

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
(FCAV) – CAMPUS DE JABOTICABAL
ENGENHARIA AGRÔNOMICA**

**Transformação da bactéria *Bacillus subtilis* para análise de
endofitismo e promoção do crescimento em plantas de soja e milho**

Clara Barros Bueno

**Jaboticabal – SP
2021**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
(FCAV) – CAMPUS DE JABOTICABAL
ENGENHARIA AGRÔNOMICA**

**Transformação da bactéria *Bacillus subtilis* para análise de
endofitismo e promoção do crescimento em plantas de soja e milho**

Clara Barros Bueno

Orientador: Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Coorientadora: Dra. Roberta Mendes dos Santos

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP,
Campus de Jaboticabal, para a
obtenção do título de Engenheira
Agrônoma.

**Jaboticabal – SP
2º semestre/2021**

B928t	Bueno, Clara Barros Transformação da bactéria <i>Bacillus subtilis</i> para análise de endofitismo e promoção do crescimento em plantas de soja e milho / Clara Barros Bueno. -- Jaboticabal, 2021 51 p. : tabs., fotos Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Everlon Cid Rigobelo Coorientadora: Roberta Mendes dos Santos 1. Microbiologia agrícola. 2. <i>Bacillus subtilis</i>. 3. Milho. 4. Soja. 5. Bactérias gram-positivas. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEPARTAMENTO: Departamento de Ciências da Produção Agrícola – Microbiologia Agrícola

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TRABALHO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

TÍTULO: Transformação da bactéria *Bacillus subtilis* para análise de endofitismo e promoção do crescimento em plantas de soja e milho

ACADÊMICO: Clara Barros Bueno

CURSO: Engenharia Agrônômica

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

(Nomes)

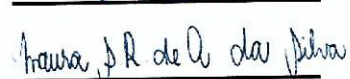
Presidente Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo

Membro Dr. Carlos Henrique Barbosa Santos

Membro MSc. Maura Santos Reis de Andrade da Silva

(Assinaturas)





Jaboticabal / /

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em:

Ad referendum 17/05/22


 Prof. Dr. Leonardo Bianco de Carvalho
 Chefe do Depto. de Ciências da Produção Agrícola
 FCAV/UNESP

Dedico este trabalho à minha família que acredita em mim, mas principalmente em memória de meu avô, Ormando Lopes Barros, que sempre estará comigo em coração, pensamento e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Sidney, por todo o apoio durante minha graduação e pelo incentivo constante, e à minha mãe Rosana por estar sempre ao meu lado e por não me deixar desistir.

Agradeço ao orientador, Prof. Dr. Everlon Cid Rigobelo, que desde o princípio notou meu interesse na área de microbiologia agrícola, proporcionou essa oportunidade de projeto científico e me apoiou mesmo quando as inseguranças surgiram. E à coorientadora, Dra. Roberta Mendes dos Santos, por tudo que me foi ensinado durante esse tempo, por toda a paciência e suporte enquanto esse trabalho era realizado. Agradeço também à Maura por sempre me incentivar e apoiar durante esse trajeto e também ao Carlos por me tirar tantas outras dúvidas, e a todos do laboratório de Microbiologia Agrícola da FCAV que cooperaram de várias formas nesse trabalho e que me ensinaram muito.

Agradeço também aos amigos que fiz durante a graduação, pelos momentos felizes e também os desesperos compartilhados, as caronas e os vasos que me ajudaram a montar para esse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa – 2019/14238-5.

Conteúdo

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	14
2.1. Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Milho.....	15
3.2. Soja	16
3.3. Bactérias promotoras de crescimento do plantas	17
3.4. <i>Bacillus subtilis</i>	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Localização	21
4.2. Delineamento experimental.....	21
4.3. Transformação do <i>B. subtilis</i>	21
4.4. Produção dos inoculantes	23
4.5. Adubação	23
4.6. Plantio e inoculações	24
5. AVALIAÇÕES	24
5.1. Altura e massa vegetal fresca.....	24
5.2. Concentração de nitrogênio e fósforo	25
5.3. Reisolamento dos isolados transformados	25
5.4. Análise dos dados	26
6. RESULTADOS.....	27
6.1. Transformação	27
6.2. Cultura da soja.....	28
6.2.1. Altura e peso fresco das plantas	28
6.2.2. Quantidade de <i>Bacillus</i> recuperados	31
6.2.3. Concentração nitrogênio e fósforo na parte aérea	32
6.3. Cultura do milho	33
6.3.1. Altura e peso fresco das plantas	33
6.3.2. Quantidade de <i>Bacillus</i> recuperados	36
6.3.3. Concentração de nitrogênio e fósforo na parte aérea	37
7. DISCUSSÃO.....	38

8.	CONCLUSÃO	42
9.	BIBLIOGRAFIA.....	43

RESUMO

O uso de microrganismos endofíticos promotores de crescimento de plantas na agricultura vem se expandindo no Brasil e é uma excelente estratégia para se enfrentar os desafios da agricultura atual, como redução do custo de produção com menores impactos ambientais sem o detrimento da produtividade. Entretanto, pouco se sabe sobre os fatores que podem afetar o endofitismo, como a concentração do inoculante e a fertilização mineral. O presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de tais fatores nas culturas da soja e do milho por meio de tratamentos com diferentes dosagens de adubação (0 a 100%) e concentrações de inoculante de *Bacillus subtilis* (1×10^2 a 1×10^{10} UFC $^{-1}$), além da transformação da bactéria com plasmídeo pGLO. Também procurou-se entender se há relação entre o crescimento vegetal e a concentração de *B. subtilis* endofíticos. Verificou-se que para a cultura da soja as doses menores de adubação (25 e 50%) foram as que promoveram o maior número de bactérias recuperadas a partir da concentração 1×10^6 UFC $^{-1}$ em relação ao controle. Para a cultura do milho, inoculações na dose de 25% de adubação apresentaram melhores resultados, demonstrando que além da capacidade de modulação das colônias realizada pelas plantas e bactérias, a dose de fertilizante interferiu no endofitismo. Quanto ao desenvolvimento vegetal, as maiores concentrações inoculadas não promoveram necessariamente melhores efeitos de promoção de crescimento do que a concentração de 1×10^4 UFC $^{-1}$ para ambas culturas, sugerindo que maiores números de bactérias endofíticas recuperadas na planta não afetam o crescimento vegetal na mesma proporção.

Palavras-chave: Microbiologia agrícola; *Bacillus subtilis*; Milho; Soja; Bactérias gram-positivas.

ABSTRACT

The use of endophytic microorganisms that promote plant growth in agriculture has been expanding in Brazil and is an excellent strategy to face the challenges of current agriculture, such as reducing production costs with less environmental impacts without detriment to productivity. However, little is known about the factors that can affect endophytism, such as inoculant concentration and mineral fertilization. The present study aimed to evaluate the influence of such factors on soybean and corn crops through treatments with different fertilizer dosages (0 to 100%) and *Bacillus subtilis* inoculant concentrations (1×10^2 to 1×10^{10} CFU mL⁻¹), in addition to transformation of the bacterium with plasmid pGLO. We also tried to understand if there is a relationship between plant growth and the concentration of endophytic *B. subtilis*. It was found that for soybean crop, the lowest fertilization rates (25 and 50%) were the ones that promoted the largest number of recovered bacteria from the concentration 1×10^6 CFU mL⁻¹ compared to the control. For corn, inoculations at a dose of 25% fertilization showed better results, which demonstrates that, in addition to the colony modulation capacity performed by plants and bacterial colonies, the fertilizer dose interfered with endophytism. Regarding plant development, the higher inoculated concentrations did not necessarily promote better growth-promoting effects than the concentration of 1×10^4 CFU mL⁻¹ for both crops, suggesting that higher numbers of endophytic bacteria recovered in the plant do not affect plant growth in the same proportion.

Keywords: Agricultural microbiology; *Bacillus subtilis*; Maize; Soybean; Gram-positive bacteria.

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Fatores utilizados nos tratamentos e controles para análise do endofitismo.....	19
Tabela 2. Quantidade recomendada de macro e micronutrientes utilizados nos experimentos com soja e milho.....	21
Tabela 3. Teste F dos dados analisados no experimento de soja, demonstrando interação se significativa ou não, entre concentrações de inoculante e adubação, atuando sobre altura da planta; peso fresco total, da parte aérea e raiz; <i>Bacillus</i> recuperados da raiz, concentração de nitrogênio e fósforo na parte aérea.....	26
Tabela 4. Teste F dos dados analisados no experimento de milho, demonstrando interação se significativa ou não, entre concentrações de inoculante e adubação, atuando sobre altura da planta; peso fresco total, da parte aérea e raiz; <i>Bacillus</i> recuperados da raiz, concentração de nitrogênio e fósforo na parte aérea.....	31

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Presença de crescimento da <i>E.coli</i> transformada em meio BHI (A). Presença de crescimento do <i>B. subtilis</i> 290 transformado na presença de ampicilina (B).....	26
Figura 2. Emissão de fluorescência da <i>E.coli</i> transformada em meio BHI (luz verde na placa de Petri) (A). Presença de <i>B. subtilis</i> 290 transformado no meio com ampicilina e sem a presença da fluorescência (B). A luz violeta na placa é reflexo da luz emitida pela caneta de luz UV.....	26
Figura 3. Desdobramento da interação entre as concentrações de inóculos e doses de adubação atuando sobre altura (A) e a concentração de <i>Bacillus</i> recuperados das raízes (B) das plantas de soja.....	29
Figura 4. Massa fresca de parte aérea, de raízes e total quando comparado o fator adubação (A); massa fresca de raízes quando comparado o fator inoculação (B).....	30
Figura 5. Concentração de nitrogênio (A) e fósforo (B) na parte aérea de plantas de soja.....	32
Figura 6. Desdobramento da interação entre as concentrações de inóculos e doses de adubação atuando sobre altura (A) e a concentração de <i>Bacillus</i> recuperados das raízes (B) das plantas de milho.....	34
Figura 7. Massa fresca de parte aérea, de raízes e total quando comparado o fator adubação (A). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem de acordo com o teste de Duncan a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).....	35
Figura 8. Concentração de nitrogênio (A) e fósforo (B) na parte aérea de plantas de milho. Letras maiúsculas comparam médias dentro de inoculações e letras minúsculas comparam médias dentro de adubações (Duncan $p \leq 0,01$).....	37

1. INTRODUÇÃO

Desde o surgimento das plantas os microrganismos se associam a elas permitindo o surgimento de diferentes tipos de interações que podem ser benéficas, prejudiciais ou neutras (TURNER, JAMES & POOLE, 2013). Quando a relação é prejudicial à planta isso resulta em uma redução do seu desenvolvimento, enquanto uma relação benéfica promove melhoria (DOWNIE, 2010).

As bactérias que interagem com as plantas são classificadas de acordo com sua localização podendo ser rizosféricas, epifíticas e endofíticas. Bactérias endofíticas possuem a capacidade de, durante seu ciclo de vida ou parte dele, colonizarem os tecidos internos das plantas vivas sem desenvolver sintomas de doenças (HARTLOVA *et al.*, 2011), além de exercerem efeitos benéficos, como desenvolvimento de órgãos, produção de flores, maior rendimento das culturas, entre outros (DEY *et al.*, 2004).

O ambiente endofítico é mais protegido comparado ao solo ou a rizosfera conferindo uma vantagem ecológica às demais bactérias capazes de colonizá-lo (BERENDSEN, PIETERSE & BAKKER, 2012). Entretanto, na interação planta-endófito, as bactérias não residem dentro das células e não induzem a formação de estruturas vegetais diferenciadas como os nódulos do gênero *Rhizobium* na colonização de plantas de soja (KNIEF *et al.*, 2011).

As bactérias dentro do hospedeiro encontram grande disponibilidade de nutrientes, baixa competição e proteção contra estresse ambiental e, em alguns casos, esse estilo de vida garante sua dispersão por transferência vertical (COMPANT *et al.*, 2020) o que permite colonização também da parte aérea das plantas. A vida das bactérias dentro do tecido vegetal promove uma interação mais íntima com o hospedeiro, apesar de que a localização dos microrganismos poderá variar e diferenciar no tipo de interação (ARAÚJO, 1996). Eles podem ser encontrados em espaços do mesófilo foliar e córtex radicular, nos espaços intercelulares (RUPPEL *et al.*, 1992) ou ainda no interior das células, mantendo assim uma interação intracelular (TÖR, MANTELL & AINSWORTH, 1992).

Existe uma ampla evidência de que muitos endófitos aparentemente comensalísticos também podem promover o crescimento e a defesa da planta (SANTOYO *et al.*, 2016), mas a ecologia e as funções desses endófitos benéficos são

menos compreendidos. Em particular, bactérias endofíticas promotoras de crescimento de plantas podem promover o crescimento vegetal por mecanismos que incluem a liberação de fitohormônios (PATTEN & GLICK, 2002), fixação de nitrogênio (URQUIAGA *et al.*, 2012), aquisição aprimorada de nutrientes minerais (MALINOWSKI & BELESKY, 2000), produção de compostos promotores de crescimento (KUMAR *et al.*, 2019) e aumento da tolerância ao estresse (KOHLENER *et al.*, 2008).

Entretanto, são conhecidos poucos fatores que influenciam diretamente ou indiretamente o endofitismo, por exemplo questões dos próprios microrganismos, como a estrutura da comunidade bacteriana e as funções das espécies (WALITANG *et al.*, 2018), e fatores intrínsecos às plantas hospedeiras, incluindo tecido vegetal (DAI *et al.*, 2014) genótipo (WALITANG *et al.*, 2018), idade (VENDAN *et al.*, 2010) e sanidade (BOGAS *et al.*, 2015).

Visando entender quais outros fatores atuam sobre a capacidade de endofitismo das bactérias, e que podem ser modificados pela ação humana, este estudo buscou verificar a interação entre a concentração de um inoculante bacteriano e a aplicação de fertilizantes minerais no solo sobre o endofitismo. Consequentemente, avaliou se o número de bactérias endofíticas interfere na promoção de crescimento de plantas nas culturas da soja e do milho.

