitador em overnigthi. Em seguida, foram coletados 5 mL do meio Dygs e colocados em meio NFB-lactato, deixando em período noturno. O crescimento bacteriano foi quantificado em espectrofotômetro (660 nm) a concentração bacteriana foi ajustada para a concentração de 10⁶ UFC/semente.

2.1.4 Tratamentos ou Condições aplicadas

Foram testadas 4 condições de crescimento ou tratamentos: O tratamento 1 (T1) consistiu em meio MS sem nitrogênio e sem *A. brasilense* AbV5/6 (Controle); o tratamento 2 (T2) em meio MS completo, mas sem *A. brasilense* AbV5/6; o tratamento 3 (T3) em meio MS sem nitrogênio com *A. brasilense* AbV5/6; e o tratamento 4 (T4) em meio MS completo com *A. brasilense* AbV5/6. Em relação à composição nitrogenada, 1L de meio MS (Murashige e Skoog, 1962) completo continha 1,65 g de Nitrato de Amônia e 1,90 g de Nitrato de Potássio. O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso com 8 genótipos X 4 tratamentos X 40 repetições, totalizando 160 tubos.

Para cada tratamento, foram empregados 40 tubos contendo 25 mL do meio MS, com esferas de polipropileno usadas para sustentação das plântulas e vedadas por trouxinhas de algodão hidrofóbico. Sementes pré-germinadas em meio ágar-água foram transferidas para os tubos com o ápice germinativo orientado para o interior do substrato sólido. Os tubos foram acondicionados na câmara de cultivo, mantida a uma temperatura média de 25°C. No dia subsequente, as bactérias foram inoculadas nos tratamentos T3 e T4, com o inóculo sendo liberado diretamente sobre as sementes. Posteriormente, os tubos foram vedados novamente e colocados na câmara de cultivo, onde permaneceram por um período de 21 dias.

A 2ª etapa de avaliação foi realizada com apenas 3 genótipos escolhidos a partir da 1ª etapa. O experimento foi realizado de modo similar à 1ª etapa, porém, foram aplicadas apenas 3 condições de crescimento ou tratamentos: O tratamento 1 (T1) consistiu em meio MS sem nitrogênio e sem *A. brasilense* AbV5/6 ou HM053 (Controle); o tratamento 2 (T2) meio MS sem nitrogênio com *A. brasilense* AbV5/6 e; o tratamento 3 (T3) meio MS sem nitrogênio com *A. brasilense* HM053. De forma similar, foram usados 40 tubos contendo 25 mL do meio MS, com esferas de polipropileno usadas para sustentação das plântulas e vedadas por trouxinhas de algodão hidrofóbico. Sementes pré-germinadas em meio ágar-água foram transferidas para os tubos com o ápice germinativo orientado para o interior do substrato sólido. Os tubos foram acondicionados na câmara de cultivo, mantida a uma temperatura média de 25°C por 21 dias. O crescimento bacteriano e a inoculação foram realizadas conforme o item 2.1.3 e na inoculação, a concentração bacteriana também foi ajustada para a concentração de 10⁶ UFC/semente.

2.2 Performance dos genótipos frente à interação com *A.brasilense* AbV5/6 - 1ª etapa

2.2.1 Determinação biomassa seca e fresca

Decorridos 3 semanas de cultivo, as plântulas foram coletadas e avaliadas quanto ao comprimento (cm), a biomassa fresca e seca da parte radicular e aérea (g). Para a medição do comprimento foi utilizado uma régua métrica. Para a biomassa fresca, as plântulas foram pesadas em balança de precisão (Shumadzu Ltda). Posteriormente, as partes aéreas e radiculares foram acondicionadas em envelopes distintos e armazenadas na estufa para a secagem a 55°C por 72 h. Após este período, as plantas foram pesadas novamente, obtendo-se a biomassa seca. A biomassa seca da parte aérea foi reservada para a análise de proteína total. Na segunda etapa o experimento foi inteiramente casualizado sendo 3 genótipos X 3 tratamentos X 2 estirpes X 40 tubos, totalizando 120 tubos por genótipo.

2.2.2 Determinação da superfície e área radicular

Três plantas foram escolhidas para análise da superfície e área radicular. Para realizar esse procedimento, a parte radicular foi destacada das plântulas e disposta sobre o recipiente transparente para ser fotografada. Para o cálculo da área e superfície radicular foi usado o software ImageJ desenvolvido por Schneider, Rasband & Eliceiri (2012).

Na 2ª etapa de avaliação, a área e a superfície de raízes das plântulas, também foram avaliadas pelo software Winrhizo™ (Regent Instruments Inc., Quebec City, QC, Canadá) no laboratório de Proteômica, no departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Núcleo de Fixação de Nitrogênio, Centro Politécnico, UFPR/Curitiba-Pr. As raízes foram dispostas em um recipiente com água destilada, sendo colocadas dentro de um scanner (marca Epson), ao qual, com auxílio do software foram mensurados a área e a superfície das amostras.

2.2.3 Determinação da população epifítica e endofítica

Após 21 dias de inoculação, 3 tubos com plantas de cada tratamento foram selecionados aleatoriamente e submetidos a contagem microbiana epifítica e endofítica. Todo o processo foi realizado em câmara de fluxo laminar brevemente descrito: a raiz foi separada da parte aérea de cada planta. Na contagem epifítica, as raízes foram lavadas em água destilada e autoclavada, por 3 vezes, acondicionadas em tubos contendo solução de NaCl (0,9%) e levadas ao sonificador por 20 s. Desta solução salina, foram aliquoteados 100 µl e feitas 4 diluições em série. De cada diluição, foram plaqueadas 3 gotas de 5 µl cada, em meio NFB-Lactato sólido. As placas foram mantidas em estufa tipo B.O.D. por 48 h a 30 ± 2 °C. As contagens das unidades formadoras de colônias (UFC) obtidas foram realizadas em lupa estereoscópica (Quimis). Para a contagem endofítica, as raízes da contagem epifítica foram imersas em solução de HgCl₂ 0,01% durante 30 s, lavadas por 3 vezes com água destilada e autoclavada, maceradas em solução salina (0,9%) e levadas ao sonificador durante 20 s. De modo similar ao descrito acima, foi realizada a diluição (10^{-4} a 10^{-6}) seriada e plaqueamento para a contagem epifítica.

A confirmação molecular das espécies bacterianas da 1ª etapa foi realizada por reação em cadeia de polimerase (PCR), de uma região pertencente a região do rDNA 16S, específica para cada bactéria utilizando par de primers específicos AZO-F (5'-GCGGTAATACGAAGGGGGCKF-3') e AZO-R (5'-TTGTCACCGGCAGTTCCACCAG-3') (Shime- Hattori et al., 2011). Randomicamente, uma única colônia bacteriana obtida da contagem microbiana nos diferentes genótipos de trigo avaliados, foi transferida para um microtubo de PCR e ressuspensa em 20 µl de água ultrapura. As células foram lisadas por aquecimento a 96 °C por 6 min. O sobrenadante foi separado do lisado celular por breve centrifugação. A PCR foi realizada em um volume de 20 µl, utilizando 2 µl do DNA, Tampão de PCR 1x, 1,5 mM de MgCl₂, 0,4 mM do mix de dNTP, 1 unidade de Taq DNA Polimerase (Promega™) e 0,2 µM de cada primer. A reação foi realizada em termociclador ESCO (Esco Scientific). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose corados com brometo de etídeo a 0,5 µg. mL⁻¹ em Tampão TBE 1x (Tris-base 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0) e foto documentados em equipamento Loccus Biotecnologia LPIX. Foi utilizado padrão de tamanho molecular de 1Kb (Ludwig™).

2.2.4 Determinação proteína total (NT)

Foram coletadas as partes aéreas de cada tratamento secas em estufas de secagem a 50°C durante 72 h. Foi realizado a separação de três amostras com o peso igual (triplicata) totalizando 96 amostras com 0,25 gramas de biomassa, sendo maceradas em nitrôgenio líquido e reservadas para a análise de proteína bruta e nitrogênio total de acordo com o método de Kjeldahl descrito por Silva & Queiroz (2005). As análises foram feitas no laboratório de Nutrição Animal (LANA), UFPR- Setor Palotina/ Palotina-PR.

2.2.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, pelo programa estatístico Genes (Cruz, 2013).

2.3 Análises morfológicas e da presença da bactéria nas raízes por imagens- 2ª etapa

2.3.1 Visualização da presença bacteriana por Microscopia ótica e eletrônica de varredura

As raízes das plântulas após 21 dias de cultivo *in vitro*, foram selecionadas para obtenção de imagens de microscopia eletrônica no laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (UFPR/Setor Palotina), para confirmação da presença de bactérias endofíticas. Para a obtenção de imagens, as raízes em todos os tratamentos, foram lavadas com água ultrapura e depois postas em tampão fosfato de sódio 0,1M e glutaraldeído 2,5% (v/v), pH 7,2 por 24h. Após esse período as amostras foram transferidas para tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 10 min, esse último procedimento foi repetido 3 vezes.

Na sequência, as amostras passaram por uma série de desidratação alcoólica (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) de 10 min por duas vezes. As amostras foram divididas em partes conforme descrito por Li *et al.* (2019): zona meristemática, de alongação e de maturação, sendo que foi utilizada a região de maturação, considerada

como a região mais propícia para encontrar bactérias, pela presença dos pelos radiculares (James *et al.*, 2002; White *et al.*, 2014). Após o processo de desidratação, as amostras foram transferidas para recipientes de isopor® contendo nitrogênio líquido. Depois de congeladas, as amostras foram fraturadas com golpe de lâmina de barbear, sob superfície de metal, também congeladas com nitrogênio líquido (O'Donnell & Hooper, 1977; Sridhar *et al.*, 2011).

As partes seccionadas das raízes foram mantidas em álcool absoluto até o momento de utilização. Duas amostras de cada tratamento (T1, T2 e T3) foram selecionadas para ser fotografada no microscópio eletrônico de varredura VEGA3 TESCAN (TESCAN – República Tcheca).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização da promoção de crescimento vegetal pela presença de N₂ e *A. brasilense* AbV5/6 - 1ª Etapa

Os 8 diferentes genótipos de trigo avaliados apresentaram crescimento em todos os tratamentos aplicados (Figura 1), com diferenças no crescimento quanto às características morfológicas avaliadas. Quanto ao comprimento total das plantas (Figura 2A), no tratamento controle (T1) pobre em nitrogênio (N₂), o G2 apresentou o maior valor (49,50 cm) e os genótipos G6 e G7 (38 e 37 cm, respectivamente) tiveram os menores comprimentos totais para as plantas. No T2 (meio com adição de N₂), os genótipos que alcançaram os maiores valores para comprimento de planta foram G1 e G7, e o de menor comprimento foi o G6 (31,20cm). No T3, onde a presença da bactéria foi o diferencial pois o meio era sem o N₂, todos os genótipos apresentaram comprimento de planta similar. E, no T4 onde N₂ e *A. brasilense* foram aplicados, G1 e G7 (41,60 e 41,14 cm, respectivamente) apresentaram os maiores valores para comprimento, enquanto o de menor resposta foi G4 (30,60 cm). Comparando-se as médias entre tratamentos dentro do mesmo genótipo, apenas os genótipos G2 e G4 apresentaram médias de comprimento de planta reduzidas para os tratamentos T2, T3 e T4, nos demais genótipos não houve diferença significativa.

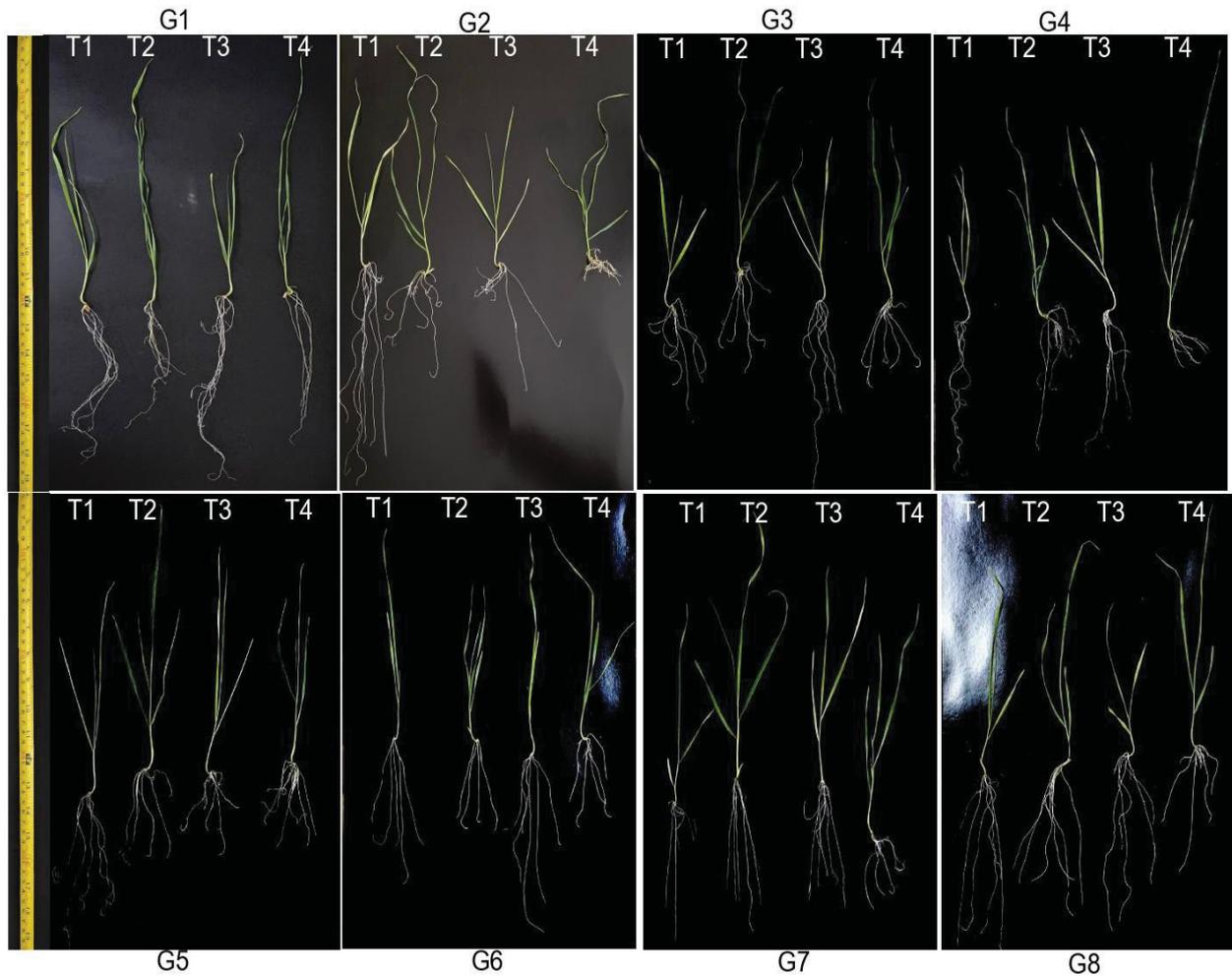


Figura 1. Aspecto visual das plântulas após 21 dias de cultivo *in vitro* nos 4 diferentes tratamentos aplicados em 8 genótipos avaliados.

Os resultados obtidos para a biomassa da planta inteira estão demonstrados na Figura 2B. A presença de N_2 influenciou o peso das plantas, haja vista que os tratamentos (T2 e T4) com adição de N_2 apresentaram as maiores médias independente do genótipo avaliado. Nos tratamentos sem adição de N_2 (T1 e T3) não houve diferença significativa entre os genótipos avaliados. No T2, onde N_2 foi aplicado no meio de cultura, G3 e G7 apresentaram os maiores pesos de plantas (0,48 e 0,46 g, respectivamente), enquanto G6 o menor peso (0,28g). No T4, com N_2 e *A. brasilense*, G3 foi o que apresentou a maior média (0,56g) e o G6, com a menor média (0,30g). Comparando-se os tratamentos dentro do mesmo genótipo, G4 e G7 não apresentaram diferenças entre os tratamentos e nos demais genótipos as médias de peso de planta nos tratamentos T2 e T4 foram significativamente maiores que às dos tratamentos T1 e T3.

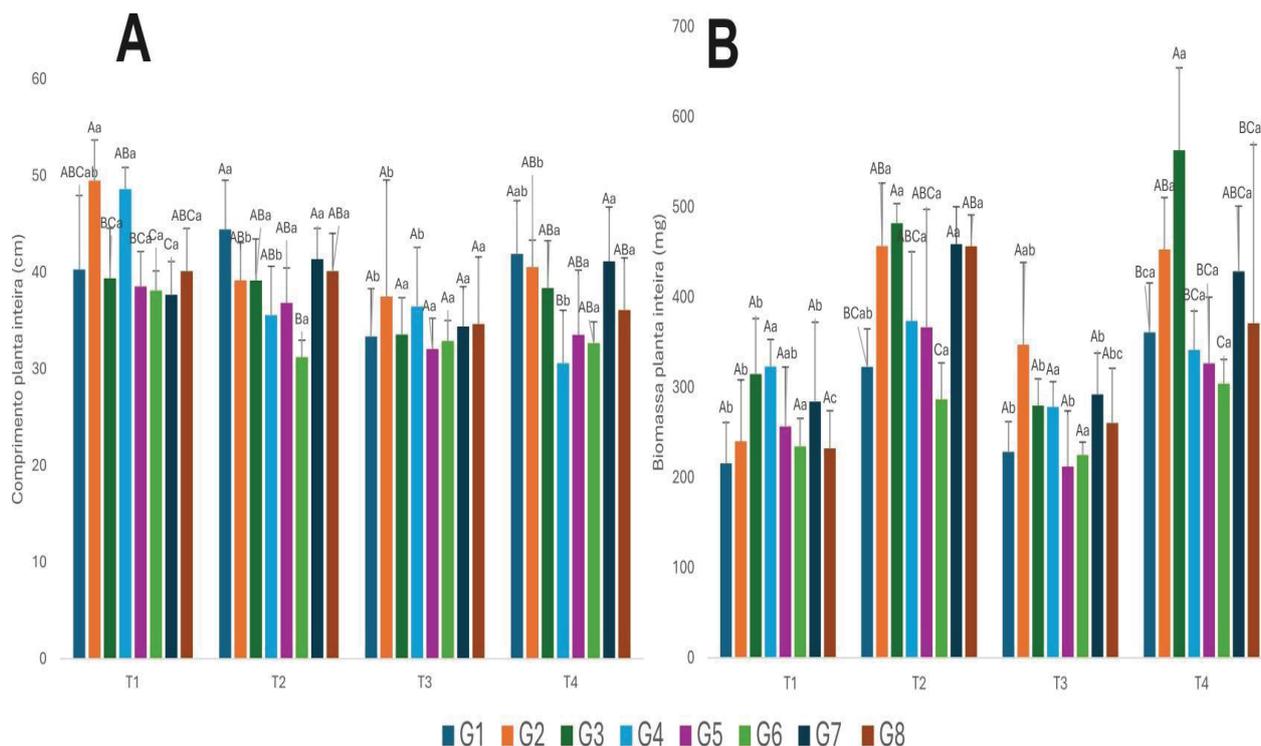


Figura 2. Avaliações morfológicas das plântulas inteiras após 21 dias de cultivo *in vitro*. A. Comprimento das plântulas B. Biomassa fresca das plântulas. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade (n=5). Letras maiúsculas diferem entre genótipos avaliados e letras minúsculas diferem entre os tratamentos aplicados.

Os dados obtidos para as biomassas fresca e seca da parte aérea estão demonstrados na figura 3. De modo similar ao observado para a característica peso total das plantas, não houve diferença significativa para os tratamentos T1 e T3 nos 8 genótipos avaliados (Figura 3A). A resposta diferenciada foi observada nos tratamentos com a presença de N₂ e/ou N₂ e *A. brasilense*: No T2, o G7 apresentou a maior média de biomassa fresca (353 mg) e o G6 a menor (212 mg), enquanto no T4, G3 (405 mg) foi o de maior peso fresco, e G5 e G6 (240 e 230 mg, respectivamente), foram as menores médias. Comparando-se as diferenças entre tratamentos dentro do mesmo genótipo, T2 e T4 promoveram os maiores pesos frescos em todos os genótipos avaliados comparando-se com os tratamentos sem N₂ ou *A. brasilense* (T1 e T3). Destaca-se o G3 que nos T2, T3 e T4 apresentaram médias de peso fresco aéreo superiores aos controles (T1). A mesma tendência foi observada para as biomassas secas da parte aérea (Figura 3B), onde não houve diferença significativa entre os genótipos avaliados, com exceção do G5 no T3, com média superior aos demais.

As avaliações realizadas para a parte radicular (biomassa fresca e seca) estão demonstradas na Figura 3C e D. Em relação à biomassa fresca, os diferentes genótipos avaliados não diferiram nos tratamentos T1, T2 e T4. Somente o G5 (T3) foi

significativamente distinto dos demais, com a maior média de biomassa fresca (235 mg) e a menor média (45 mg) do G6 (Figura 3C). Comparando-se os tratamentos dentro de cada genótipo, apenas o G5 no T3 apresentou média distinta das demais, e o G2, no controle (T1) com média de 54 mg, apresentou biomassa fresca de raiz cerca de 3x menor comparada aos tratamentos T2, T3 e T4. A biomassa seca apontou o G1, no tratamento controle (T1) como superior em comparação aos demais (18 mg) (Figura 3B). No T2, G3 (10,2 mg) e G6 (4 mg) apresentaram pesos contrastantes. Apesar do G5 ter apresentado o maior peso fresco da parte radicular no T3, este não foi o com maior biomassa seca (7 mg). G1 e G2 nos T1 e T3 (18 e 14,8 mg; 11,8 e 13,2 mg respectivamente) apresentaram maior biomassa seca que os tratamentos com N₂ e *A. brasilense*. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos para os demais genótipos avaliados.

A área (cm²) e o perímetro radicular (cm) foram obtidos usando-se o software ImageJ (Figura 4). Comparando-se a área radicular dos diferentes genótipos nas diferentes condições ou tratamentos avaliados (Figura 4A), observou-se que no T1 (controle), os genótipos com as maiores médias foram G3, G4 e G5 (1,66; 2,15 e 1,86 cm², respectivamente). No T2, destacou-se o G5 (1,80 cm²) com a maior média e o G6 (0,22 cm²) com a menor média de área radicular. No T3, onde somente *A. brasilense* foi presente, o G5 se destacou com área de 2,04 cm², enquanto as menores áreas foram dos genótipos G1 (0,42 cm²); G6 (0,27 cm²); G7 (0,59 cm²) e G8 (0,51 cm²). No T4, com N₂ e *A. brasilense*, o G5 apresentou a maior área radicular (2,04 cm²). Comparando-se o efeito dos tratamentos dentro dos genótipos, destacaram-se o G3, onde a área média radicular obtida para o T1 (1,66 cm²) foi maior que o do T2 (com N₂). O G4 apresentou a maior área radicular também no T1 (2,15 cm²) e o G5 apresentou uma área radicular significativamente maior (2,01 cm²) no T3 com *A. brasilense* em comparação com o T4 (com N₂ e *A. brasilense*) (1,54 cm²).