Para isso, foram avaliados o desenvolvimento vegetal das plantas de soja e milho em diferentes concentrações de *B. subtilis* marcado com o gene GFP e o gene de resistência à ampicilina pelo plasmídeo pGLO, nas concentrações de 1×10^2 a 1×10^{10} UFC mL⁻¹ em quatro níveis de fertilização mineral, sendo eles, 0, 25%, 50% e 100% da dose de fertilizante de acordo com a análise química do solo nas condições de cada de vegetação.

2. OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivos verificar se o endofitismo é influenciado pela dose do inoculante bacteriano e pelas condições de fertilidade do solo, e se o desenvolvimento vegetal é influenciado pela população bacteriana endofítica.

2.1. Objetivos específicos

Avaliar se há o efeito das concentrações do inoculante de *B. subtilis* sobre a promoção do crescimento das culturas de milho e soja.

Avaliar se a interação entre a inoculação de *B. subtilis* e adubação com diferentes dosagens influencia na capacidade de endofitismo das bactérias.

Avaliar influência da interação inoculação-adubação sobre a absorção de fósforo e nitrogênio pelas plantas de milho e soja.

Analisar número de colônias de *B. subtilis* no interior da raiz.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma espécie da família *Poaceae* e ordem *Poales*, e tem por característica alta adaptabilidade o que permite seu cultivo em diferentes ambientes, desde climas tropicais até temperado, sendo encontrado nas três Américas (FANCELLI, ALVES & ALMEIDA, 2015), e por suas elevadas qualidades nutricionais é usado na alimentação humana e animal (BARROS & CALADO, 2014).

Além de seus valores nutricionais para a alimentação, o milho também pode ser utilizado na produção de biocombustíveis como já ocorre nos Estados Unidos, Canadá e Argentina (KLINE *et al.*, 2008) e atualmente vem ganhando espaço também no Brasil com uma perspectiva de alcançar 20% do mercado de etanol até 2030, segundo a União Nacional de Etanol de Milho (NOVACANA, 2021). Em um estudo de Lewandrowski *et al.* (2019), em dois cenários projetados para 2022 há oportunidades de produzir etanol com emissões que serão 47% a 70% menores que emissões da gasolina.

No Brasil há duas safras da cultura, em período chuvoso (no verão) e posteriormente na chamada safrinha, em rotação com a cultura da soja. Para atender alta demanda é imprescindível o fornecimento dos nutrientes que são suas exigências nutricionais, sendo o primeiro deles o nitrogênio. As plantas de milho apresentam maior demanda de tal nutriente a partir do estádio com quatro a cinco folhas (LOBO, 2018) e a deficiência de N pode acarretar uma perda de produtividade de até 80% (FANCELLI & DOURADO NETO, 2008).

Quando se trata da formação das espigas, o fósforo (P) se torna o mineral mais importante, sendo quase todo translocado (de 77 a 86%) para os grãos (COELHO & FRANÇA, 1995; COELHO, 2006). Porém, o fósforo também é um dos nutrientes mais limitantes nos solos tropicais (RAIJ & CANTARELLA, 1997) e se faz essencial que, para o desenvolvimento de milho, alta concentração do elemento esteja disponível às plantas, seja por meio de aplicação de fertilizantes fosfatados ou então de bactérias que tenham a capacidade de solubilizar o mineral, tornando o fósforo do solo disponível à absorção das plantas (KHAN *et al.*, 2007).

Em busca de soluções mais sustentáveis para fornecimento de tais minerais à cultura, as Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (BPCP) se tornam alternativas. Para Moreira & Siqueira (2006) a fixação biológica do nitrogênio (FBN) em leguminosas plantadas anteriormente à cultura do milho, contribui em cerca de 17% para suprir necessidades de N das gramíneas. Youseif (2018) também demonstra que as BPCP promoveram o crescimento das raízes do milho, provavelmente pela habilidade de tais microrganismos sintetizarem o fitohormônio ácido indolacético (AIA) e segundo Glick (2012) a solubilização do fósforo se torna possível por enzimas extracelulares e exsudados de ácidos orgânicos liberados pelas bactérias.

Assim como Aquino *et al.* (2019), utilizando diversas bactérias isoladas de plantas de cana-de-açúcar para inocular milho e sorgo, demonstraram que uma das cepas isoladas de *B. subtilis* obteve um dos melhores resultados quanto ao acúmulo de nitrogênio na cultura do milho.

3.2. Soja

A soja (*Glycine max* L. Merrill) é uma planta anual e leguminosa, da família *Fabaceae*, muito influenciada pelo fotoperiodismo e favorecida por grande luminosidade (TEJO, FERNANDES & BURATTO, 2019). Originária do extremo Oriente, a soja é considerada base da alimentação de muitos povos e no Brasil começa sua expansão a partir da década de 60 (ZANCOPÉ, NASSER & MORAES, 2005), muito graças aos avanços tecnológicos e científicos para a cultura (EMBRAPA, 2011) sendo um claro exemplo disso são os estudos da pesquisadora Johanna Döbereiner sobre a fixação biológica do nitrogênio (FBN), como “*Azotobacter paspali* sp. n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*”, de 1966 e “Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência”, de 1970.

Anteriormente, para alcançar altas produtividades, os produtores precisavam utilizar de grandes quantidades de fertilizantes minerais para fornecer o nutriente mais limitante para a cultura, o nitrogênio, o que promoveria uma elevação dos custos de produção além do impacto ambiental (HUNGRIA *et al.*, 2005), mas após a descoberta do processo citado acima com estirpes bacterianas promotoras de crescimento, é dispensada a adubação nitrogenada em plantas de soja (DÖBEREINER, 1997). Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* fixam o nitrogênio liberando-o para as plantas na forma de nitrato (MASCARENHAS *et al.*, 2005).

Porém, o processo de fixação biológica de nitrogênio exige um gasto energético das plantas que fornecem carbono e energia (ATP) às bactérias em simbiose (STAM, STOUTHAMER & VERSEVELD, 1987), e a inoculação de gêneros do tipo *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium* em conjunto com alguma bactéria solubilizadora de fósforo (coinoculação) apresenta-se como uma solução para beneficiar esse processo. O gênero *Bacillus*, por exemplo, pode aumentar a nodulação, a competitividade do rizóbio na rizosfera da planta e com isso favorecer a fixação de N₃ pelas bactérias fixadoras (LI & ALEXANDER, 1988; ARAÚJO *et al.*, 2010). Segundo estudo de Araújo & Hungria (1999), a coinoculação de *Bradyrhizobium japonica* e *Bacillus subtilis* comprovou o favorecimento da nodulação e ainda aumentou a produtividade dos grãos.

3.3. Bactérias promotoras de crescimento do plantas

Os estudos sobre Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (BPCP) surgem como uma opção para diminuir o uso excessivo de fertilizantes químicos ao mesmo tempo que deve-se manter a produtividade.

Os fertilizantes disponibilizam para as plantas os nutrientes em sua forma já aptas para absorção e por isso favorecem o desenvolvimento, mas a longo prazo seu uso indiscriminado pode acarretar diversos danos ambientais e na própria produção, como por exemplo: emissão de gases de efeito estufa, poluição do solo e eutrofização de corpos d'água águas subterrâneas (MARKS, 2013). Além disso, a despesa com fertilizantes tem grande peso nos custos de produção, sua participação ativa nos custos operacionais é cerca de 35% (CONAB, 2018).

Portanto, os chamados bio-fertilizantes são considerados uma solução para a redução de custo com fertilizantes químicos, aperfeiçoar a sustentabilidade no campo, manter a produtividade e a segurança alimentar.

As bactérias benéficas às plantas podem ser classificadas de diferentes maneiras, como simbióticas e aquelas que têm vida livre no solo, normalmente colonizando a rizosfera ou até mesmo adentrando nas raízes da planta (FARINA, 2012), consideradas então as bactérias endofíticas. Os exudatos das raízes das plantas é um conjunto de açúcares e aminoácidos liberado pelas plantas que interessa as bactérias por ser uma fonte de energia que precisam e por esse motivo existe muito mais bactérias nos arredores das raízes, na rizosfera (GRAY & SMITH, 2005), pois são atraídas por quimiotaxia à essa direção.

De acordo com Glick (1995), as BPCP podem promover esse crescimento de maneira direta ou indireta, a forma direta seria por meio da produção de hormônios de crescimento vegetal; solubilização de minerais como fósforo, deixando-os disponíveis para as plantas absorverem tais nutrientes; FBN, entre outros; enquanto a forma indireta de promoção de crescimento, está relacionada à redução de efeitos deletérios de patógenos. Um exemplo são os biofungicidas baseado em várias espécies de bactérias do gêneros *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. amyloliquefaciens* (FRAVEL, 2005).

No caso da FBN, os microrganismos que possuem tal habilidade reduzem o nitrogênio atmosférico (N_2) para amônia (NH_3), e após ser convertida em amônio (NH_4^+) rapidamente, essa substância será absorvida pelas plantas na forma de glutamina (SANGOI *et al.*, 2015). Ou ainda, quando as bactérias são endofíticas, a promoção do crescimento pode ocorrer não pela fixação direta do nitrogênio, mas pelo aumento da atividade da enzima redutase do nitrato (CASSÁN & SALAMONE, 2008).

Microrganismos solubilizadores de fosfatos atuam sobre as formas orgânicas de fósforo presentes no solo e indisponíveis para as plantas. Esse nutriente pode ser encontrado de duas formas, orgânica e inorgânica, a primeira forma está atribuída à matéria orgânica enquanto a segunda normalmente está adsorvida em superfícies do solo (como óxidos de Fe, de Al, de Mn, entre outros, ou caulinita) e precisa passar para a solução do solo para as raízes absorverem tal nutriente, o que ocorre pela solubilização (FERREIRA & CRUZ, 2018). Mas o principal processo que atua no

fornecimento de P para as plantas, é a mineralização do fósforo orgânico por microrganismos (VINCENT, TURNER & TANNER, 2010) e tal fato incentivou o uso de inoculantes comerciais com bactérias que possam atuar sobre o P existente no solo ou o aplicado com adubação (SILVA FILHO & VIDOR, 2001). Um dos motivos para que bactérias tenham essa capacidade, pode ser a presença do grupo de enzimas fitases que existem nesses microrganismos. Fitases são um grupo de enzimas capazes de liberar o fosfato do fitato, uma das formas de fosfato orgânico mais abundantes no solo, e espécies de bactérias do gênero *Bacillus*, como a *B. amyloliquefaciens*, produzem fitases extra-celulares, cooperando com a liberação de fósforo para a solução do solo ao redor das raízes como apontado por Jorquera *et al.* (2008).

Portanto, o uso de inoculantes com bactérias capazes de solubilizar fósforo do solo, fixar nitrogênio ou produzir fitohormônios, são tecnologias que podem promover o crescimento das plantas e tornar a produção sustentável com redução de insumos químicos.

3.4. *Bacillus subtilis*

As bactérias do gêneros *Bacillus* são bactérias gram-positivas, na forma de bastonetes, produtoras de endósporos e aeróbias (TURNBULL, 1996). São consideradas bactérias promotoras do crescimento e vivem na rizosfera, são denominadas também como Rizobactérias Promotoras de Crescimento Vegetal extracelulares (RPCVe), como estudado por Brown (1974) e Farina (2012).

No caso de tais bactérias extracelulares, não há formação nódulos como ocorre com rizóbios, por sua vez, elas possuem uma grande variedade de mecanismos para promover o crescimento de suas hospedeiras (GRAY & SMITH, 2005).

Ainda no estudo de Gray & Smith (2005) é apresentada a capacidade de comunicação e produção de sinais das bactérias dependendo de sua densidade populacional, os sinais emitidos gerarão diferentes respostas físicas e fisiológicas, podendo envolver bioluminescência, patogenicidade, ou então nodulação, regulação do crescimento, entre outras, é o chamado ‘*quorum sense*’ (FRAY, 2002); sabe-se ainda que as *Bacillus* sp. têm dois componentes sensoriais, um sensor e um regulador que direciona a sinalização (JERS *et al.*, 2011). Além disso possuem genes que produzem enzimas degradantes da N-acil-homoserina lactona (AHL), o principal meio de

sinalização das bactérias gram-negativas (FRAY, 2002), dessa forma as bactérias do gênero *Bacillus* seriam competitivas às bactérias gram-negativas.

A bactéria *B. subtilis* tem uma atuação variada, estudos a apontaram como forma de controle biológico e produtoras de antibióticos, ou então promotoras da posterior nodulação de bactérias do gênero *Rhizobium* nas raízes quando aplicadas nas sementes de feijão em coinoculação como demonstrado por Lazzaretti & Melo (2005) e Araújo *et al.*, (2010), e isso pode ocorrer pelo aumento dos sítios de infecção e pela ação inibitória de doenças nas raízes (TURNER & BACKMAN, 1991; ARAÚJO & HUNGRIA, 1999).

No estudo de Hashem, Tabassum & Abd_Allah (2019), *B. subtilis* demonstram ter a habilidade de solubilizar fósforo, aumentar a fixação biológica de nitrogênio, induzir genes de resposta ao stress e metabólitos relacionados aumentando a tolerância das plantas, além de produzir fitohormônios e sideróforos que promovem o crescimento.

Aponta-se que para a colonização ocorrer, os sinais por quimiotaxia devem ocorrer de 4 a 8 horas após a inoculação de bactérias *B. subtilis* (RUDRAPPA *et al.*, 2008) e em 24h aproximadamente formariam seu biofilme ao redor das raízes das plantas, o que coopera na produção de lipopeptídeos e na sua ação antimicrobiana no solo (DAVEY, CAIAZZA & O'TOOLE, 2003). E além de sua ação externa, a *B. subtilis* ainda têm capacidade de adentrar as raízes da planta, sendo considerada também uma bactéria endofítica (FALL, KINSINGER & WHEELER, 2004).