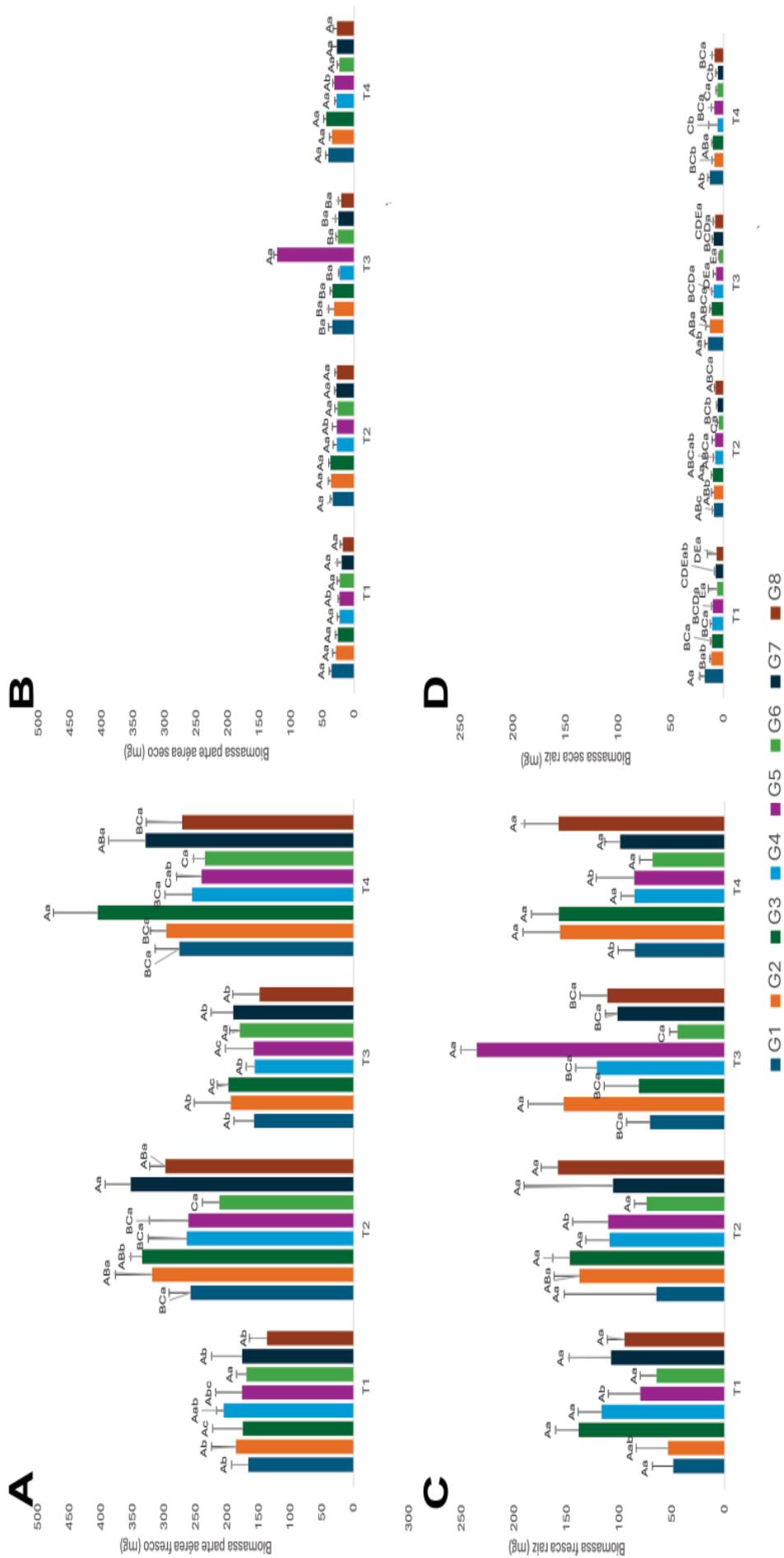


Figura 3- Avaliações morfológicas das plântulas após 21 de cultivo *in vitro*. A. Biomassa da parte aérea fresca. B. Biomassa da parte aérea das plântulas. C. Biomassa fresca radicular. D. Biomassa seca radicular. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade (n=5). Letras maiúsculas diferem entre genótipos avaliados e letras minúsculas diferem entre os tratamentos aplicados.

Os dados referentes ao perímetro radicular (cm) estão dispostos na Figura 4B. No T1, foi destaque o genótipo G4 (100,17 cm²). No entanto, o genótipo G5 apresentou os maiores valores para o perímetro radicular em todos os tratamentos: T1 (85,25cm²); T2 (83,52 cm²); T3 (94,99 cm²) e T4 (70,80 cm²). Foram destaques o genótipo G4 apresentando o T1 com o maior perímetro, diferindo dos demais tratamentos e o G7 com o perímetro em T3 de 53,23 cm e o menor em T2 (28,14 cm).

Em relação ao conteúdo de nitrogênio total avaliado na parte aérea das plântulas com 3 semanas de cultivo, podemos observar que a presença de N₂ no meio de cultura MS influenciou o valor deste parâmetro em todos os genótipos avaliados (Figura 5). Nos tratamentos com N₂ no meio de cultivo (T2 e T4), as plântulas apresentaram valores de NT% quase o dobro das plântulas nos tratamentos sem N₂. No T1 apenas os G6 e G8 tiveram valores distintos. No T2, G7 e G8 foram diferentes entre si. No T3, o G3 e G6 apresentaram média superior aos demais genótipos avaliados. E no T4, a maior média foi observada no G4. O G8 apresentou as menores percentagens de N₂ em todos os tratamentos aplicados, sendo que as médias de T2 e T4 foram distintas das T1 e T3, ressaltando a influência do N₂ no meio de cultura. Tendência similar teve o G3, cujas médias dos tratamentos com fonte nitrogenada (T2 e T4) foram superiores aos demais, porém T3 com *A. brasilense* sendo superior ao controle (sem N₂).

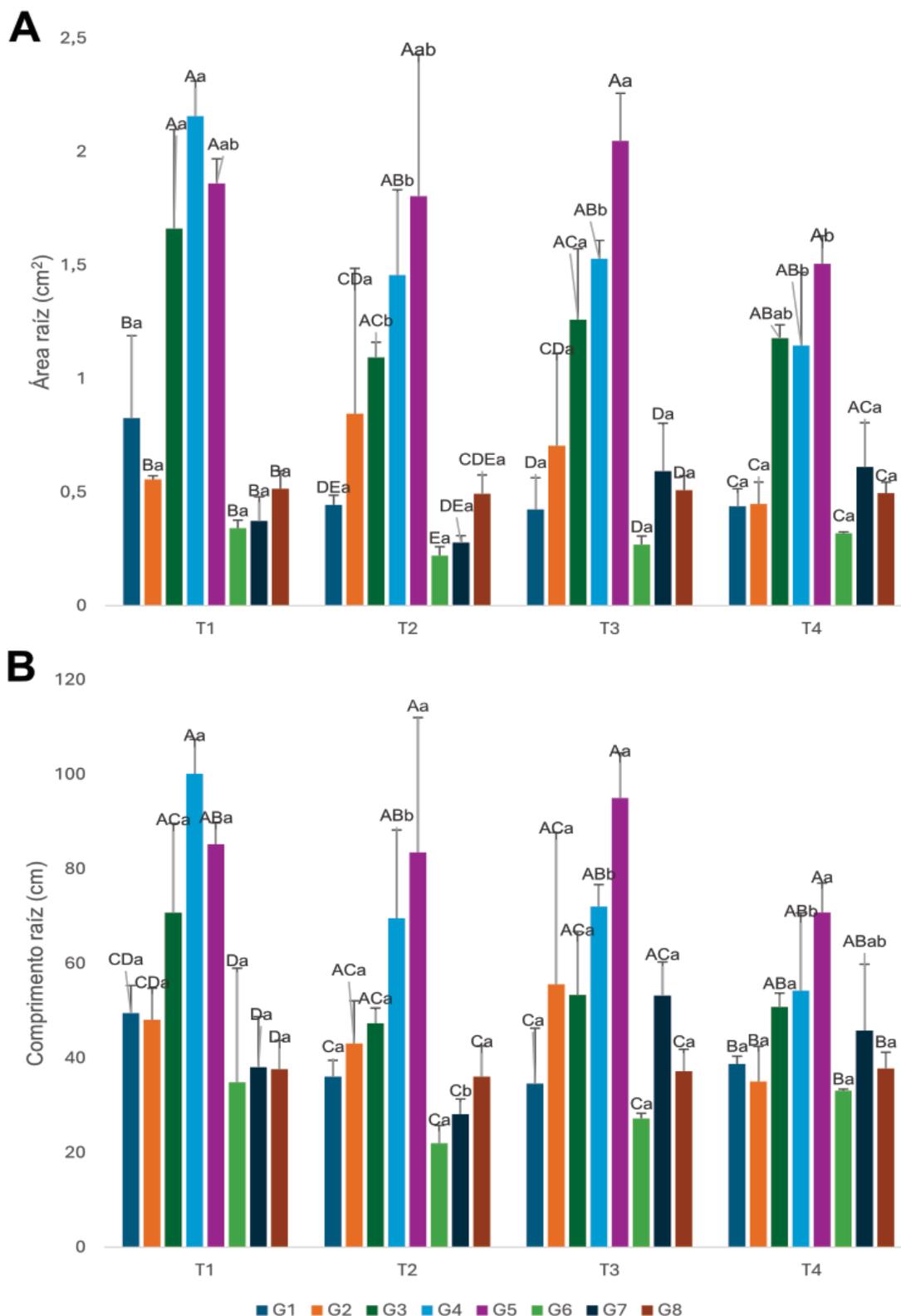


Figura 4- Avaliações da superfície radicular das plântulas após 21 de cultivo *in vitro*. A. Área raiz. B. Perímetro radicular. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade (n=5). Letras maiúsculas diferem entre genótipos avaliados e letras minúsculas diferem entre os tratamentos aplicados.

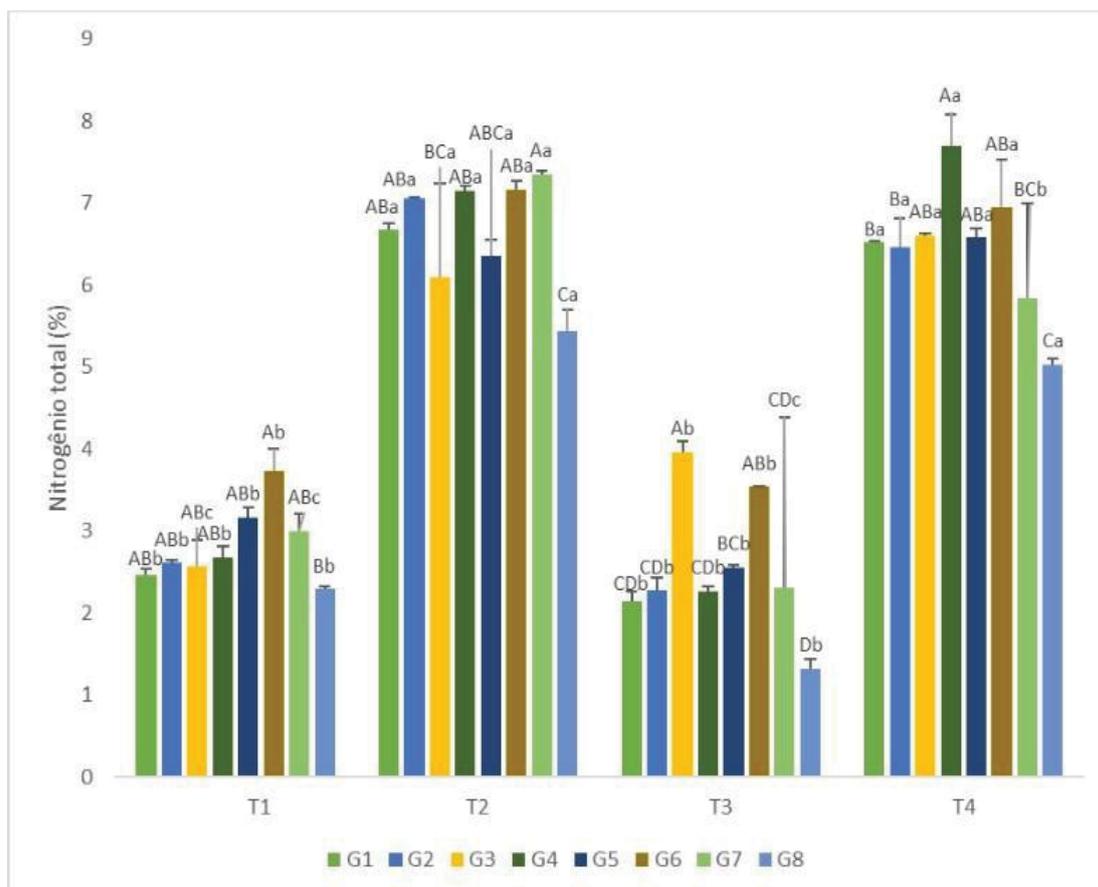


Figura 5- Resultados do conteúdo de nitrogênio total das plântulas avaliadas. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade ($n=5$). Letras maiúsculas diferem entre genótipos avaliados e letras minúsculas diferem entre os tratamentos aplicados

A população epi e endofítica das plantas ensaiadas estão demonstradas na Tabela 2. A ordem de grandeza variou de 10^7 a 10^9 unidades formadoras de colônias por mL (UFC.mL^{-1}), sendo que a população epifítica foi maior que a endofítica. Os tratamentos T1 e T2 não apresentaram crescimento de bactérias *A. brasilense*. Todos os genótipos avaliados mostraram crescimento epi e endofítico nos tratamentos T3 e T4. Para confirmar o gênero das bactérias epi e endofiticamente aderidas foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR) com primer específico (Figura 6). Isolados randomicamente escolhidos apresentaram o padrão de banda esperado (648pb) para o gene filogenético rRNA16S confirmando a presença no tecido radicular.

Tabela 2. População epi e endofítica das plantas cultivadas *in vitro* e inoculadas com *A. brasilense*.

Genótipo	Tratamento	Endofítica		Epifítica	
		Média ± DP	UFC.mL ⁻¹	Média ± DP	UFC.mL ⁻¹
G1	3	1,17±0,63	2,34.10 ⁸	2,00±2,18	4,00.10 ⁸
	4	1,58±0,76	3,16.10 ⁸	3,00±0,25	6,00.10 ⁸
G2	3	0,17±0,29	3,40.10 ⁷	0,42±0,52	8,40.10 ⁷
	4	1,67±1,28	3,34.10 ⁸	1,00±0,25	2,00.10 ⁸
G3	3	3,50±5,63	7,00.10 ⁸	0,83±0,14	1,66.10 ⁸
	4	2,00±1,30	4,00.10 ⁸	3,42±2,38	6,84.10 ⁸
G4	3	0,17±0,29	3,40.10 ⁷	6,08±10,5	1,21.10 ⁹
	4	0,67±0,76	1,34.10 ⁸	1,00±0,66	2,00.10 ⁸
G5	3	0,25±0,00	5,00.10 ⁷	1,00±1,73	2,00.10 ⁸
	4	0,33±0,14	6,60.10 ⁷	0,08±0,14	1,60.10 ⁷
G6	3	0,08±0,14	1,60.10 ⁷	0,25±0,25	5,00.10 ⁷
	4	0,08±0,14	1,60.10 ⁷	1,00±0,66	2,00.10 ⁸
G7	3	0,25±0,00	5,00.10 ⁷	0,58±0,29	1,16.10 ⁸
	4	0,08±0,14	1,60.10 ⁷	0,50±0,50	1,00.10 ⁸
G8	3	7,58±13,1	1,51.10 ⁹	0,08±0,14	1,60.10 ⁷
	4	0,25±0,25	5,00.10 ⁷	0,58±0,80	1,16.10 ⁸

DP-Desvio padrão N=3. UFC: Unidade Formadora de Colônia. Tratamento 3, meio MS sem nitrogênio com AbV5/6. Tratamento 4, meio MS completo com AbV5/6.

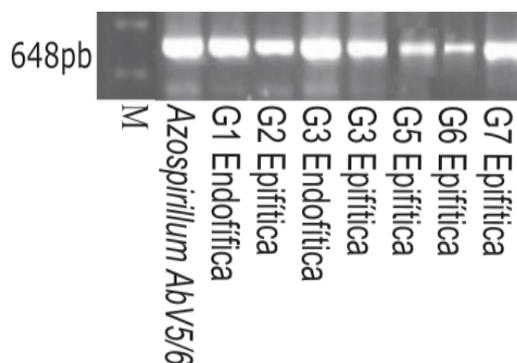


Figura 6. Padrão de banda encontrado para o gene filogenético rDNA 16S. M-Marcador molecular (1Kb). G1-G7: genótipos avaliados.

3.2 Efeito de diferentes estirpes de *A. brasilense* sobre a promoção de crescimento vegetal em diferentes genótipos de trigo - 2ª Etapa

Os resultados morfológicos relativos ao crescimento *in vitro* das plantas dos genótipos G4, G5 e G6 estão demonstrados na Figura 7. Não houve diferença

significativa entre os genótipos avaliados em relação a biomassa fresca da planta inteira, comprimentos da planta inteira, da raiz e da parte aérea. Porém, no G5, a estirpe AbV5/6 diminui o comprimento da planta inteira e o comprimento radicular (Figura 8A e C). De modo similar, o G6 foi menor apenas para o comprimento radicular na presença da estirpe AbV5/6 (Figura 8C).

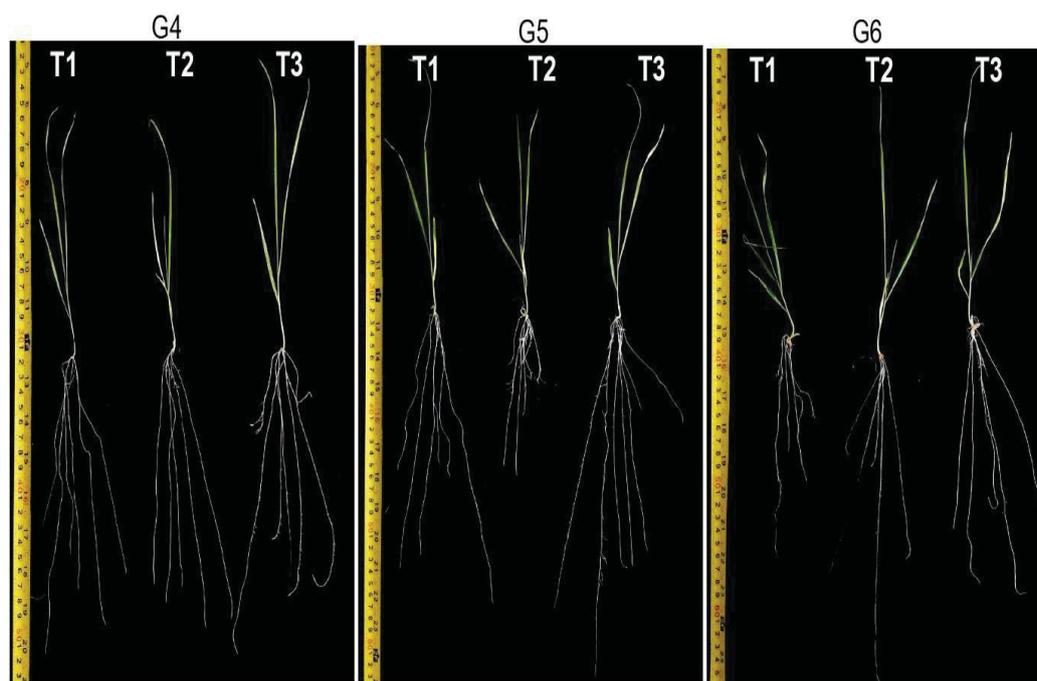


Figura 7. Aspecto visual das plântulas após 21 dias de cultivo *in vitro* nos diferentes tratamentos aplicados aos genótipos selecionados.

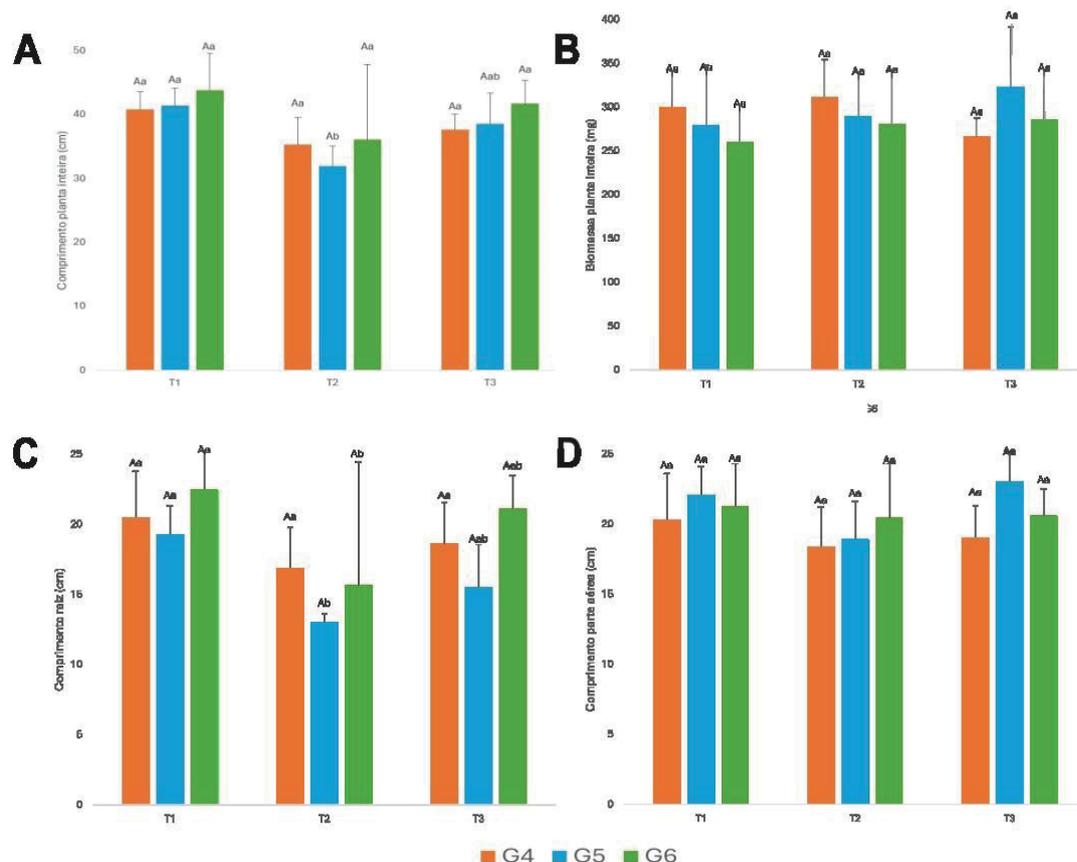


Figura 8. Avaliação morfológica das plântulas inoculadas com diferentes estirpes de *A. brasilense*. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade ($n=5$). A e B. Comprimento e biomassa da planta inteira. C e D. Comprimento radicular e da parte aérea. Letras maiúsculas diferem entre genótipos avaliados e letras minúsculas diferem entre os tratamentos aplicados.