Entende-se então que a *B. subtilis* favorece o crescimento das plantas de maneira direta e também indireta, de maneira direta considerando a solubilização do P, por exemplo, e de maneira indireta a sua ação de biocontrole.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Em março de 2020, foi realizado o plantio de soja (*Glycine max* L.) e em julho, o plantio das plantas de milho (*Zea mays* L.). Foram 5 repetições e 40 tratamentos compostos por uma combinação de porcentagem de adubação (0, 25, 50 e 100%) e doses de inoculante (1×10^2 a 1×10^{10} UFC mL⁻¹, e controle), e duas plantas por vaso.

4.1. Localização

O experimento foi realizado em casa de vegetação na cidade de Jaboticabal, SP (21° 15' 17" S e 48° 19' 20" W; altitude média 605m) com clima tropical com estação seca de inverno, temperatura média de 21,7 °C e pluviosidade média de 1340 mm por ano, de acordo com a classificação de Köppen e Geiger é Aw. Segundo Embrapa (2013), a região possui latossolo vermelho eutrófico de textura argilosa.

4.2. Delineamento experimental

O delineamento inteiramente casualizado (DIC) foi um fatorial de 9 x 4 onde foram realizadas nove diluições, quatro níveis de adubação e dois tipos de cultura, cinco repetições, e três tipos de controle (sem adubação e sem inoculação; com adubação variando com a dosagem, sem inoculação; sem adubação, com as diferentes concentrações de inoculante).

Tabela 1. Fatores utilizados nos tratamentos e controles para análise do endofitismo.

Culturas	Soja (<i>Glycine max</i>), Milho (<i>Zea mays</i>)
Concentração de <i>B. subtilis</i>	1x10 ² , 1x10 ³ , 1x10 ⁴ , 1x10 ⁵ , 1x10 ⁶ , 1x10 ⁷ , 1x10 ⁸ , 1x10 ⁹ , 1x10 ¹⁰ UFC mL ⁻¹
Dose de Adubação	0, 25%, 50%, 100%
Controles	- Adubação, - Inoculação; - Adubação, + Inoculação; + Adubação, - Inoculação.

4.3. Transformação do *B. subtilis*

Foi utilizada a cepa *B. subtilis* 290 (MILANI *et al.*, 2019) que é pertencente à coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Solo (LSM) da FCAV/UNESP de Jaboticabal. O método utilizado para a transformação das bactérias da espécie *B. subtilis* foi o descrito por Anagnostopoulou & Spizizen (1961), acrescido de algumas modificações baseada também no protocolo de Steinberg *et al.* (2016). Esse mesmo método foi usado para a espécie *Escherichia coli* HB 101 K-12.

As espécies de *B. subtilis* e *E. coli* foram cultivadas em um meio mínimo, denominado SP, composto por: Glicose 50%; triptofano 5 mg/mL; citrato de ferro

amônio 22 mg/mL; sulfato de magnésio 1M; K-glutamato 40%; caseína hidrolisada 5% e SP salts 9,215 mL/10 mL (K_2HPO_4 14g/L; KH_2PO_4 6g/L; trisódio citrato 1 g/L). Esse mesmo meio foi usado durante todo o processo de competência e transformação das bactérias.

Em 5 mL do meio SP foi inoculado *E. coli* e *B. subtilis*, separadamente, para crescimento durante a noite em 37 °C com agitação de 150 rpm. No dia seguinte as culturas foram diluídas 1:50 para um novo meio SP esterilizado, e novamente colocadas em incubação de 37 °C com agitação de 180 rpm. Foi medida a densidade óptica em espectrofotômetro com absorbância de 600nm a cada 30 minutos, depois de 2h de incubação até que houvesse a mudança do crescimento bacteriano da fase de crescimento exponencial para a fase estacionária, o que levou cerca de 5:30 h. Após isso, 400 µL de cada cultura foram depositados em *eppendorfs*, juntamente com 600 ng do plasmídeo pGLO, com a proteína fluorescente (GFP) e o gene de resistência à ampicilina. Foram separados *eppendorfs* com a aplicação do plasmídeo e sem, e incubados novamente durante 90 minutos sob mesmas condições de temperatura e agitação.

Ao final desse período, 100 µL da solução bacteriana incubada foram plaqueados em meios Luria-Bertani Agar (LBA - 5 g de NaCl; 5 g de extrato de levedura; 10 g de triptona e 15 g de ágar, para 1 litro) para as bactérias sem pGLO. O meio de cultura LBA contendo ampicilina e arabinose (100 µg/mL e 6.000 µg/mL, respectivamente) foi preparado para bactérias contendo o plasmídeo apenas.

Após 24 h de crescimento em 37 °C, essas bactérias foram inoculadas em meio líquido Brain Heart Infusion (BHI, Infusão de cérebro bovino – 200g/L; Infusão de coração bovino – 250g/L; Proteose peptona – 10g/L; Dextrose – 2g/L; Cloreto de Sódio – 5 g/L; Fosfato Dissódico – 2,5g/L; pH final 7.4±0.2), incubadas por mais 24 h em 28 °C para posteriormente serem plaqueadas também em BHI, com arabinose e ampicilina, e apenas com ampicilina. As bactérias que passaram pelo processo de competência descrito acima, mas não receberam o plasmídeo, foram plaqueadas em meio com ampicilina assim como bactérias que receberam o plasmídeo e aquelas que sequer passaram pelo processo de inanição.

4.4. Produção dos inoculantes

Os inoculantes de *B. subtilis* 290 já transformados, foram cultivados nos meios Caldo Nutriente (extrato de carne - 1g/L; extrato de levedura - 2g/L; peptona - 5g/L; cloreto de sódio - 5g/L; ph final $6,8 \pm 0,2$) e Brain Heart Infusion Broth (Infusão de cérebro bovino – 200g/L; Infusão de coração bovino – 250g/L; Proteose peptona – 10g/L; Dextrose – 2g/L; Cloreto de Sódio – 5 g/L; Fosfato Dissódico – 2,5g/L; pH final $7,4 \pm 0,2$), para as concentrações de 1×10^2 a 1×10^7 e 1×10^8 a 1×10^{10} UFC mL⁻¹, respectivamente. E incubado em BOD a 28°C durante 24 horas (LOBO, DOS SANTOS & RIGOBELLO, 2019).

4.5. Adubação

O delineamento em inteiramente casualizado (DIC) foi um fatorial de 9 x 4 onde foram realizadas nove diluições, quatro níveis de adubação e dois tipos de cultura, e cinco repetições, mais os tratamentos controles como já citado anteriormente no tópico de Delineamento experimental (4.2).

A adubação para o nutriente manganês seguiu a recomendação do trabalho de Novais (1991) e para demais nutrientes foi utilizada a recomendação de Malavolta (1980), para vasos de 5L e solos com pH entre 6,0 e 6,5.

Tabela 2. Quantidade recomendada de macro e micronutrientes utilizados nos experimentos com soja e milho.

Macronutrientes	Recomendação (mg/dm ³)	Micronutrientes	Recomendação (mg/dm ³)
Nitrogênio	300	Boro	0,5
Fósforo	200	Cobre	1,5
Potássio	150	Ferro	5
Cálcio	75	Molibdênio	0,1
Magnésio	15	Zinco	5
Enxofre	50	Manganês	5

As fontes de nutrientes utilizados foram: uréia (45% N); Super simples (18% P₂O₅, 16% Ca, 8% S); Cloreto de potássio (60% K₂O); Carbonato de cálcio (16% Ca); Óxido de magnésio (52% Mg); Ácido bórico (17% B); Molibdato de sódio (39% Mo); Sulfato de cobre (25% Cu); Sulfato de zinco (20% Zn); Sulfato de manganês (26% Mn); e os cálculos foram feitos de acordo com a porcentagem desejada para os quatro níveis de adubação.

4.6. Plantio e inoculações

As sementes de milho e soja foram semeadas em vasos com cinco litros de solo previamente analisado quimicamente e adubado como citado acima. Após a emergência das plantas foi realizado o desbaste, deixando duas plantas por vaso.

As diluições dos inoculantes foram padronizadas através de leitura em espectrofotômetro a 630nm (KLOEPPER *et al.*, 1989) e cada vaso recebeu 10 mL do inoculante. Ajustando-se as concentrações 1×10^2 a 1×10^{10} UFC mL⁻¹ em quatro níveis de fertilização mineral, sendo eles, 0, 25%, 50% e 100% da dose de fertilizante de acordo com a análise química do solo nas condições de casa de vegetação.

As inoculações iniciaram após 7 dias de germinação e ocorreram a cada 10 dias. Foram inoculados 10 mL em cada um dos 180 vasos de cada cultura, com três inoculações durante o período do experimento. No total cada cultura recebeu 10,8 L de inoculante *B. subtilis* em um período de 40 dias de desenvolvimento em casa de vegetação.

5. AVALIAÇÕES

5.1. Altura e massa vegetal fresca

Após esse período, foram avaliadas as características seguindo o trabalho de Lobo, dos Santos & Rigobelo (2019):

- Altura: medida desde a base da planta (rente ao chão) até o ápice com auxílio de fita métrica.

- Massa vegetal fresca da parte aérea e da raiz: foi separada parte aérea da raiz e determinada a massa vegetal fresca com balança analítica.

5.2. Concentração de nitrogênio e fósforo

- Concentração de nitrogênio na parte aérea: o processo seguiu o método de Bezerra & Neto (2011), proposto anteriormente por Bremner (1996) e Mulvaney (1996). Mensurou-se 0,1 g de amostra vegetal, essa massa foi adicionada no tubo digestor junto com 7 mL de mistura digestora para seguir em bloco digestor seguindo a sequência de tempo e temperatura de 1h a 100 °C, 1h a 200 °C e 1h a 300 °C. Depois disso o material digerido foi resfriado e dissolvido em 10 mL de água destilada. A destilação ocorreu em destilador semi-micro Kjeldahl com 25 mL de NaOH (50%). O material destilado foi recolhido em 10 mL de solução de ácido bórico, um indicador, e obtendo-se 20 mL no total. A titulação da amônia destilada foi feita usando solução padrão de H_2SO_4 0,05 N, sendo o ponto final da titulação a mudança de cor (de verde para vermelho claro). Consideramos que 1,0 mL do ácido sulfúrico 0,05 N na titulação corresponde a 0,7 g de N na amostra.

- Concentração fósforo na parte aérea: foi utilizada a metodologia espectrometria com amarelo de vanadato, descrito por Carmo *et al.* (2000). Foi adicionado 0,5 g da amostra vegetal no tubo digestor junto com 5 mL de ácido nítrico concentrado e 1 mL de ácido perclórico para que ocorra uma pré-digestão nitro-perclórica em repouso de um dia para o outro. Após esse período realizou-se a digestão completa em bloco digestor seguindo a sequência de tempo e temperatura de 1h a 80 °C, 1h a 120 °C, 1h a 150 °C e 1h a 180 °C. Obtém-se 50 mL de extrato após a lavagem do material digerido com água destilada. Então é feita a leitura em espectrofotômetro a 470 nm utilizando 5 mL do extrato e 1 mL do reagente (mistura de volumes iguais de molibdato de amônio a 5% e vanadato de amônio a 0,25%).

5.3. Reisolamento dos isolados transformados

O reisolamento dos isolados transformados foram realizados com 40 dias após o plantio. O reisolamento ocorreu para as raízes que foram separadas e lavadas em água corrente para retirada de solo agregado e outras impurezas.

A desinfecção superficial dos tecidos foi feita utilizando metodologia descrita por Araújo *et al.* (2002b). Os tecidos foram cortados e pesados assepticamente 0,5 g que foram macerados com 4,5 mL de NaCl de concentração 0,1%. A diluição para reduzir a concentração do inóculo consiste na passagem de 1mL de cada tubo para outro

com 9mL de solução salina. Esses tubos com a diluição específica passaram por um tratamento de choque térmico com temperatura de 80 °C durante 10 min em banho-maria e logo em seguida rapidamente os tubos foram colocados em recipiente com água gelada durante 5 minutos. Esse tratamento foi feito com base no estudo de Rothfuss, Bender e Conrad (1997) sobre esporos de *Bacillus* sp. resistentes a altas temperaturas, diferentemente de outros gêneros.

Depois 100 µL de suspensão foram plaqueados em meio de cultura BHI contendo ampicilina (100 µg/mL). As placas de pétri foram colocadas em crescimento em 28 °C e a contagem das colônias foi feita em 24 e 48h.

5.4. Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos para a análise de variância, com aplicação do teste F, utilizando o programa AgroEstat (BARBOSA & MALDONADO JUNIOR, 2011).

Quando houve significância, foi realizada comparação de médias pelo teste Duncan ao nível de 5% ($p < 0,05$) e 1% ($p < 0,01$) de probabilidade.