As medidas de biomassa fresca da parte aérea e radicular não diferiram entre os genótipos avaliados (Figura 9A e C). De modo similar, não houve distinção entre os tratamentos ou genótipos avaliados quanto a biomassa seca da parte aérea. O genótipo G6 apresentou menor biomassa seca em todos os tratamentos, em relação aos outros genótipos avaliados, porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos aplicados (estirpes) (Figura 9D).

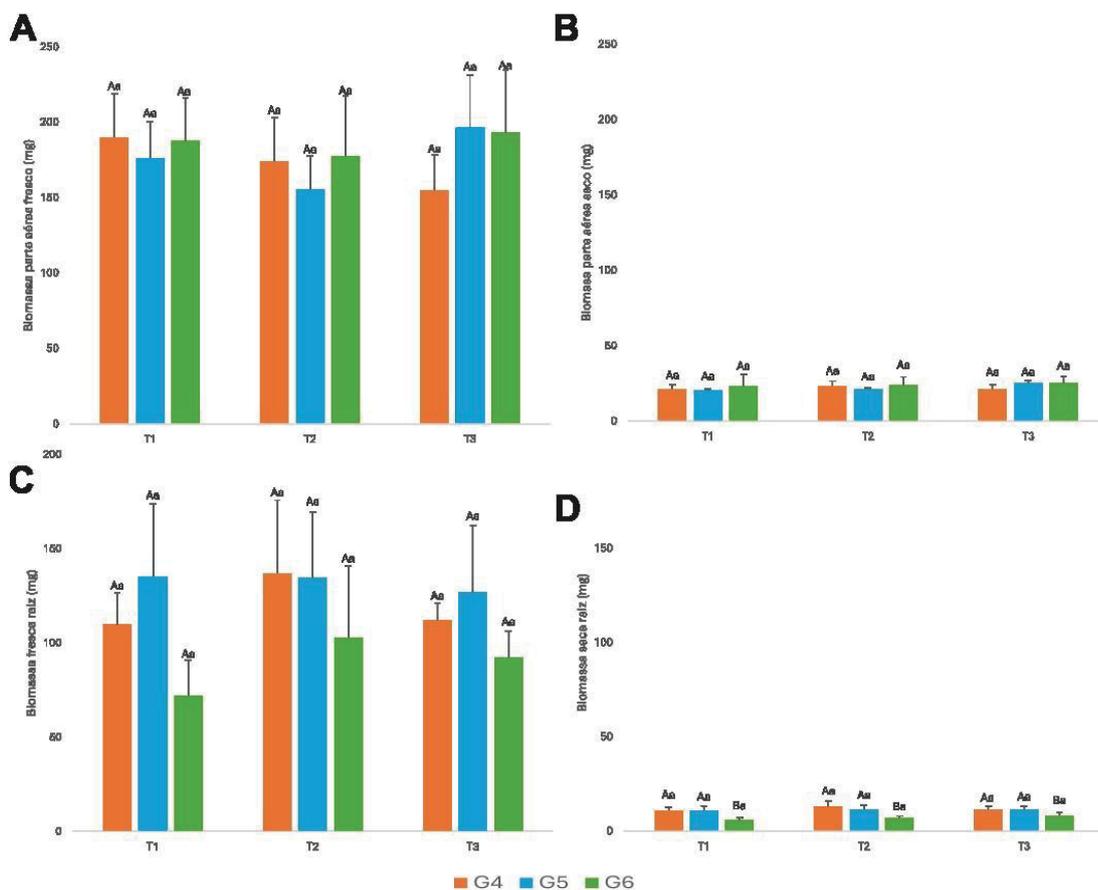


Figura 9. Avaliação morfológica dos genótipos com diferentes estirpes de *A. brasilense*. A. Biomassa fresca da parte aérea. B. Biomassa seca da parte aérea. C. Biomassa fresca parte radicular. D. Biomassa seca da parte radicular. Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade (n=5). Letras maiúsculas diferem entre genótipos avaliados e letras minúsculas diferem entre os tratamentos aplicados.

A quantificação da população epi e endofítica das plantas inoculadas com as diferentes estirpes estão demonstrados na Tabela 3. A população encontrada aderida externa e internamente variou de 10^7 a 10^9 UFC.mL⁻¹. Os genótipos G4 e G5 apresentaram a maior população epifítica ($1,21 \cdot 10^9$ - $1,34 \cdot 10^8$), enquanto o G6 a menor população. A população endofítica foi similar pela ordem de grandeza (10^7) em todos os genótipos e estirpes avaliadas.

Tabela 3. População epi e endofítica das plantas cultivadas *in vitro* e inoculadas com duas estirpes de *A. brasilense*.

Genótipo	Tratamento	Endofítica		Epifítica	
		Média ± DP	UFC.mL ⁻¹	Média ± DP	UFC.mL ⁻¹
G4	2	0,17±0,29	3,40.10 ⁷	6,08±10,5	1,21.10 ⁹
	3	0,42±0,38	8,40.10 ⁷	0,50±0,43	1,00.10 ⁸
G5	2	0,17±0,29	3,40.10 ⁷	6,08±10,5	1,21.10 ⁹
	3	0,42±0,14	8,40.10 ⁷	0,67±0,38	1,34.10 ⁸
G6	2	0,08±0,14	1,60.10 ⁷	0,25±0,25	5,00.10 ⁷
	3	0,17±0,14	3,40.10 ⁷	0,33±0,44	6,60.10 ⁷

DP-desvio padrão. N=3. UFC: Unidade Formadora de Colônia. Tratamento 2, meio MS sem nitrogênio com AbV5/6. Tratamento 3, meio MS sem nitrogênio com HM053.

3.3 Análise microscópica das raízes

Foi observada a presença das 2 estirpes de *A. brasilense* em raízes das plântulas de trigo inoculadas internamente na região de maturação (Figura 10). Um maciço bacteriano (biofilme) foi observado especialmente próximo aos vasos xilemáticos na mesma região (aumentos de 5x e 10x), proporcionalmente ao aumento ótico, em todos os 3 genótipos avaliados (Figuras 10-12).

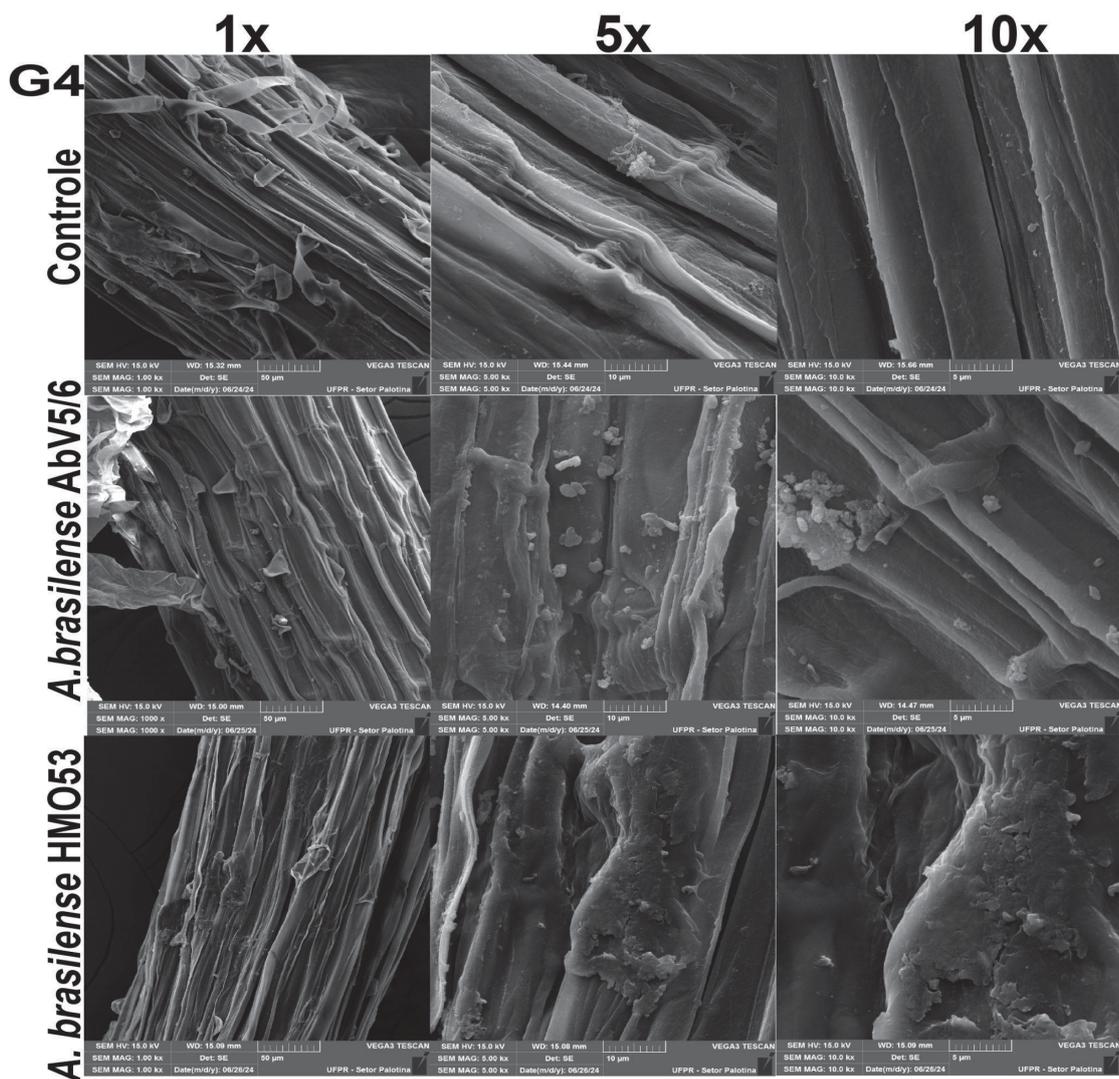


Figura 10. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfície interna de raiz de trigo (região de maturação) do genótipo 4 inoculada com *A. brasilense* AbV5/6 e HMO53.

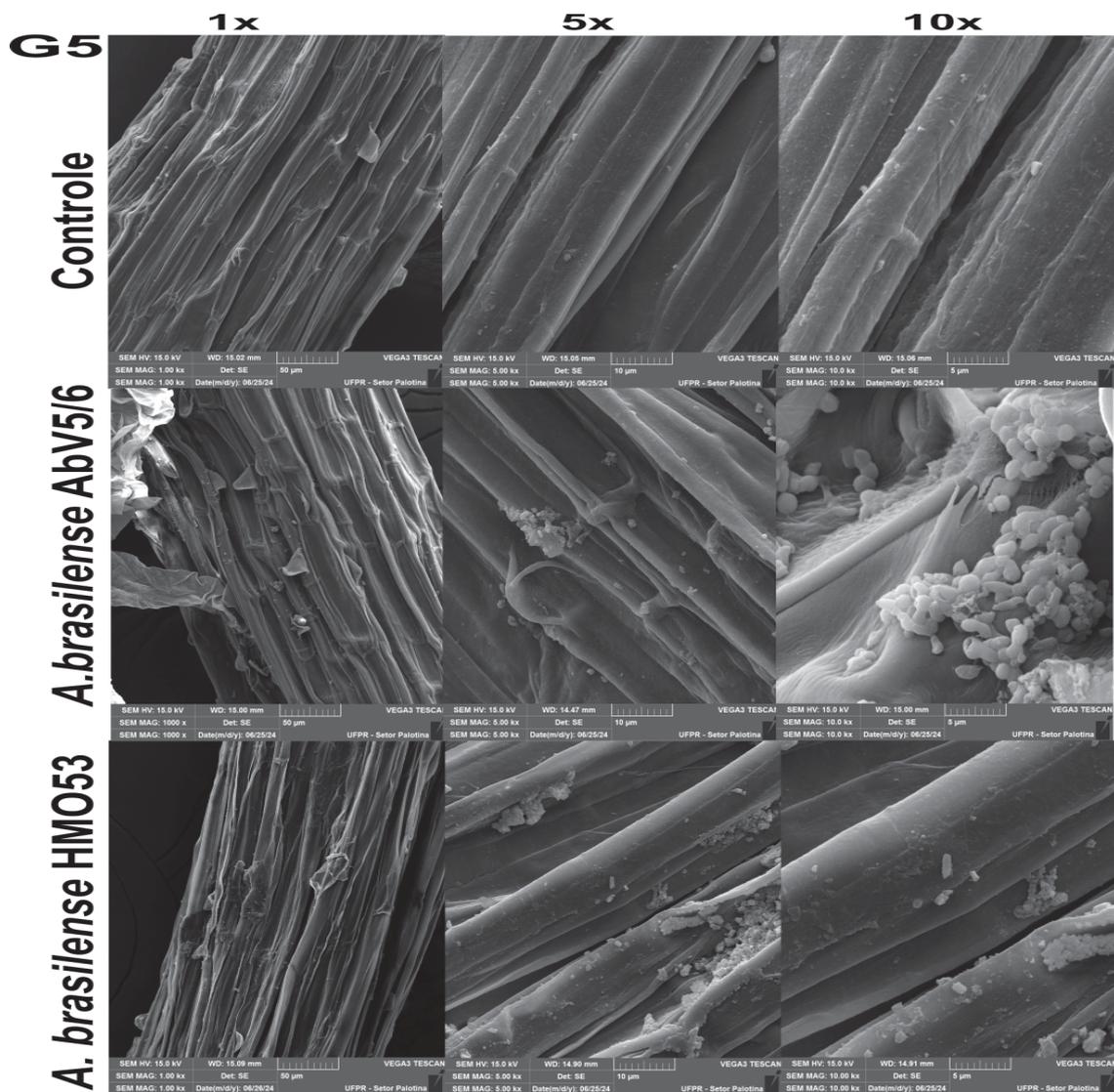


Figura 11. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfície interna de raiz de trigo (região de maturação) do genótipo 5 inoculada com *A. brasilense* AbV5/6 e HM053.

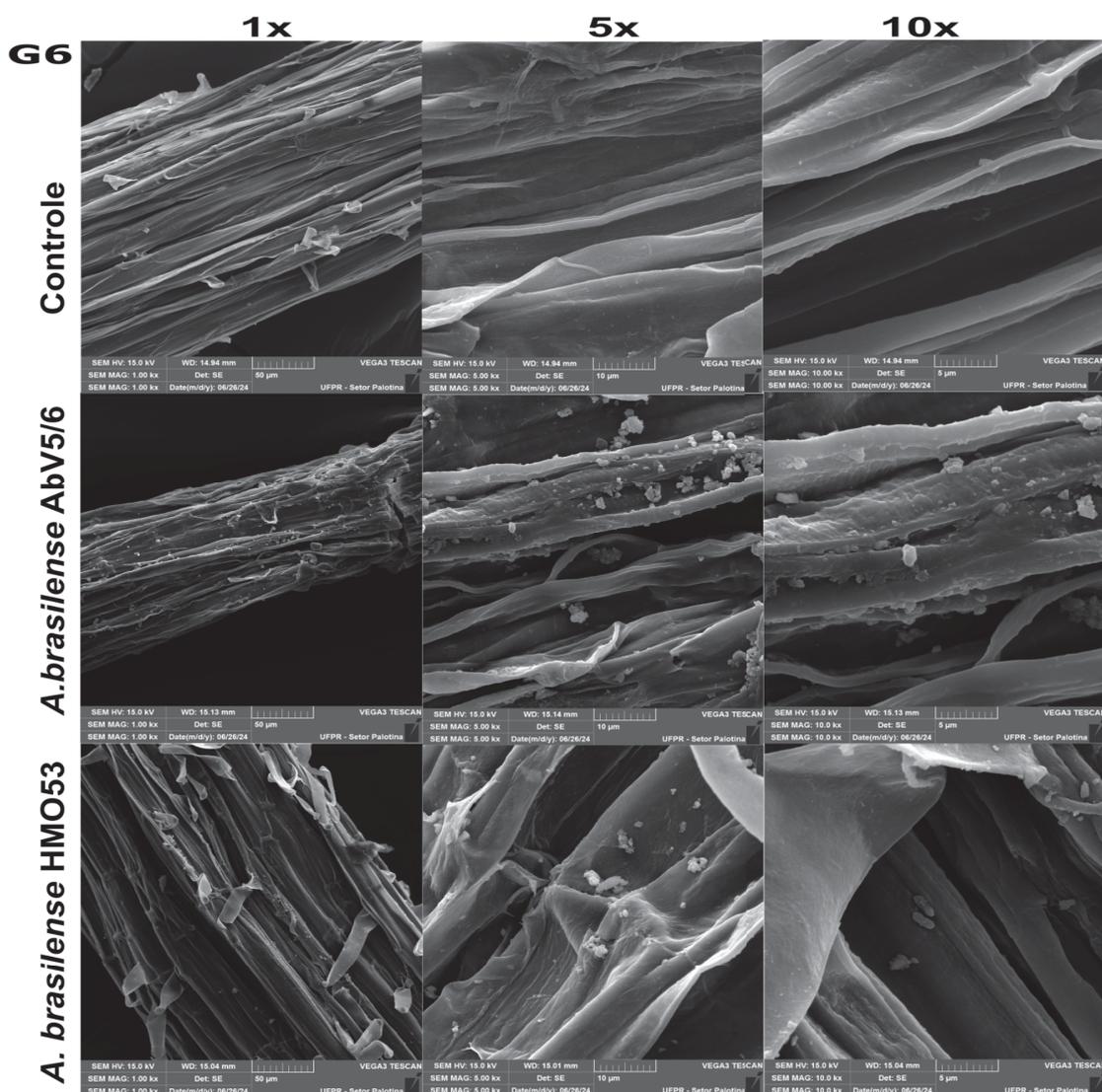


Figura 12. Imagem de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de superfície interna de raiz de trigo (região de maturação) do genótipo 6 inoculada com *A. brasilense* AbV5/6 e HM053.

Os dados obtidos para a comparação entre as metodologias de análise de área e perímetro radicular estão demonstrados na Tabela 4. Podemos observar uma diferença na ordem de grandeza entre as metodologias aplicadas, inerente à metodologia de cada software. Os dados de área e perímetro obtidos pelo ImageJ mostram que o G4 apresentou os maiores índices dentre os genótipos avaliados no T1 (controle). Houve uma diminuição de área e perímetro, especialmente quando HM053 foi inoculada, principalmente no G5. Não houve diferença entre os genótipos inoculados com a estirpe AbV5/6. Por outro lado, os resultados da quantificação de área obtidos pelo software Winrhizo não apresentaram diferenças entre os genótipos avaliados. E, os dados obtidos para o perímetro apontam uma diminuição do perímetro no genótipo G5 pela presença

da estirpe HM053. E, o G6 apresentou um menor perímetro na presença da estirpe AbV5/6.

Tabela 4. Comparação das medidas de área e perímetro em duas metodologias diferentes.

Parâmetros	Genótipos	ImageJ			WhinRhizo		
		Controle	AbV5/6	HMO53	Controle	AbV5/6	HMO53
Área (cm ²)	G4	2,15Aa	1,86Aa	0,34Bb	19,74Aa	21,42Aa	17,22Aa
	G5	1,52Bb	2,04Aa	0,27Cb	14,87Aa	18,71Aa	16,51Aa
	G6	1,19Bb	2,17Aa	1,23Ba	19,55Aa	15,58Aa	15,39Aa
Perímetro(cm)	G4	100,17Aa	85,25Aa	34,91Bb	225,56Aa	271,34Aa	142,78Ba
	G5	72,08Bb	94,99Aa	27,25Cb	169,68Bb	230,02Aab	178,04Ba
	G6	70,36Bb	89,64Aa	72,71Ba	178,63Ab	186,78Ab	167,23Aa

Médias seguidas de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, com 5% de probabilidade (n=3). Letras maiúsculas diferem entre tratamentos avaliados e letras minúsculas diferem entre os genótipos.

4.DISSCUSSÃO

Um dos requisitos para que uma estirpe bacteriana seja considerada como potencial endofítico e benéfico é que esta apresente uma eficiente colonização radicular. A colonização inclui o reconhecimento e desencadeamento de vias de sinalização; entrada do microrganismo por pequenos orifícios entre células/parede celular e da interação positiva entre hospedeiro e o microrganismo (Silva Pankiewicz *et al.*, 2021). Vários fatores podem influenciar a resposta da estirpe bacteriana, e na literatura, vários autores relatam que a interação planta e bactéria como genótipo dependente de ambos- hospedeiro e estirpe bacteriana (Cheplick & Cho, 2003; Neiverth, 2011; Vargas *et al.*, 2014; Duflos, Vaillau & Roux, 2024). Deste modo, encontrar genótipos ou cultivares com resposta positiva e negativa para a interação (genótipos modelos) são importantes no processo de isolamento, caracterização e recomendação de gêneros bacterianos com potencial de promoção de crescimento vegetal (Neiverth, 2011; Ghimire *et al.*, 2023).

Neste estudo, foram avaliados 8 genótipos de trigo em cultivo *in vitro* frente a associação com *Azospirillum brasilense*, na presença e ausência de nitrogênio, avaliando caracteres morfológicos referente ao crescimento do trigo. Foi observado que a presença de N₂ (T2) e N₂ e *A. brasilense* (T4) promoveram incrementos consideráveis na biomassa fresca total, da parte aérea e radicular da maioria dos genótipos avaliados (Figuras 2 e 3). Este aumento ocorreu mais em função da presença do N₂ do que pela presença da bactéria, uma vez que no T3 (inoculado com *A. brasilense*), os genótipos apresentaram valores similares ao controle (T1). Estes resultados são corroborados pela % de N₂ total encontrada nas folhas (Figura 5) e pelo fato de que é bem conhecido que a aplicação de fertilizantes químicos nitrogenados aumenta o conteúdo de N₂ total das folhas (Fathi, 2022). Deuner *et al.* (2008) citam que em plantas de milho, o fornecimento de ureia a 1,0% via solo proporcionou aumento significativo no teor de proteínas nas folhas. Lemos *et al.* (2013), ao avaliarem 5 genótipos de trigo em vaso com e sem inoculação com diferentes níveis de N₂, observaram que o maior efeito no crescimento foi conjugado com o maior nível de N₂ usado e a bactéria por si só não foi efetiva em substituir a presença deste nutriente.