6. RESULTADOS

6.1. Transformação

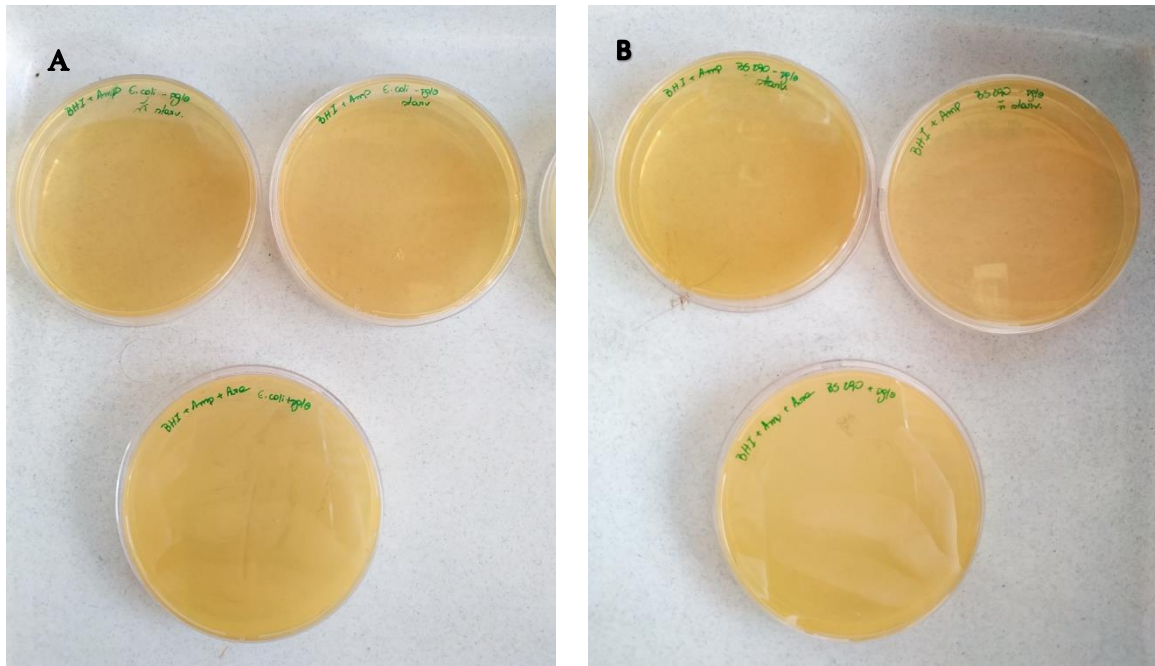


Figura 1. Presença de crescimento da *E. coli* transformada em meio BHI (A). Presença de crescimento do *B. subtilis* 290 transformado na presença de ampicilina (B)

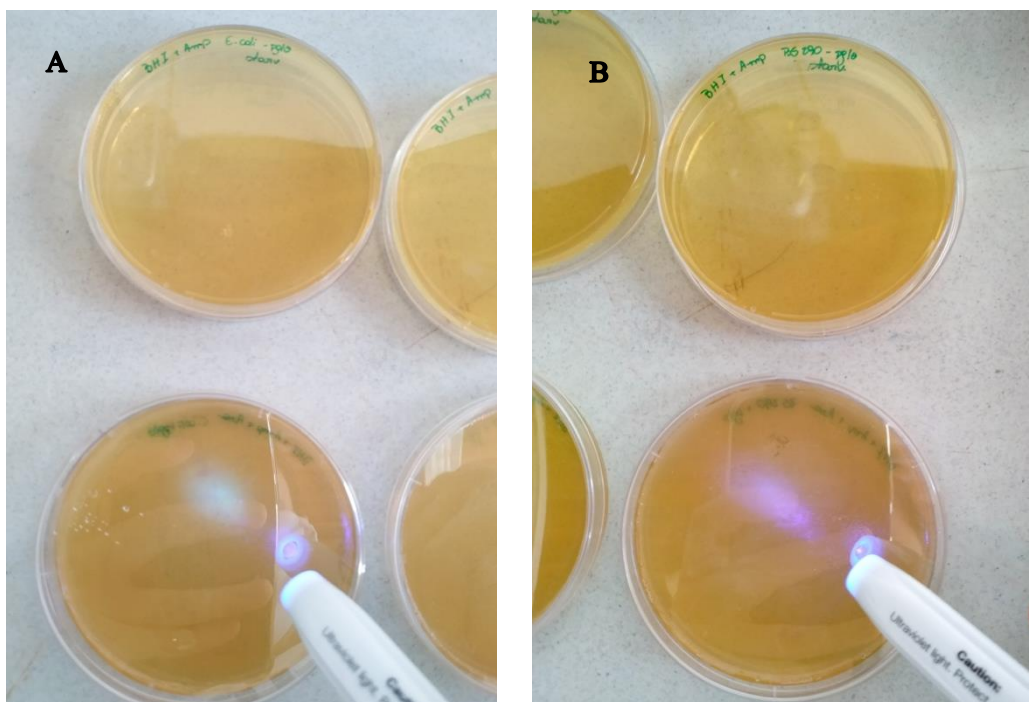


Figura 2. Emissão de fluorescência da *E. coli* transformada em meio BHI (luz verde na placa de Petri) (A). Presença de *B. subtilis* 290 transformado no meio com ampicilina e sem a presença da fluorescência (B). A luz violeta na placa é reflexo da luz emitida pela caneta de luz UV.

As bactérias *B. subtilis* da cepa 290, não emitiram fluorescência na presença da arabinose, como ocorreu com a *E.coli*, porém foi possível verificar que a transformação foi bem sucedida, pois o gene de resistência à ampicilina foi expressado permitindo que a bactéria crescesse em meio de cultura na presença de ampicilina, enquanto que o mesmo isolado não transformado não cresceu na presença do antibiótico. Portanto, a confirmação da presença das bactérias endofíticas reisoladas e previamente inoculadas nas raízes das plantas foi devido ao crescimento dos isolados em meio com presença de ampicilina na concentração citada anteriormente e não por sua fluorescência.

6.2. Cultura da soja

6.2.1. Altura e peso fresco das plantas

Para a altura das plantas houve interação significativa ($p < 0,05$) entre os fatores inoculação X adubação (Tabela 3). E em seu desdobramento observa-se que, as maiores alturas de plantas em relação ao controle foram encontradas para as concentrações de 1×10^4 a 1×10^9 UFC mL⁻¹, com exceção de 1×10^5 . Para a concentração de 1×10^4 UFC mL⁻¹ a dose de 100% de adubação propiciou um incremento de altura até 50,5 cm, em relação ao controle de 45,7 cm com a mesma dose de adubos. Para as concentrações de 1×10^6 a 1×10^9 UFC mL⁻¹ a dose de 50% proporcionou maior incremento da altura das plantas (53,7, 54,8, 54,8, 53,9 cm, respectivamente) em relação ao controle (51,3 cm). As concentrações de 1×10^2 e 1×10^3 UFC mL⁻¹ não diferiram do controle ($p > 0,05$) (Fig. 3).

Tabela 3. Teste F dos dados analisados no experimento de soja, demonstrando interação se significativa ou não, entre concentrações de inoculante e adubação, atuando sobre altura da planta; peso fresco total, da parte aérea e raiz; *Bacillus* recuperados da raiz, concentração de nitrogênio e fósforo na parte aérea.

Tratamentos	Altura ---cm---	MFPA -----g-----	MFR -----g-----	MFT -----g-----	<i>Bacillus</i> nas raízes -----UFC-----	N PA -----g Kg ⁻¹ -----	P PA -----g Kg ⁻¹ -----
Inoculação							
Controle	43,00b	11,73a	2,55ab	14,62a	6,18cd	34,15c	1,56c
1×10^2	42,81b	11,62a	2,12abcd	13,72a	6,08d	38,08ab	2,21a
1×10^3	42,98b	13,53a	2,79a	16,20a	6,40c	36,46bc	2,12a
1×10^4	43,96ab	11,68a	1,66d	13,47a	6,91b	41,29a	2,28a
1×10^5	44,08ab	13,79a	2,49abc	16,38a	6,34c	36,13bc	1,83b
1×10^6	47,79a	13,43a	2,01bcd	15,64a	6,91b	38,63ab	2,14a

1x10 ⁷	46,29ab	11,75a	1,67d	13,79a	7,08b	36,99bc	2,21a
1x10 ⁸	44,63ab	13,56a	2,5abc	16,18a	7,06b	39,58ab	2,24a
1x10 ⁹	44,48ab	14,32a	1,75cd	15,84a	7,48a	39,73ab	2,14a
1x10 ¹⁰	46,63ab	14,82a	2,21abcd	17,16a	7,54a	39,50ab	1,90b
Adubação							
0%	37,20c	6,81c	1,92c	19,91d	6,75a	27,07c	1,00c
25%	45,98b	13,98b	3,02a	17,37b	6,77a	39,68b	2,14b
50%	50,43 ^a	17,44a	2,38b	19,91a	6,84a	43,07a	2,50a
100%	45,04b	13,86b	1,38d	15,08c	6,83a	42,40a	2,61a
Teste F							
Inoculação	2,01*	1,39NS	2,87**	1,21NS	49,50**	3,16**	11,88**
Adubação	52,29**	46,92**	21,50**	40,13**	0,78NS	97,43**	309,20**
Interação I x A	1,97*	1,13NS	1,58NS	1,29NS	7,86**	2,25**	3,60**
CV (%)	9,33	27,40	37,74	26,78	3,80	10,89	11,12

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem de acordo com o teste de Duncan a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). NS: não significativo. * e ** significativo ao teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente. MFPA = Massa Fresca da Parte Aérea; MFR = Massa Fresca das Raízes; MFT = Massa Fresca Total; N PA = Concentração de Nitrogênio da Parte Aéreas; P PA = Concentração de Fósforo da Parte Aérea.

Não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre os fatores para os valores de massa fresca de parte aérea, de raízes e total, porém foi verificada diferença para os fatores isolados ($p < 0,05$) (Tabela 3). Quando comparado o fator adubação para massa fresca de parte aérea e total, houve diferença e as doses de 25, 50 e 100% de adubação apresentaram plantas com mais massa que o controle com 0%. Para massa fresca de raízes, as doses de 25 e 50% foram melhores que o controle, enquanto que a dose de 100% prejudicou o crescimento das plantas em relação controle (Fig. 4A).

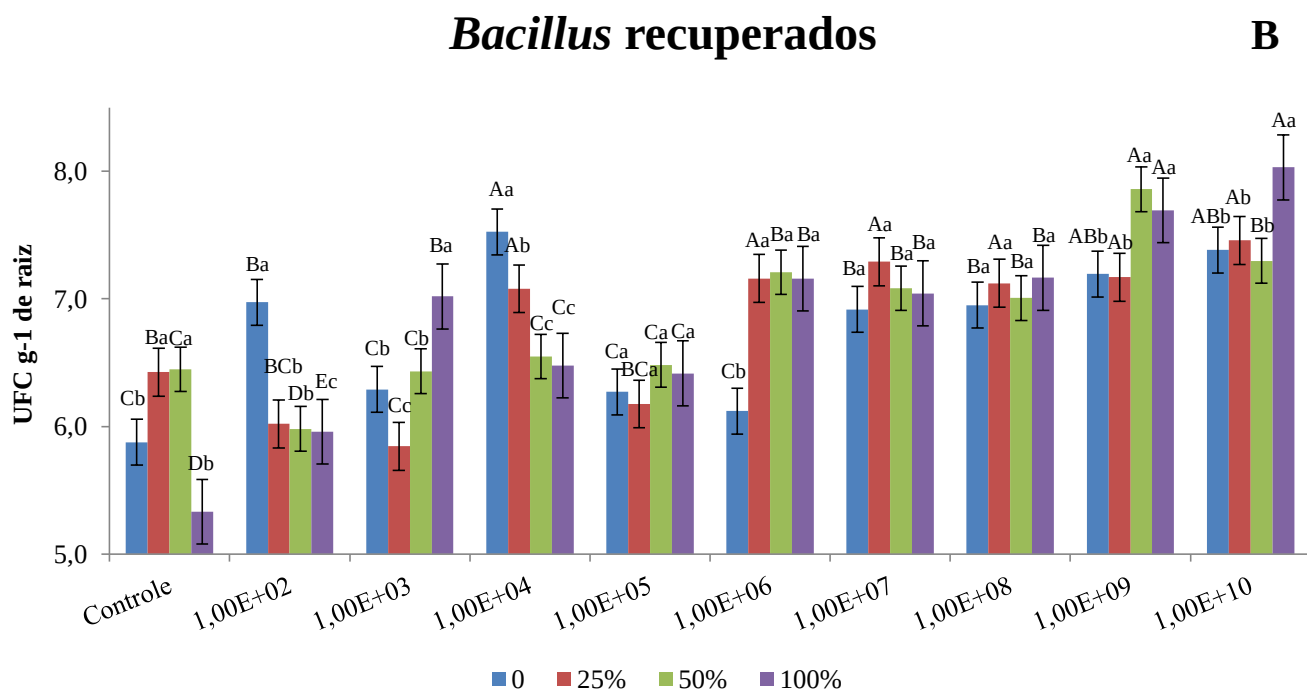
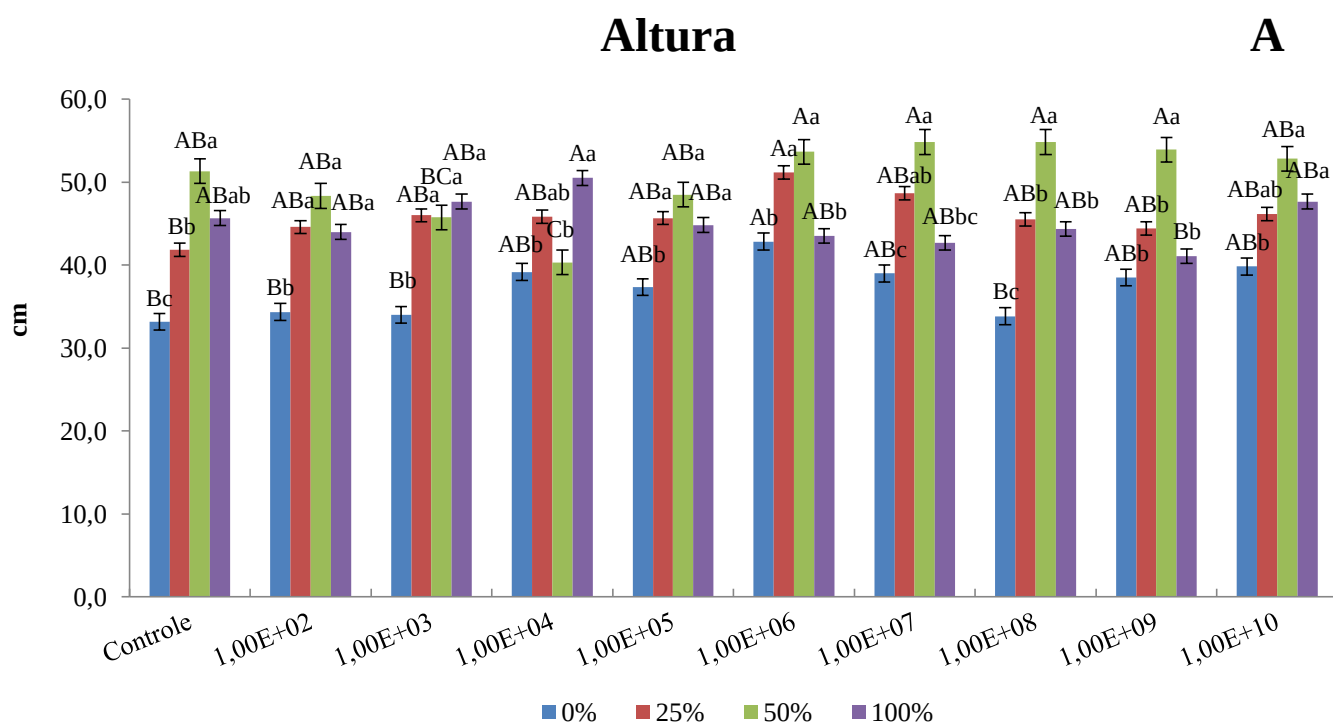


Figura 3. Desdobramento da interação entre as concentrações de inóculos e doses de adubação atuando sobre altura (A) e a concentração de *Bacillus* recuperados das raízes (B) das plantas de soja. Letras maiúsculas comparam médias dentro de inoculações e letras minúsculas comparam médias dentro de adubações (Duncan $p \leq 0,05$). Dados de UFC foram transformados em log 10.