Parâmetros morfológicos como comprimento da planta inteira, biomassa seca e fresca da parte aérea e radicular não foram eficazes para a determinação de um genótipo com melhor ou pior resposta à presença de N₂, *A. brasilense* ou ambos. Como exemplo das inconstâncias nas performances dos genótipos, na presença de somente N₂ no meio de cultura, o G7 apresentou a maior biomassa fresca da parte aérea, porém não apresentou a maior biomassa fresca da parte radicular, nem maior % NT e/ou a maior área e perímetro radicular (Figura 3A e C, Figura 5). A presença da bactéria e do N₂ (T4) trouxe acréscimos em comparação ao T2 somente em alguns genótipos como o G3, mas este aumento foi observado somente na biomassa fresca da parte aérea (18%) e radicular (6%), no entanto, os resultados de biomassa seca foram similares. E, o G3 não apresentou os maiores resultados para a área ou perímetro radicular (Figura 4) porém apresentou %NT maior quando a bactéria estava presente (T3). De modo similar, os parâmetros morfológicos não foram eficientes para a distinção de genótipos na presença de 2 diferentes estirpes de *A. brasilense* (Figura 8 e 9).

A superfície ou arquitetura radicular tem sido usada como critério de seleção de genótipos de trigo responsivos à seca (Rahnama *et al.* 2024); relativo ao vigor das

plântulas e acúmulo de nutrientes (Liu *et al.*, 2021) e da interação hospedeiro (planta) (Silva Pankievicz *et al.*, 2021; Gamalero, Bona & Glick, 2022). Deste modo, as medidas de área e perímetro radicular foram escolhidas para a seleção de genótipos com a maior/menor resposta.

Uma resposta positiva à presença da bactéria foi observada no genótipo G5 (Biotrigo Talismã), que apresentou a maior área e perímetro radicular (Figura 4) e uma maior biomassa fresca radicular em T3 (Figura 3C). De modo contrário, o G6 (TBIO Calibre) apresentou a menor área e perímetro radicular e biomassa fresca radicular, sendo considerado de resposta negativa à presença da estirpe (Figura 3C). Também nesta seleção foi incluído o G4 (TBIO Audaz) como de resposta negativa, já que apresentou uma redução de área e perímetro pela presença de *N₂*. *A. brasilense* AbV5/6 e ambos (Figura 4). Estes foram escolhidos para a avaliação do efeito de diferentes estirpes (AbV5/6 e HM053) no crescimento radicular das plantas, a 2ª etapa de avaliações.

Algumas características agrônômicas e classificação industrial dos genótipos escolhidos estão demonstradas na Tabela 1. G4 e G5 são cultivares melhoradoras da farinha, enquanto G6 é melhorador e apto para panificação. Estas cultivares TBIO Audaz (G4), Biotrigo Talismã (G5) e TBIO Calibre (G6) são cultivares comerciais e apresentam ciclo precoce, precoce e superprecoce, respectivamente e todos apresentam estatura baixa.

A comparação entre os resultados obtidos para o G5 nos tratamentos nitrogenados (T2 e T4) e *A. brasilense* AbV5/6 (T3) permitem concluir que, apesar de *A. brasilense* ter a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, a maior contribuição desta estirpe foi para sua capacidade de estimular crescimento por fito-hormônios e outros efeitos do que a fixação biológica propriamente dita (Hungria *et al.*, 2010). Embora sem poder comparativo devido ao sistema de cultivo, Kazi *et al.* (2016) em estudos realizados à campo não encontraram diferenças na biomassa e produtividade de 5 genótipos de trigo com 3 estirpes de *A. brasilense* (Sp7, Sp7-S, Sp245).

O banco de germoplasma da Biotrigo descende da OR sementes e a primeira cultivar Biotrigo lançada foi a TBio Pioneiro em 2010. Em 2017, novas cultivares foram introduzidas no mercado brasileiro por cruzamentos com cultivares de origem (genética) francesa visando principalmente maior estabilidade na produção, tolerância à

germinação na espiga, acamamento e diversas doenças (Biotrigo, 2023). Deste modo, pode-se concluir que os genótipos utilizados neste estudo, apresentam base genética similar e, portanto, devendo apresentar uma mesma performance de resposta à interação. Valente *et al.* (2020) ao testarem 200 variedades e cultivares de trigo ancestrais e modernos, observaram que a interação entre o gênero *Pseudomonas kilonensi* F133 foi maior nos acessos ancestrais usados. Os autores citam que o melhoramento moderno selecionou genótipos com uma menor capacidade de interação com este gênero. Tkacz *et al.* (2020) estudaram a microbiota de trigos ancestrais selvagens, modernos (com aptidão de panificação e massa) e híbridos sintéticos. Os autores observaram uma microbiota similar em nível de filo, porém com gêneros bacterianos específicos para os ancestrais e para os genótipos modernos.

Vários autores citam que o genótipo da planta tem uma grande influência na composição da microbiota rizosférica e por conseguinte na sua função podendo afetar a performance produtiva das mesmas (Peiffer *et al.*, 2013; Jacquiod *et al.*, 2022). O genótipo determina o tipo de exsudato e este, determina quais gêneros bacterianos estariam mais próximos da rizosfera, interagindo com a planta (Hu *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos apontam que ambas as estirpes foram capazes de colonizar as plântulas com uma grande população (10^7 a 10^9 UFC.mL⁻¹) (Tabela 3) de modo epifítico e endofítico (Figuras 10 e 11). Estes resultados demonstram que não houve diferenciação tanto de estirpe como de hospedeiro na interação planta-bactéria. No entanto, as medidas de área e perímetro feitas pelos softwares, apontam para um aumento de área e perímetro nos genótipos G5 e G6 (Image J- Tabela 4) pela presença da estirpe AbV5/6. Os dados obtidos no software Winrhizo não distinguiu os genótipos em relação à área, porém o G5 aumentou o perímetro radicular na presença da estirpe AbV5/6.

A presença de uma massa bacteriana ou biofilme foi observado em todos os genótipos de trigo avaliados, bem como quando as 2 estirpes de *A. brasilense* foram inoculadas (Figuras 10 e 11). Biofilmes são estruturas complexas de células microbianas que aderem a uma superfície e são cercados por uma matriz polimérica extracelular. É definido como um agregado microbiano complexo incorporado em uma matriz polimérica extracelular hidratada (EPS) (Gupta, Snehi & Singh, 2017). Os resultados obtidos estão em concordância com a natureza endofítica de gênero *Azospirillum* (Nievas *et al.*, 2023),

bem como, a habilidade deste gênero em formar biofilme bacteriano internamente aderido às plantas (Saul Burdman, Yaacov Okon & Edouard Jurkevitch, 2000). A população bacteriana nas plantas avaliadas ficou em torno de 10^7 a 10^9 UFC.mL⁻¹, concordando com Chattopadhyay *et al.* (2022) que cita biofilmes bacterianos sendo caracterizados com população a partir de entre 10^8 a 10^{11} UFC.mL⁻¹.

O biofilme desempenha um papel importante no estabelecimento da associação de bactérias com o hospedeiro, pelo envolvimento de polissacarídeos e proteínas extracelulares (Ajijah *et al.*, 2023). Os biofilmes bacterianos podem competir com sucesso com outros microrganismos encontrados nas superfícies vegetais. Além disso, os biofilmes das BPCV associados às plantas são capazes de proteger locais de colonização, ciclagem de nutrientes, aumentar as defesas de patógenos e aumentar a tolerância a estresses abióticos, aumentando assim a produtividade agrícola e os rendimentos das culturas (Gupta, Snehi & Singh, 2017; Ajijah *et al.*, 2023).

Ao compararmos os resultados de área e perímetro obtidos pelos 2 softwares foi observado uma grande diferença entre as metodologias (Tabela 4). Esta diferença impede a comparação entre os sistemas de imagem e ela ocorre pela diferença de metodologia de cálculo e aquisição da real superfície radicular. O Winrhizo ao usar scanner especial de alta qualidade, capta as raízes menores e laterais, originando maior área ou superfície e sistema de iluminação com software que pode converter prontamente imagens da raiz em dados sobre morfologia, topologia, arquitetura e análises de cores (Gamalero, Bona & Glick, 2022). Enquanto, no ImageJ, utiliza o método do desenho manual das raízes a partir de uma fotografia (Tennant, 1975). Neste último, as medidas de área e perímetro poderiam estar subestimadas pela dificuldade de observação de raízes menores ou sobrepostas pelo usuário. Gamalero, Bona & Glick (2022) citam que é necessário interpretar cuidadosamente os dados adquiridos através de diferentes métodos. No caso do ImageJ, os autores recomendam usar coloração do material a ser avaliado para melhorar o contraste entre as raízes mais finas e o plano de fundo e para evitar o máximo possível de raízes sobrepostas durante a análise.

5 CONCLUSÃO

As medidas morfológicas de comprimento, biomassa fresca e seca não foram eficientes para a distinção de genótipos responsivos ou não responsivos (modelos) à interação planta-bactéria. O uso dos parâmetros de área e perímetro radicular foram mais eficientes para selecionar 3 genótipos entre os 8 avaliados por uma performance distinta: G4 (com resposta negativa à presença de N₂ e/ou *Azospirillum*); G5 e G6 com a melhor e pior área e perímetro radicular na presença de *Azospirillum*, respectivamente.

Os resultados demonstram que os genótipos de trigo responderam mais à presença de nitrogênio no meio de cultura do que propriamente à bactéria. As estirpes AbV5/6 e HM053 foram encontradas endofiticamente nos genótipos avaliados com formação de um maciço bacteriano promovido por uma população de 10⁷ a 10⁹ UFC.mL⁻¹. Os resultados da avaliação de área e perímetro radicular pelos softwares ImageJ e Winrhizo foram divergentes pela metodologia inerente a cada um, sendo que o Winrhizo obteve os maiores valores de área e perímetro radicular. Em relação ao efeito das estirpes bacterianas, a estirpe AbV5/6 aumentou a área e o perímetro radicular em todos os genótipos em relação ao controle, enquanto o HM053 diminuiu o perímetro do G4 e G5.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora inoculantes à base de *A. brasilense* sejam agronomicamente recomendados para diversas culturas e condições edafoclimáticas em todo o planeta, existem muitas incógnitas a respeito de como os efeitos benéficos desta interação ocorreriam. O trigo, é uma cultura exigente em N₂ e, responde prontamente à oferta deste nutriente. Já a interação com a bactéria parece depender da presença do N₂ quanto da estirpe presente na interação. Diante destes fatos, estudos complementares deverão ser realizados para a recomendação de estirpes de *Azospirillum brasilense* neste cereal.

REFERÊNCIAS

Abitrigo (2024) *Brasil deve manter ritmo de importação de trigo*. São Paulo.

Ajjah, N. *et al.* (2023) 'Plant growth-promoting bacteria (PGPB) with biofilm-forming ability: A multifaceted agent for sustainable agriculture', *Diversity*, 15(1), p. 112. Available at: <https://doi.org/10.3390/d15010112>.

Alori, E.T. and Babalola, O.O. (2018) 'Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa', *Frontiers in Microbiology*, 9. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02213>.

Araújo, R.M. *et al.* (2014) 'Resposta do milho verde à inoculação com *Azospirillum brasilense* e níveis de nitrogênio', *Ciência Rural*, 44(9), pp. 1556–1560. Available at: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130355>.

Arsac, J. *et al.* (1990) 'Growth enhancement of maize (*Zea mays* L) through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration', *Agronomie*, 10, pp. 640–654.

Di Benedetto, N.A. *et al.* (2017) 'The role of plant growth promoting bacteria in improving nitrogen use efficiency for sustainable crop production: A focus on wheat', *AIMS Microbiology*. AIMS Press, pp. 413–434. Available at: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.413>.

Biotrigo (2023) *Guia de cultivares TBio 2023*. Passo Fundo.