Para massa fresca de raízes quanto ao fator inóculo a melhor concentração foi de 1×10^3 UFC mL^{-1} diferindo positivamente das concentrações de 1×10^4 , 1×10^6 , 1×10^7 e 1×10^9 UFC mL^{-1} , porém não houve diferença positiva em relação ao controle (Fig. 4A).

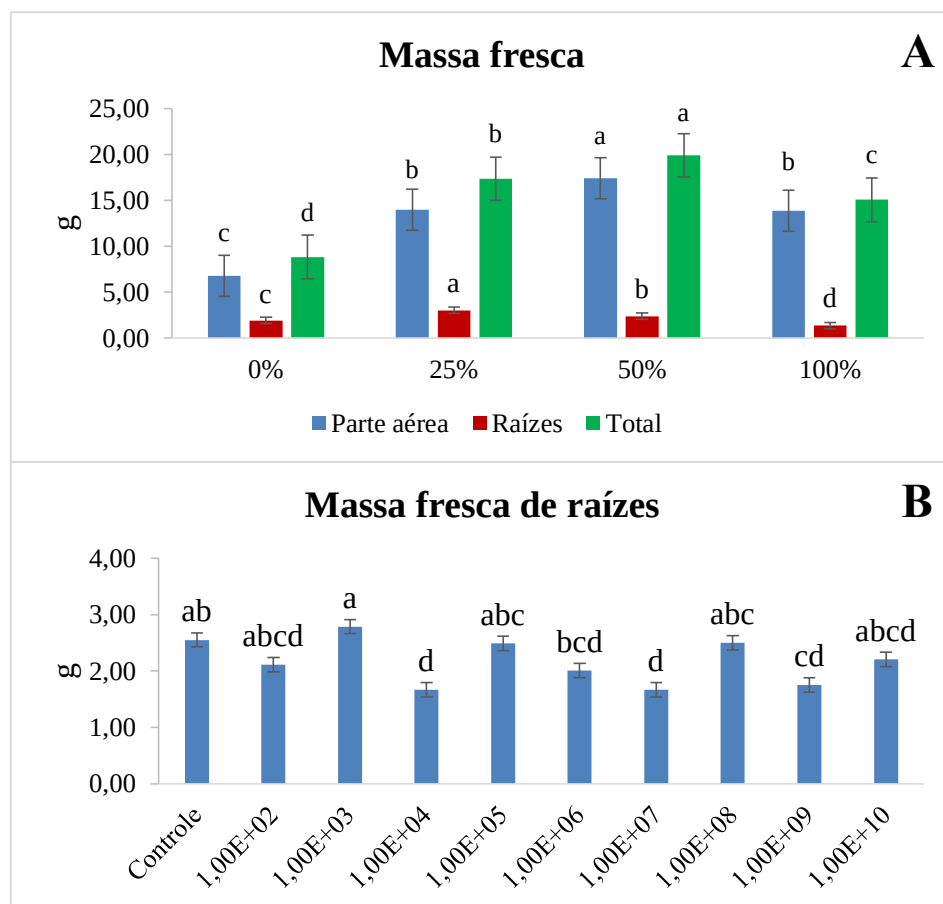


Figura 4. Massa fresca de parte aérea, de raízes e total quando comparado o fator adubação (A); massa fresca de raízes quando comparado o fator inoculação (B). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem de acordo com o teste de Duncan a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

6.2.2. Quantidade de *Bacillus* recuperados

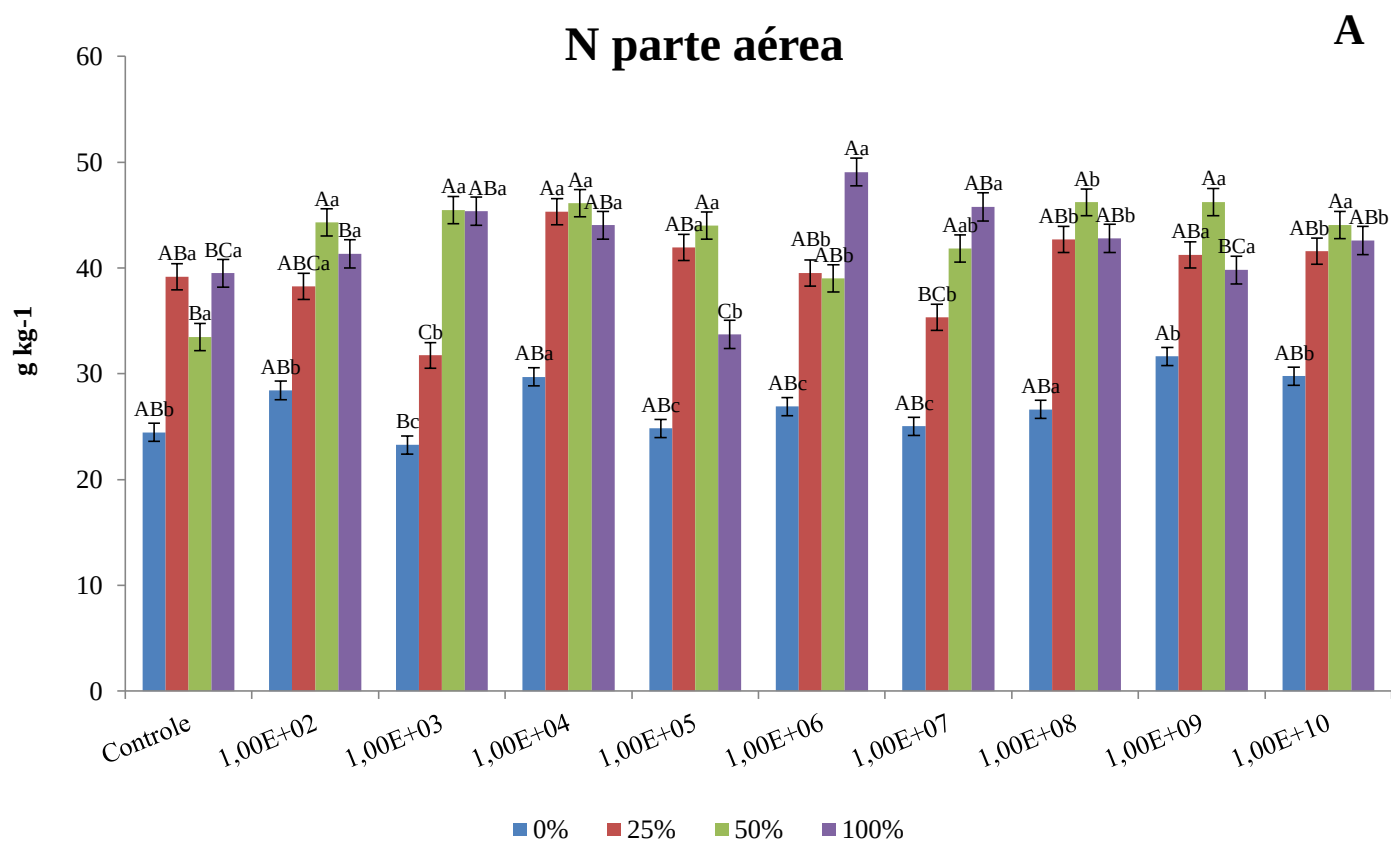
Houve interação significativa ($p < 0,01$) entre os fatores para o número de *Bacillus* recuperados nas raízes das plantas de soja (Tabela 3) e o maiores números encontrados foram onde receberam as inoculações nas concentrações de 1×10^4 junto com a dose de 0%; 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 junto com a dose de 25%; 1×10^9 com a dose de 50% e 100% e 1×10^{10} UFC mL^{-1} com a dose de 100% de adubação, todos diferindo do controle (Fig. 3B).

6.2.3. Concentração nitrogênio e fósforo na parte aérea

Para os teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea houve interação entre os fatores ($p < 0,01$) (Tabela 3).

A maior concentração de nitrogênio na parte aérea foi encontrada nas doses de 1×10^2 a 1×10^{10} (45 g kg^{-1}) com 50% de adubação, exceto nas concentrações de 1×10^6 e 1×10^8 (Fig. 5A).

Em relação a concentração de fósforo na parte aérea, as concentrações 1×10^2 ($3,0 \text{ g kg}^{-1}$) e 1×10^7 UFC mL^{-1} ($3,0 \text{ g kg}^{-1}$) na dose de 100% promoveram os maiores incrementos de fósforo se comparados ao controle e tratamentos com menores doses de adubação (Fig. 5B).



P parte aérea

B

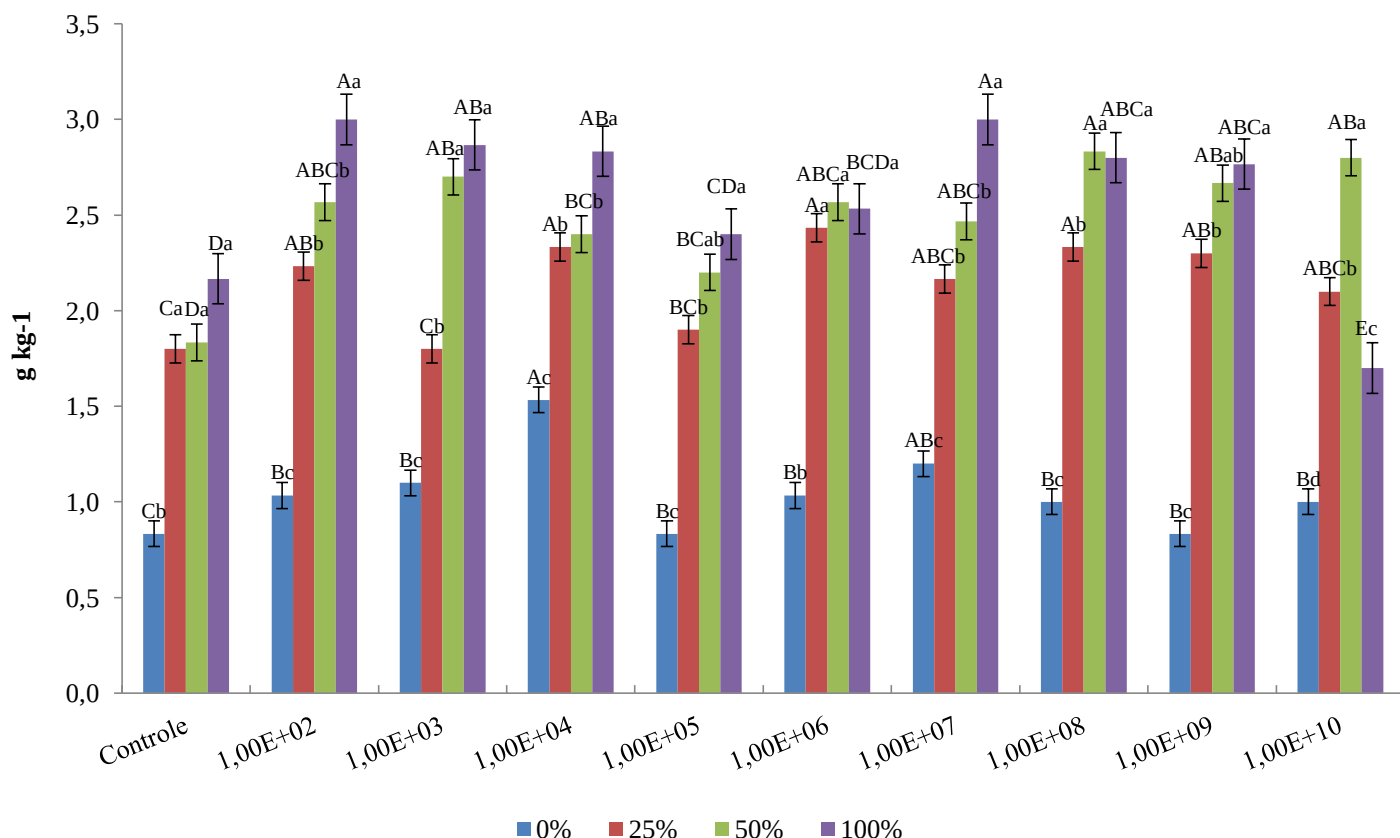


Figura 5. Concentração de nitrogênio (A) e fósforo (B) na parte aérea de plantas de soja. Letras maiúsculas comparam médias dentro de inoculações e letras minúsculas comparam médias dentro de adubações (Duncan $p \leq 0,01$).

6.3. Cultura do milho

6.3.1. Altura e peso fresco das plantas

Houve interação significativa entre os fatores inoculação e adubação para a altura das plantas de milho ($p < 0,05$) (Tabela 4). Não houve diferença entre os tratamentos que receberam inoculação e o tratamento controle nas doses de 0, 25 e 50% de adubação. Para os tratamentos com 100% de adubação, todos que receberam inoculação foram melhores, com exceção de 1×10^4 e 1×10^9 UFC mL⁻¹ (Fig. 6A).

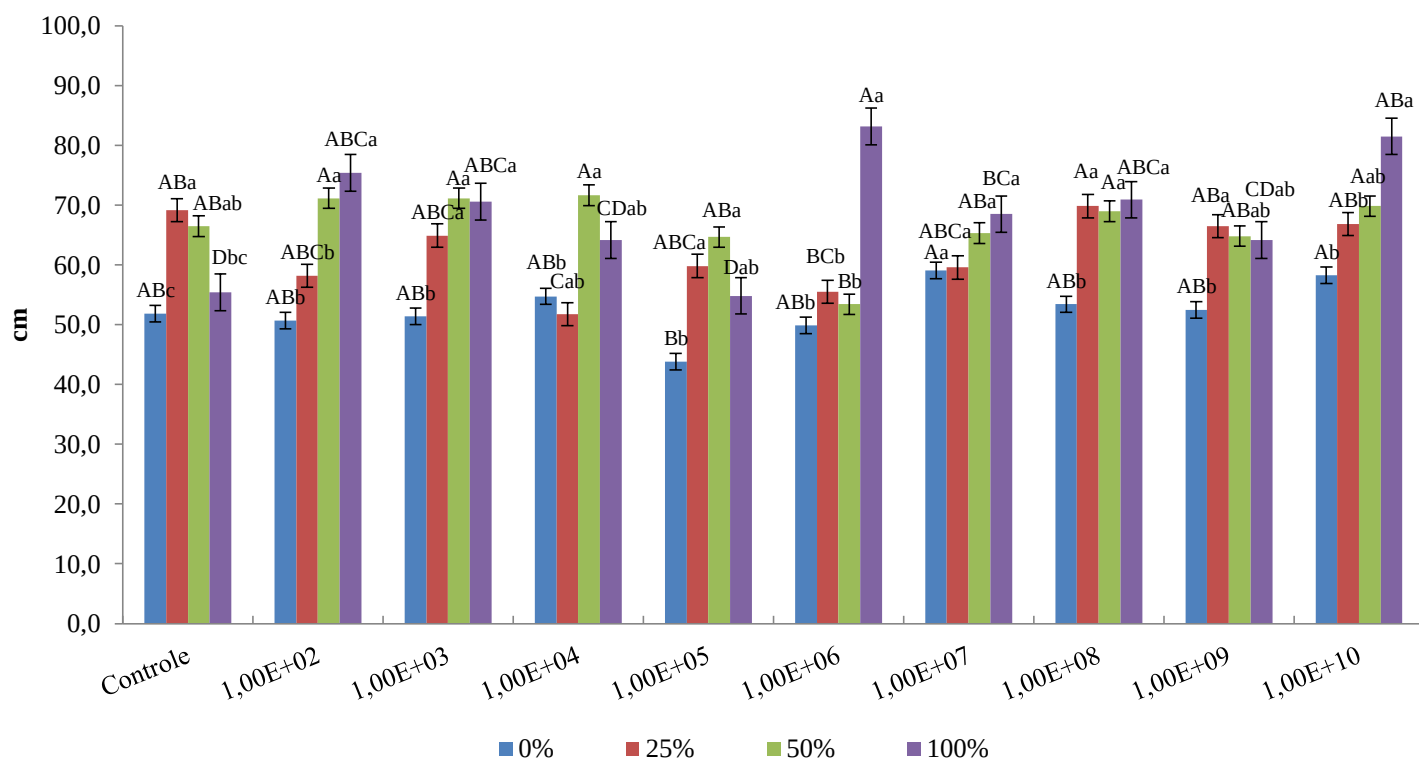
Tabela 4. Teste F dos dados analisados no experimento de milho, demonstrando interação se significativa ou não, entre concentrações de inoculante e adubação, atuando sobre altura da planta; peso fresco total, da parte aérea e raiz; *Bacillus* recuperados da raiz, concentração de nitrogênio e fósforo na parte aérea.

Tratamentos	Altura ---cm---	MFPA -----g-----	MFR	MFT	<i>Bacillus</i> nas raízes -----UFC-----	N PA -----g Kg ⁻¹ -----	P PA
Inoculação							
Controle	60,73bc	31,65b	3,75a	35,40a	6,52d	22,21c	1,35e
1x10 ²	63,85ab	33,44ab	3,75a	37,18ab	6,63d	23,44bc	1,47cde
1x10 ³	64,52ab	35,35ab	4,27a	39,62ab	6,84cd	22,08c	1,50bcd
1x10 ⁴	60,58bc	40,74ab	5,60a	46,34ab	6,98cd	24,55ab	1,50bcd
1x10 ⁵	55,79c	34,45ab	3,66a	38,11ab	7,19bc	24,66ab	1,70a
1x10 ⁶	60,50bc	33,84ab	4,18a	38,03ab	7,61ab	24,26ab	1,61ab
1x10 ⁷	63,13ab	34,98ab	4,34a	39,32ab	7,55ab	23,77b	1,41de
1x10 ⁸	65,79ab	44,33a	4,80a	49,14a	7,74a	23,81b	1,57abc
1x10 ⁹	62,00bc	38,90ab	3,95a	42,85ab	7,56ab	24,68ab	1,69a
1x10 ¹⁰	69,10a	43,98a	5,33a	49,31a	7,74a	25,47a	1,63ab
Adubação							
0%	52,57c	15,07b	3,27c	18,34b	7,17b	15,99c	1,78a
25%	62,21b	41,54a	5,62a	47,16a	7,58a	25,44b	1,75a
50%	66,76a	45,54a	3,86bc	49,40a	7,07b	27,13a	1,67b
100%	68,87a	46,51a	4,71ab	51,22a	7,14b	27,03a	0,97c
Teste F							
Inoculação	2,91**	1,59NS	1,28NS	1,60NS	8,30**	5,37**	6,94**
Adubação	29,43**	43,06**	7,37**	37,53**	5,09**	324,67**	182,82**
Interação I x A	2,37*	1,15NS	0,91NS	1,11NS	1,84*	6,63**	5,57**
CV (%)	11,68	33,43	47,44	33,47	7,73	6,77	10,04

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem de acordo com o teste de Duncan a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). NS: não significativo. * e ** significativo ao teste F, a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente. MFPA = Massa Fresca da Parte Aérea; MFR = Massa Fresca das Raízes; MFT = Massa Fresca Total; N PA = Concentração de Nitrogênio da Parte Aéreas; P PA = Concentração de Fósforo da Parte Aérea.

Altura

A



Bacillus recuperados

B

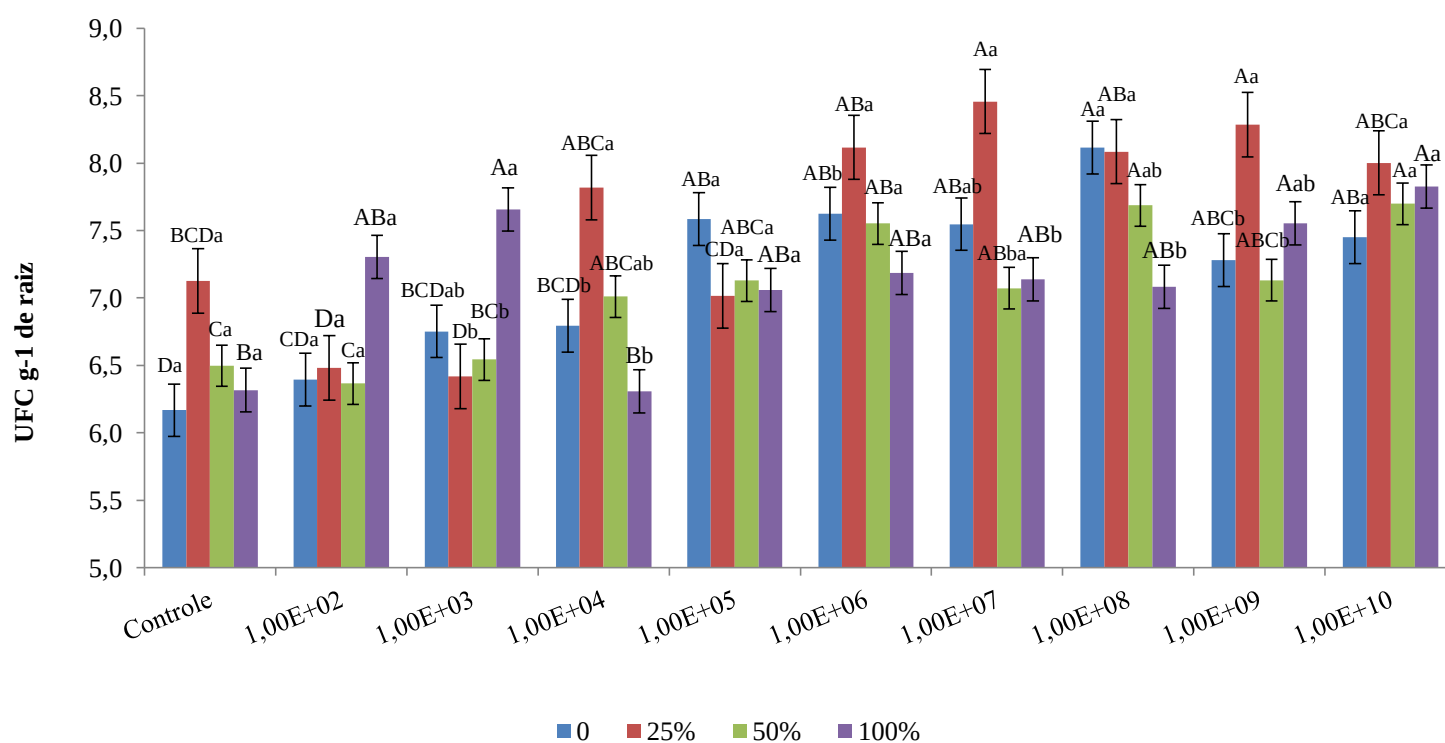


Figura 6. Desdobramento da interação entre as concentrações de inóculos e doses de adubação atuando sobre altura (A) e a concentração de *Bacillus* recuperados das raízes (B) das plantas de milho. Letras maiúsculas comparam médias dentro de inoculações e letras minúsculas comparam médias dentro de adubações (Duncan $p \leq 0,05$). Dados de UFC foram transformados em log 10.

Não houve interação significativa ($p > 0,05$) entre os fatores para os valores de massa fresca de parte aérea, de raízes e total, porém foi verificada diferença para o fator adubação ($p < 0,05$) (Tabela 4). Para massa fresca de parte aérea e total, as doses de 25, 50 e 100% de adubação apresentaram plantas com mais massa que a dose de 0%. Para massa fresca de raízes as doses de 25% (5,6 g) e 100% (4,7 g) foram superiores que o tratamento controle com dose de 0% de adubação (3,3 g) (Fig. 7)

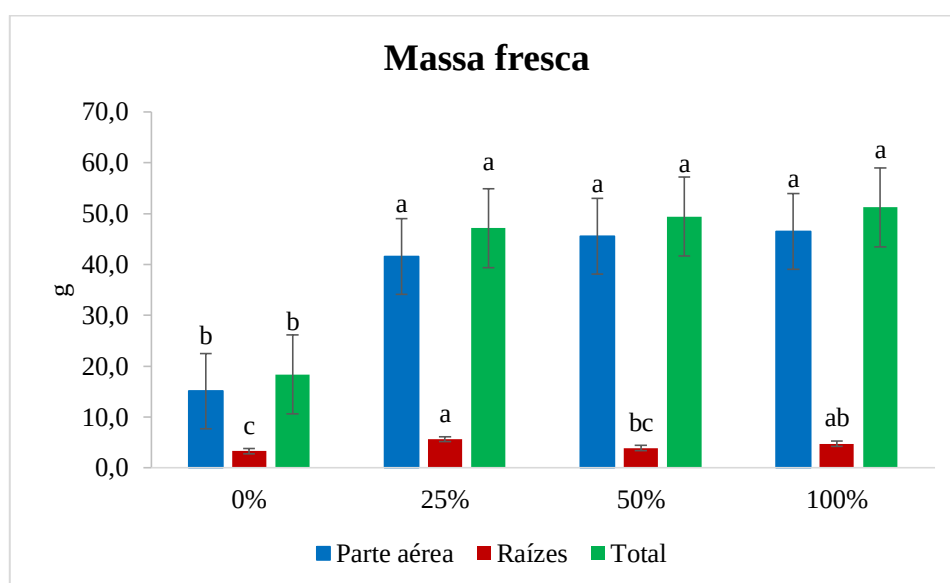


Figura 7. Massa fresca de parte aérea, de raízes e total quando comparado o fator adubação (A). Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem de acordo com o teste de Duncan a 5% de probabilidade ($p < 0,05$).

6.3.2. Quantidade de *Bacillus* recuperados

Foi observada interação significativa entre os fatores para a quantidade de *Bacillus* recuperados de raízes de milho ($p < 0,05$) (Tabela 4). E seu desdobramento mostrou que a maior parte dos *Bacillus* foram encontrados nos tratamentos com inoculações de 1×10^3 e 1×10^{10} na dose de 100% de adubação, 1×10^{10} na dose de 50%, 1×10^8 sem adubação e 1×10^7 e 1×10^9 UFC mL^{-1} na dose de 25% todos superiores ao controle sem inoculação (Fig. 6B).