Cassán, F. *et al.* (2020a) 'Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond', *Biology and Fertility of Soils*, 56(4), pp. 461–479. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>.

Cassán, F. *et al.* (2020b) 'Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond', *Biology and Fertility of Soils*, 56(4), pp. 461–479. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01463-y>.

Cassán, F., Vanderleyden, J. and Spaepen, S. (2014) 'Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*', *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2), pp. 440–459. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00344-013-9362-4>.

Chattopadhyay, I. *et al.* (2022) 'Exploring the role of microbial biofilm for industrial effluents treatment', *Bioengineered*. Taylor and Francis Ltd., pp. 6420–6440. Available at: <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2044250>.

Cheplick, G.P. and Cho, R. (2003) 'Interactive effects of fungal endophyte infection and host genotype on growth and storage in *Lolium perenne*', *New Phytologist*, 158(1), pp. 183–191. Available at: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00723.x>.

Coniglio, A. *et al.* (2019) 'Azospirillum as Biofertilizer for Sustainable Agriculture: *Azospirillum brasilense* AZ39 as a Model of PGPR and Field Traceability', in, pp. 45–70. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-030-17597-9_4.

Cruz, C.D. (2013) GENES- a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. Viçosa.

Deuner, S. *et al.* (2008) Adubação foliar e via solo de nitrogênio em plantas de milho em fase inicial de desenvolvimento.

Duflos, R., Vailleau, F. and Roux, F. (2024) 'Toward Ecologically Relevant Genetics of Interactions Between Host Plants and Plant Growth-Promoting Bacteria', *Advanced Genetics* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1002/ggn2.202300210>.

Fao (2023) *World food and agriculture – statistical yearbook 2023*. FAO. Available at: <https://doi.org/10.4060/cc8166en>.

Fathi, A. (2022) 'Role of nitrogen (N) in plant growth, photosynthesis pigments, and N use efficiency: A review', *Agrisost*, 28, pp. 1–8.

Furlan, F. *et al.* (2017) 'Plant growth-promoting bacteria effect in withstanding drought in wheat cultivars', *Scientia Agraria*, 18(2), p. 104. Available at: <https://doi.org/10.5380/rsa.v18i2.51385>.

Galindo, F.S. *et al.* (2020) 'Investigation of *Azospirillum brasilense* inoculation and silicon application on corn yield responses', *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(4), pp. 2406–2418. Available at: <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00306-x>.

Gamalero, E., Bona, E. and Glick, B.R. (2022) 'Current techniques to study beneficial plant-microbe interactions', *Microorganisms*. MDPI, p. 1380. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071380>.

Ghimire, K. *et al.* (2023) 'Effect of Non-Native Endophytic Bacteria on Oat (*Avena sativa* L.) Growth', *International Journal of Plant Biology*, 14(3), pp. 827–844. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijpb14030062>.

Gupta, G., Snehi, S.K. and Singh, V. (2017) 'Role of PGPR in biofilm formations and its importance in plant health', *Biofilms in Plant and Soil Health*, pp. 27–36.

Hu, L. *et al.* (2018) 'Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota', *Nature Communications*, 9(1), p. 2738. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05122-7>.

Hungria, M. *et al.* (2010) 'Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil', *Plant and Soil*, 331(1–2), pp. 413–425. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0262-0>.

Jacquiod, S. *et al.* (2022) 'Artificial selection of stable rhizosphere microbiota leads to heritable plant phenotype changes', *Ecology Letters*, 25(1), pp. 189–201. Available at: <https://doi.org/10.1111/ele.13916>.

James, E.K. *et al.* (2002) 'Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* z67', *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 15(9), pp. 894–906. Available at: <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.9.894>.

Kazi, N. *et al.* (2016) 'The response of wheat genotypes to inoculation with *Azospirillum brasilense* in the field', *Field Crops Research*, 196, pp. 368–378. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2016.07.012>.

Lamlom, S.F., Irshad, A. and Mosa, W.F.A. (2023) 'The biological and biochemical composition of wheat (*Triticum aestivum*) as affected by the bio and organic fertilizers', *BMC Plant Biology*, 23(1), p. 111. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04120-2>.

Lemos, J.M. *et al.* (2013) 'Resposta de cultivares de trigo à inoculação de sementes com *Azospirillum brasilense*, e à adubação nitrogenada em cobertura', *Dracena*, 41(2), pp. 189–198.

Li, L. *et al.* (2019) 'Comparative proteomic analysis provides insights into the regulatory mechanisms of wheat primary root growth', *Scientific Reports*, 9(1), p. 11741. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47926-7>.

Ludwig, R.L. *et al.* (2022) 'Agronomic performance of wheat cultivars in response to inoculation (*Azospirillum brasilense*) and nitrogen application', *Revista Caatinga*, 35(4), pp. 799–808. Available at: <https://doi.org/10.1590/1983-21252022v35n407rc>.

Madsen, J.S., Sørensen, S.J. and Burmølle, M. (2018) 'Bacterial social interactions and the emergence of community-intrinsic properties', *Current Opinion in Microbiology*, 42, pp. 104–109. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.018>.

McBratney, A., Field, D.J. and Koch, A. (2014) 'The dimensions of soil security', *Geoderma*, 213, pp. 203–213. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.08.013>.

Moreira, F.M.D.S. *et al.* (2010) *Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações Resumo, Comunicata Scientiae*. Available at: www.ufpi.br/comunicata.

Naik, K. *et al.* (2019) 'Plant growth promoting microbes: Potential link to sustainable agriculture and environment', *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101326>.

Neiverth, A. (2011) *Desempenho de genótipos de trigo associados com Herbaspirillum seropedicae em relação à fixação biológica de nitrogênio e promoção de crescimento vegetal*. Marechal Cândido Rondon.

Nievas, S. *et al.* (2023) 'Unraveling *Azospirillum* 's colonization ability through microbiological and molecular evidence', *Journal of Applied Microbiology*, 134(4). Available at: <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad071>.

O'Donnell, K.L. and Hooper, G.R. (1977) 'Cryofracturing as a Technique for the Study of Fungal Structures in the Scanning Electron Microscope', *Mycologia*, 69(2), pp. 309–320. Available at: <https://doi.org/10.1080/00275514.1977.12020062>.

Oliveira, A.L.M. *et al.* (2017a) 'Maize Inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 Cells Enriched with Exopolysaccharides and Polyhydroxybutyrate Results in High Productivity under Low N Fertilizer Input', *Frontiers in Microbiology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01873>.

Oliveira, A.L.M. *et al.* (2017b) 'Maize inoculation with *Azospirillum brasilense* Ab-V5 cells enriched with exopolysaccharides and polyhydroxybutyrate results in high productivity under low N fertilizer input', *Frontiers in Microbiology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01873>.

Oliveira, A.M. de *et al.* (2022) 'Brazilian scenario of inoculant production: A look at patents', *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 46. Available at: <https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20210081>.

Pedrosa, F.O. *et al.* (2020) 'The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize', *Plant and Soil*, 451(1–2), pp. 45–56. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>.

Peiffer, J.A. *et al.* (2013) 'Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), pp. 6548–6553. Available at: <https://doi.org/10.1073/pnas.1302837110>.

Pereg, L., de-Bashan, L.E. and Bashan, Y. (2016) 'Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants', *Plant and Soil*, 399(1–2), pp. 389–414. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2778-9>.

Pinski, A. *et al.* (2019) 'Defining the genetic basis of plant–endophytic bacteria interactions', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms20081947>.

Raffi, M.M. and Charyulu, P.B.B.N. (2021a) 'Azospirillum-biofertilizer for sustainable cereal crop production: Current status', in *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Elsevier, pp. 193–209. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821406-0.00018-7>.

Raffi, M.M. and Charyulu, P.B.B.N. (2021b) 'Azospirillum-biofertilizer for sustainable cereal crop production: Current status', in *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Elsevier, pp. 193–209. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821406-0.00018-7>.

Rodriguez, L. (2023) 'Mapa registra duas novas estirpes do *Azospirillum brasilense*', *Mapa registra duas novas estirpes do Azospirillum brasilense*, 23 November.

Santos, M.P. *et al.* (2022) 'Effect of *Azospirillum brasilense* on the *in vitro* germination of *Eustoma grandiflorum* (Raf.) Schinn.(Gentianaceae)', *Scientia Horticulturae*, 299, p. 111041. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111041>.

Santos, M.S., Nogueira, M.A. and Hungria, M. (2021) 'Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants', *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 45. Available at: <https://doi.org/10.36783/18069657rbcs20200128>.

Santoyo, G. (2022) 'How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions', *Journal of Advanced Research*. Elsevier B.V., pp. 45–58. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.11.020>.

Saul Burdman, Yaacov Okon and Edouard Jurkevitch (2000) 'Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots', *Critical Reviews in Microbiology*, 2, pp. 91–110.

Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W. (2012) 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis', *Nature Methods*, 9(7), pp. 671–675. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.

Scudeletti, D. *et al.* (2023) 'Inoculation with *Azospirillum brasilense* as a strategy to enhance sugarcane biomass production and bioenergy potential', *European Journal of Agronomy*, 144, p. 126749. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2023.126749>.

Silva, D.J. and Queiroz, A.C. de (2005) 'Análises de Alimentos', *Métodos Químicos e Biológicos*, 3, pp. 57–75.

Silva, L.I. da *et al.* (2022) 'Fertilizer of the future: beneficial bacteria promote strawberry growth and yield and may reduce the need for chemical fertilizer', *Agronomy*, 12(10). Available at: <https://doi.org/10.3390/agronomy12102465>.

Silva Pankievicz, V.C. *et al.* (2021) 'Diazotrophic bacteria and their mechanisms to interact and benefit cereals', *Molecular Plant-Microbe Interactions*. American Phytopathological Society, pp. 491–498. Available at: <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-20-0316-FI>.

SHIME-HATTORI, A. *et al.* A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. *Journal of Applied*

Microbiology, [S.I.], v. 111, n. 4, p. 915–924, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05115.x.

Sridhar, B.B.M. *et al.* (2011) 'Effect of Phytoaccumulation of Arsenic and Chromium on Structural and Ultrastructural Changes of Brake Fern (*Pteris vittata*)', *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 23(4), pp. 285–293. Available at: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202011000400006>.

Tennant, D. (1975) 'A Test of a Modified Line Intersect Method of Estimating Root Length', *The Journal of Ecology*, 63(3), p. 995. Available at: <https://doi.org/10.2307/2258617>.

Tkacz, A. *et al.* (2020) 'Agricultural selection of wheat has been shaped by plant-microbe interactions', *Frontiers in Microbiology*, 11. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00132>.

USDA (2024) *Grain and feed update*.

Valente, J. *et al.* (2020) 'Ancient wheat varieties have a higher ability to interact with plant growth-promoting rhizobacteria', *Plant, Cell & Environment*, 43(1), pp. 246–260. Available at: <https://doi.org/10.1111/pce.13652>.

Vargas, L. *et al.* (2014) 'Drought Tolerance Conferred to Sugarcane by Association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: A Transcriptomic View of Hormone Pathways', *PLoS ONE*, 9(12), p. e114744. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114744>.

Wang, M. *et al.* (2024) 'A triple increase in global river basins with water scarcity due to future pollution', *Nature Communications*, 15(1), p. 880. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44947-3>.

White, J.F. *et al.* (2014) 'Hydrogen peroxide staining to visualize intracellular bacterial infections of seedling root cells', *Microscopy Research and Technique*, 77(8), pp. 566–573. Available at: <https://doi.org/10.1002/jemt.22375>.

Zeffa, D.M. *et al.* (2019) '*Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes', *PLOS ONE*, 14(4), p. e0215332. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>.