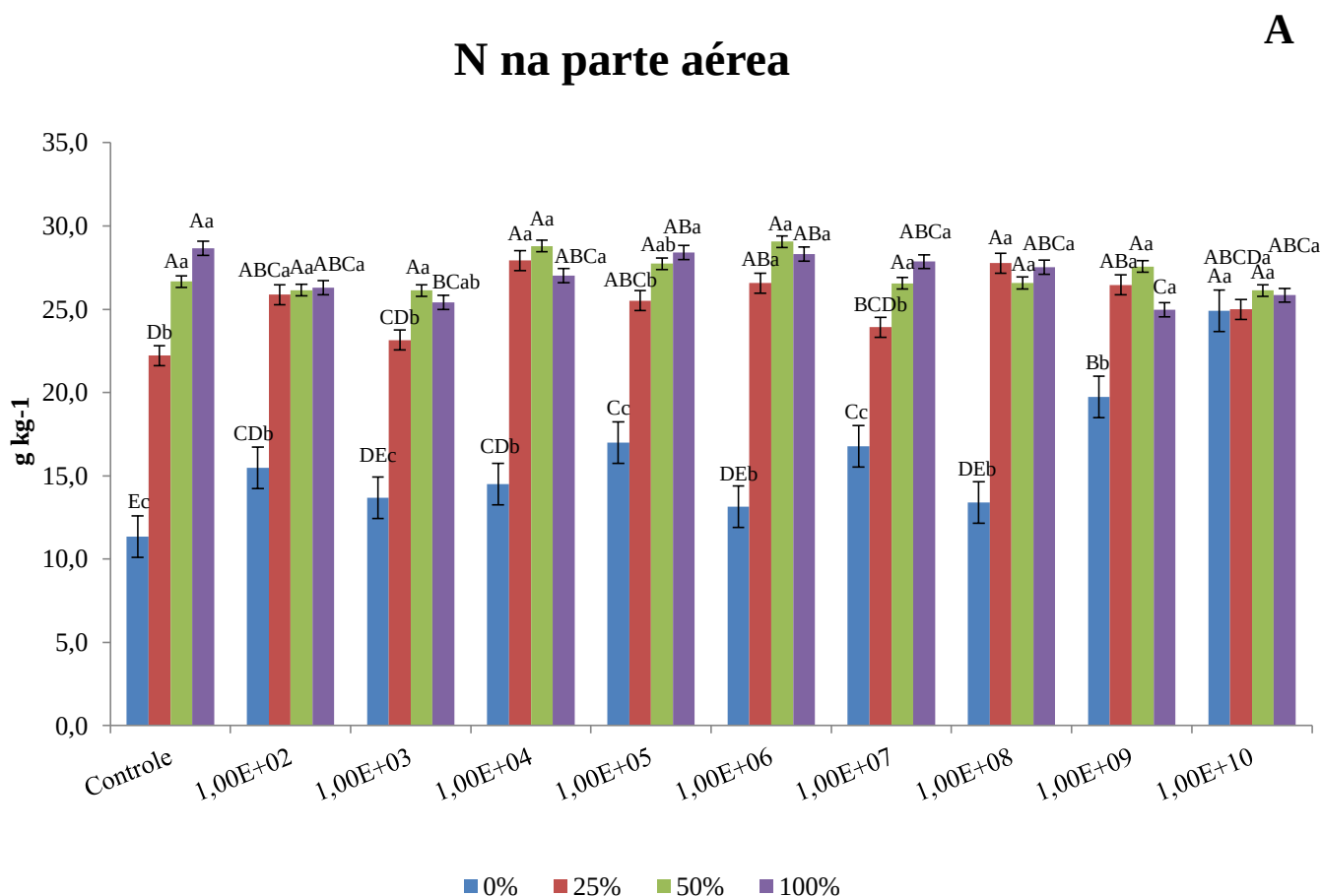
As concentrações que promoveram um incremento no número de *B. subtilis* endofítico comparado com o controle foram de 1×10^5 a 1×10^{10} UFC mL⁻¹.

6.3.3. Concentração de nitrogênio e fósforo na parte aérea

Para os teores de nitrogênio e fósforo na parte aérea houve interação entre os fatores ($p < 0,01$) (Tabela 4).

As menores concentrações de nitrogênio foram observadas na dose de 0% de adubação para todas as concentrações de inóculo, exceto para 1×10^{10} UFC mL⁻¹. A dose de 50% promoveu os valores mais altos de nitrogênio na planta, independente da concentração de inóculo (Fig. 8A).

Em relação aos teores de fósforo na parte aérea, as concentrações de inóculo que promoveram maior incremento foram 1×10^5 e 1×10^{10} na dose de 100%, 1×10^6 na dose de 50%, 1×10^9 na dose de 25%, comparando-os ao controle (Fig. 8B).



P Parte aérea

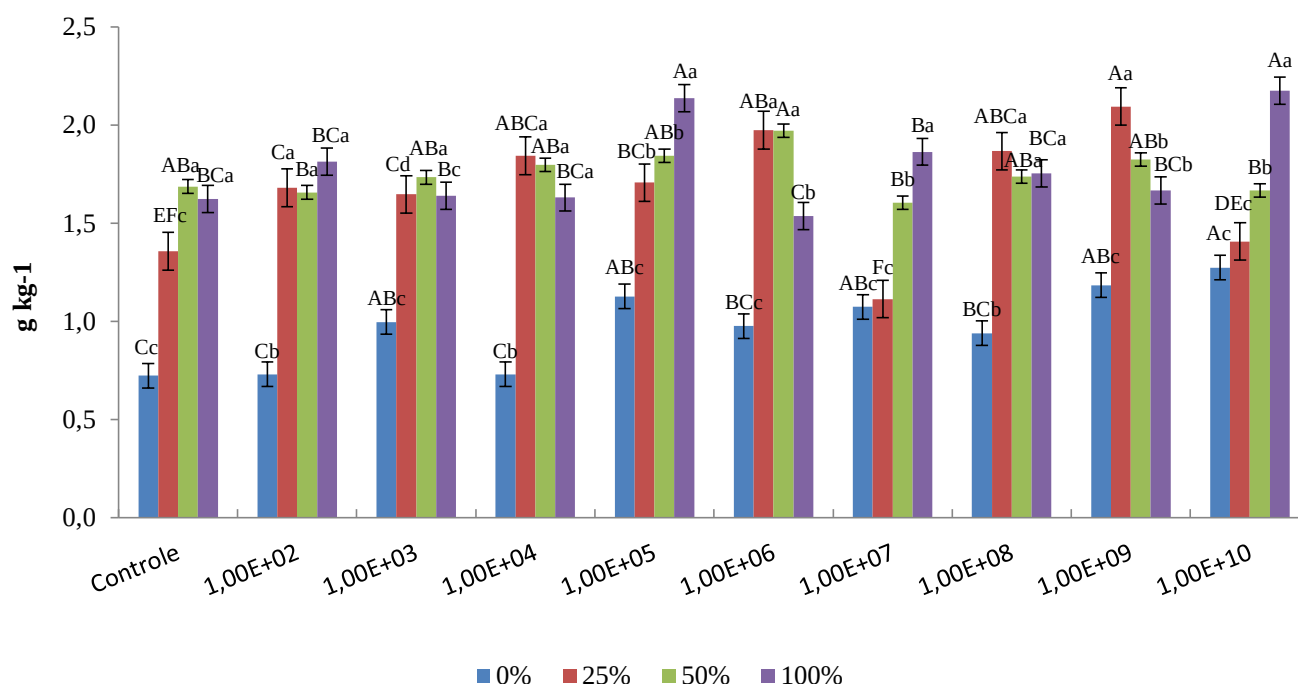


Figura 8. Concentração de nitrogênio (A) e fósforo (B) na parte aérea de plantas de milho. Letras maiúsculas comparam médias dentro de inoculações e letras minúsculas comparam médias dentro de adubações (Duncan $p \leq 0,01$).

7. DISCUSSÃO

A microbiota vegetal é uma entidade complexa composta pelos microrganismos que vivem dentro e fora da planta. Ela inclui, entre outros microrganismos, bactérias endofíticas que são bactérias que podem invadir os tecidos vivos das plantas sem causarem sintomas de doenças. A interação entre bactérias da microbiota endofítica e sua planta hospedeira exerce profunda influência na sua condição fisiológica e depende de fatores bióticos e abióticos. Para essas interações serem estabelecidas a bactéria precisa estar presente no tempo e no lugar correto, colonizando o solo ou a semente (TAULÉ, VAZ-JAURI & BATTISTONI, 2021).

Estudos já demonstraram a promoção do crescimento em diferentes hospedeiros por *Bacillus subtilis* (ARAÚJO, HENNING & HUNGRIA, 2005; BATISTA, 2012), que têm capacidade de produzir fitohormônios como giberelinas (ZHANG *et al.*, 2015), ácido indol-butírico e ácido indol-acético que são tipos de auxinas, e ainda podem

secretar enzimas (POWAR & JAGANNATHAN, 1982). Essas habilidades permitem que a *B. subtilis* seja uma das responsáveis por auxiliar o crescimento vegetal, fornecendo fitohormônios não só na rizosfera, mas também produzindo-os diretamente no interior das plantas caso seu endofitismo seja bem-sucedido, o que lhe permite regular os níveis hormonais das mesmas (ASAF *et al.*, 2017).

Existem poucas informações sobre a influência da concentração do inóculo bacteriano e da dose da fertilização mineral sobre o endofitismo de *B. subtilis* nas culturas da soja e do milho.

Porém, os resultados presentes neste estudo mostram que para a cultura da soja a interação entre a dose de 50% de adubação com os inoculantes é a que mais favoreceu o incremento de altura, fazendo com que as plantas atingissem tamanho superior do que a melhor interação na adubação 100%.

Assim como para o número de *Bacillus* recuperados, doses menores de adubação mostraram melhores resultados do que as plantas que receberam adubação 100% junto com o inoculante. A concentração de 1×10^4 obteve bons resultados em seu endofitismo em 0% de adubação, enquanto a 1×10^6 UFC mL⁻¹ a 1×10^8 UFC mL⁻¹ obtiveram bons resultados em 25%, 1×10^9 UFC mL⁻¹ demonstraram endofitismo com 50% de adubação e apenas a concentração mais alta de inoculante, 1×10^{10} UFC mL⁻¹, demonstrou capacidade de endofitismo à 100%, comparando-os com os tratamentos controle (sem inoculação e sem adubação).

Na cultura do milho, as doses de 1×10^7 e 1×10^9 UFC mL⁻¹ em 25% de adubação demonstraram os melhores resultados no endofitismo se comparados a todas as outras interações de adubação e de inoculação.

As Bactérias Promotoras de Crescimento em Plantas (BPCP) como a *B. subtilis* têm a habilidade de secretar substâncias exopolissacarídeas ou outros polímeros extracelulares que estão relacionados à colonização (MARTÍNEZ-GIL, YOUSEF-CORONADO & ESPINOSA-URGEL, 2010; AMAYA-GOMES *et al.*, 2020). A secreção dessas substâncias pelas bactérias permite a formação de um biofilme que é um estado onde as populações bacterianas vivem em comunidades inseridas em uma matriz formada por suas próprias secreções (FLEMMING & WINGENDER, 2010; SHAHID *et al.*, 2021).

A capacidade das bactérias em formar biofilmes é considerado como uma característica essencial para a colonização das raízes realizadas por *Bacillus* (BEAUREGARD *et al.*, 2013) e a formação dos mesmos é acionada por vários sinais que diferem de uma espécie bacteriana para a outra. Um desses sinais é o processo de *quorum sensing*, no qual a bactéria reconhece suas próprias densidades populacionais, via detecção de moléculas específicas denominadas autoindutores (DANHORN & FUQUA, 2007) ou então por ação das próprias plantas que podem alterar a composição de seus exudatos Meena *et al.* (2005).

Exudatos de raízes de pepino podem estimular a formação desses biofilmes para a bactéria *B. amyloliquefaciens* SQR9. As análises da composição desses exudatos mostrou que o fumarato e o citrato podem ter um pequeno efeito na formação do biofilme, mas outras moléculas não identificadas presentes no exudato, agem fortemente sobre essa bactéria (ZHANG *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2020; BLAKE, CHRISTENSEN & KOVÁCS, 2021). Exudatos de raízes de tomate contendo vários ácidos orgânicos como oxalato, malato, succinato e citrato tiveram pouco efeito na formação de biofilme de *B. amyloliquefaciens*, isolado T-5. Entretanto, esses ácidos induziram fortemente o crescimento bacteriano, um comportamento multicelular coordenado e um movimento rápido em superfícies sólidas 19 e semi-sólidas que poderiam favorecer a colonização ao longo das raízes (VASSEUR-CORONADO *et al.*, 2021).

Porém, os resultados apresentados demonstram uma interferência da dose de adubação sobre a capacidade de endofitismo das bactérias aplicadas além da própria capacidade de modulação da planta. Assim como Robinson *et al.* (2015) observaram que, em plantas de trigo, a aplicação de fertilizante nitrogenado no solo pode alterar a liberação de exudatos das raízes, funcionando assim como um mecanismo de seleção para a colonização endofítica.

Wemheuer *et al.* (2016), estudando a influência da adubação nitrogenada em três espécies de gramíneas, concluem que o estado nutricional e fisiológico da planta pode resultar em diferentes comunidades de microrganismos endofíticos de acordo também com a espécie da planta. Em Fuentes-Ramirez *et al.* (1999), por exemplo, uma alta dose de fertilizantes nitrogenados inibiu a colonização da cana-de-açúcar por bactérias da espécie *Acetobacter diazotrophicus*.

As inoculações na adubação de 50%, ou seja, metade da dose recomendada, também mostrou melhores resultados quanto à absorção de nitrogênio a partir da concentração de 1×10^2 UFC mL⁻¹, tanto para a cultura da soja quanto para a cultura do milho, se compararmos com todos os outros tratamentos além do controle. Sabe-se que rizobactérias no geral produzem citocinina (CACCIARI *et al.*, 1989) e que o incremento da concentração de nitrogênio nas folhas das plantas pode estar ligado ao aumento da mobilização deste nutriente na planta, função relacionada diretamente a este fitohormônio (DOURADO NETO *et al.*, 2004).

Quanto à concentração de fósforo na parte aérea da cultura da soja foi observado melhores resultados em duas doses de inoculações combinadas com 100% de adubação, (as doses de 1×10^2 e 1×10^7 UFC mL⁻¹) sendo que para a cultura do milho duas concentrações de inoculantes também foram bem-sucedidas na adubação 100%, mas outras se destacaram, como 1×10^6 UFC mL⁻¹ em 50% de adubação e 1×10^9 UFC mL⁻¹ em 25%.

Bons resultados da interação dos inoculantes em relação as concentrações de adubação podem ter relação com o aumento da atividade enzimática (fosfatases) e a capacidade de solubilização do fósforo por bactérias do gênero *Bacillus* como apontado por Rodriguez (1999). E os melhores resultados em doses mais altas de adubação em combinação com doses de inoculantes demonstram que as bactérias aceleraram o processo de absorção do fósforo já disponibilizado via fertilizantes.

Chapin III *et al.* (1987) assim como Hu *et al.* (2018) relatam que as plantas percebem uma ampla variedade de fatores ambientais, tais como a presença de nutrientes, seca, microrganismos benéficos e patógenos. A combinação desses fatores modula o processo de exudação que conseqüentemente modula a colonização das raízes.

A colonização dos tecidos vivos das plantas pelas bactérias endofíticas permite um aumento da interação planta-microrganismo, possibilitando uma maior eficiência da utilização das habilidades das bactérias em promover o crescimento vegetal por parte das plantas, como por exemplo, a síntese de fitohormônios. Entretanto, os resultados mostram que o maior número de bactérias endofíticas não promove, necessariamente, um maior crescimento vegetal. Esses resultados sugerem que, provavelmente, o efeito de promoção de crescimento esteja relacionado a estreita relação entre planta – microrganismo e suas habilidades e não à quantidade de microrganismo dentro do

tecido vegetal. Lobo, dos Santos & Rigobelo (2019) utilizando o mesmo *B. subtilis* do presente estudo, verificaram que o único tratamento que não diferiu do controle, na cultura do milho, foi o que promoveu um incremento de produtividade comparado com o controle.

8. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que para a cultura da soja as maiores concentrações do *B. subtilis* variou de acordo com a dose da adubação, bons resultados foram obtidos desde a inoculação da concentração de 1×10^4 até 1×10^{10} UFC mL⁻¹ (com excessão de 1×10^5 UFC mL⁻¹) comparando-os com os tratamentos controle. Porém, conforme a dose de adubação elevou, apenas os inoculantes de maior concentração promoveram o endofitismo.

Para o milho, bons resultados foram obtidos da concentração 1×10^5 até 1×10^{10} UFC mL⁻¹ majoritariamente interagindo com doses de 25 e 50% de adubação. A dose de 25% de fertilizante mineral promoveu a maior recuperação de *B. subtilis* comparado com os outros tratamentos. Demonstrando que a dose de fertilização mineral em ambas as culturas interferiu no número de bactérias recuperadas.

Em relação ao desenvolvimento vegetal, interessante as maiores concentrações microbianas do inoculado não promoveram necessariamente os maiores efeitos positivos de promoção de crescimento do que a concentração de 1×10^4 UFC mL⁻¹ para ambas culturas. Os resultados também sugerem que os maiores números de bactérias endofíticas recuperadas na planta não afetam necessariamente o crescimento vegetal na mesma proporção, este pode ser afetado por outros fatores como por exemplo a produção de fitohomônios disponibilizados às plantas em associação.

9. BIBLIOGRAFIA

AMAYA-GÓMEZ, C. V.; PORCEL, M.; MESA-GARRIGA, L.; GÓMEZ-ÁLVAREZ, M. I. A Framework for the Selection of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Based on Bacterial Competence Mechanisms. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 86, n. 14, p. 1-13, 2 jul. 2020. American Society for Microbiology.

ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPIZIZEN, J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 81, n. 5, p. 741-746, maio 1961. American Society for Microbiology.

AQUINO, J. P. A. de; MACEDO JUNIOR, F. B. de; ANTUNES, J. E. L.; FIGUEIREDO, M. do V. B.; ALCÂNTARA NETO, F. de; ARAUJO, A. S. F. de. Bactérias endofíticas promotoras de crescimento em milho e sorgo. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [S. l.], v. 49, p. e56241, 2019.

ARAÚJO, W. L. Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta-enxertos de citros. **Dissertação**: Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. São Paulo – SP, jul. 1996.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum*/*Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.34, p.1633-1643, 1999.

ARAÚJO, W. L.; LIMA, A. O. S.; AZEVEDO, J. L.; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRA, J.; LACAVA, P. T. **Manual**: isolamento de microrganismos endofíticos. Piracicaba: CALQ, p. 86, 2002b.

ARAÚJO, F. F.; HENNING, A.; HUNGRIA, M. Phytohormones and antibiotics produced by *Bacillus subtilis* and their effects on seed pathogenic fungi and on soybean root development. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 21, p. 1639- 1645, 2005.

ARAÚJO, A. S. F de; CARNEIRO, R. F. V.; BEZERRA, A. A. C.; ARAÚJO, F. F. de. Coinoculação rizóbio e *Bacillus subtilis* em feijão-caupi e leucena: efeito sobre a nodulação, a fixação de N₂ e o crescimento das plantas. **Ciência Rural** [online], v. 40, n. 1, 2010.

ASAF, S.; KHAN, M. A.; KHAN, A. L.; WAQAS, M.; SHAHZAD, R.; KIM, AH-Y.; KANG, SANG-M.; LEE, IN-J. Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of *Sphingomonas* sp. and *Serratia marcescens*. **Journal of Plant Interactions**, v.12, p. 31-38, 2017.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO, Jr., W. **AgroEstat**: sistema para análises estatísticas de ensaios agronômicos. Versão 1.0. Jaboticabal: Departamento de Ciências Exatas, 2010.

BATISTA, B. D.. **Promoção de crescimento em milho (*Zea mays* L.) por rizobactérias associadas à cultura do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. 2013. **Dissertação**: Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013

BEAUREGARD, P. B.; CHAI, Y.; VLAMAKIS H.; LOSICK, R.; KOLTER R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 17, p. 1621-1630, 2013.

BERENDSEN, R. L.; PIETERSE, C. M. J.; BAKKER, P. A. H. M.. The rhizosphere microbiome and plant health. **Trends In Plant Science**, [S.L.], v. 17, n. 8, p. 478-486, ago. 2012. Elsevier BV.

- BEZERRA NETO, E.; BARRETO, L. P. **Análises Químicas e Bioquímicas em Plantas**. Recife. Editora Universitária da UFRPE. p. 261, 2011.
- BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M. N.; KOVÁCS, Á. T. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 34, p. 15–25, 2021.
- BOGAS, A. C.; FERREIRA, A. J.; ARAÚJO, W. L., ASTOLFI-FILHO, S.; KITAJIMA, E. W.; LACAVA, P. T.; AZEVEDO, J. L. Endophytic bacterial diversity in the phyllosphere of Amazon *Paullinia cupana* associated with asymptomatic and symptomatic anthracnose. **Springer Plus**, v. 4, n. 258, 2015.
- BREMNER, J. M. Nitrogen-total, in: **Methods of Soil Analysis** Part 3—Chemical Methods. p. 1085–1121, 1996.
- BROWN, M. e. Seed and Root Bacterization. **Annual Review Of Phytopathology**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 181-197, set. 1974. Annual Reviews.
- CACCIARI, I.; LIPPI, D.; PIETROSANTI, T.; PIETROSANTI, W. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Arthrobacter*. **Plant and Soil**, v.115, p.151-153, 1989.
- CARMO, C. A. F. de S. do; ARAÚJO, W. S'Anna de; BERNARDI, A. C. de C.; SALDANHA, M. F. C. Métodos de análise de tecidos vegetais utilizados na Embrapa Solos. Embrapa, **Circular Técnica**, Rio de Janeiro, n. 6, 2000.
- CASSÁN, F. D.; SALAMONE, I. G. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Buenos Aires: Asociación Argentina de Microbiología, p. 61-86, 2008.
- CHABOT, R.; ANTOUN, H.; CESCAS, M. P.. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. **Plant And Soil**, [S.L.], v. 184, n. 2, p. 311-321, jun. 1996. Springer Science and Business Media LLC.
- CHAPIN III, F. S.; BLOOM, A.; FIELD, C.; WARING, R. Plant-Responses to Multiple Environmental-Factors. **Bioscience**, v. 37, n.1, p. 49-57, 1987 .
- CLARK, F. E.. Agar-Plate Method for Total Microbial Count. **Agronomy Monographs**, [S.L.], p. 1460-1466, 12 dez. 2016. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America.
- COELHO, A. M. Nutrição e Adubação do Milho. **EMBRAPA - Circular Técnica 78**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, MG, dez. 2006.
- COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E. de. Seja o doutor do seu milho: nutrição e adubação. 2 ed. aum. Informações Agronômicas, Piracicaba, n. 71, p. 1-9, set. 1995. Arquivo do Agrônomo, Piracicaba, n. 2, set.1995. Encarte. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. **Nutrição e Adubação do Milho**. Sete Lagoas – MG, 2006.
- COMPANT, S.; CAMBON, M. C.; VACHER, C.; MITTER, B.; SAMAD, A.; SESSITSCH, A. The plant endosphere world – bacterial life within plants. **Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 23, n. 4, p. 1812-1829, 4 out. 2020. Wiley.
- CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. A Cultura do Milho: análise dos custos de produção e da rentabilidade nos anos-safra 2007 a 2017. **Compêndio de Estudos CONAB, Brasília**. v. 14, p. 31. 2018.
- COSTA, R. R. G. F.; QUIRINO, G. da S. F.; NAVES, D. C. de F.; SANTOS, C. B.; ROCHA, A. F. de S.. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of

second-harvest maize1. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 304-311, set. 2015. FapUNIFESP (SciELO).

DAI, J. X.; LIU, X. M.; WANG, Y. J. Diversity of endophytic bacteria in *Caragana microphylla* grown in the desert grassland of the Ningxia Hui autonomous region of China. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, p. 2349–2358, 2014.

DANHORN, T.; FUQUA, C. Biofilm formation by plant-associated bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, p. 401–422, 2007.

DAVEY, M. E.; CAIAZZA, N. C.; O'TOOLE, G. A.. Rhamnolipid Surfactant Production Affects Biofilm Architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal Of Bacteriology**, [S.L.], v. 185, n. 3, p. 1027-1036, fev. 2003. American Society for Microbiology.

DEY, R.; PAL, K. K.; BHATT, D. M.; CHAUHAN, S. M. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. **Microbiological Research**, v. 159, n. 4, p. 371-394, 2004.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: Social and economic contributions. **Soil Biology & Biochemistry**, Rio de Janeiro, v. 29 n. 5, p. 771-774, 1997.

DOURADO NETO, D.; DARIO, G. J. A.; VIEIRA JR, P. A.; MANFRON, P. A.; MARTINS, T. N.; BONNECARRÉRE, R.A. G.; CRESPO, P. E. N. Aplicação e influência do fitorregulador no crescimento das plantas de milho. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2004.

DOWNIE, J. A.. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. **Fems Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 150-170, mar. 2010. Oxford University Press (OUP).

EMBRAPA - Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Sistema Brasileiro de Classificação de solos**, Centro Nacional de Pesquisa de Solos, Rio de Janeiro, ed. 5, p. 412, 2018.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil 2012 e 2013**, Londrina, v. 1, p. 262, 2011.

FALL, R.; KINSINGER, R. F.; WHEELER, K. A.. A Simple Method to Isolate Biofilm-forming *Bacillus subtilis* and Related Species from Plant Roots. **Systematic And Applied Microbiology**, [S.L.], v. 27, n. 3, p. 372-379, jan. 2004. Elsevier BV.

FANCELLI, A.L.; DOURADO NETO, D. Produção de milho, **Embrapa Gado de Leite**, 2 ed. Piracicaba, 2008.

FANCELLI A.L.; ALVES L.R.A.; ALMEIDA R.E.M. A cadeia produtiva do milho. **Revista Visão Agrícola**, v. 13, n. 176, 2015.

FARINA, R. **Diversidade de bactérias promotoras do crescimento vegetal associadas à cultura de canola (*Brassica napus* L.) cultivada no município de Vacaria, Rio Grande do Sul**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências. Porto Alegre. 2012

FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. da. Fósforo no Solo. In: **Fertilidade do Solo: o que é, relações com outras disciplinas e conceitos básicos**. Departamento de Solos e Adubos, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, SP. Ed. 2018.

FLEMMING, HC.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 623-633, 2 ago. 2010. Springer Science and Business Media LLC.

FRAVEL, D. R.. Commercialization and Implementation of Biocontrol. **Annual Review Of Phytopathology**, [S.L.], v. 43, n. 1, p. 337-359, 1 set. 2005. Annual Reviews.

FRAY, R. G.. Altering Plant-Microbe Interaction Through Artificially Manipulating Bacterial Quorum Sensing. **Annals Of Botany**, [S.L.], v. 89, n. 3, p. 245-253, 1 mar. 2002. Oxford University Press (OUP).

FUENTES-RAMÍREZ, L. E.; CABALLERO-MELLADO, J.; SEPULVEDA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Colonization of sugarcane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N-fertilization. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, p. 117–128, 1999.

GLICK, B. R.. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. **Canadian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 41, n. 2, p. 109-117, 1 fev. 1995. Canadian Science Publishing.

GLICK, B. R. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. **Scientifica**, p. 1–15, 2012.

GRAY, E.J.; SMITH, D.L.. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology And Biochemistry**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 395-412, mar. 2005. Elsevier BV.

HAAG, H. P.; SARRUGE, J. R.; OLIVEIRA, G. D. de; DECHEN, A. R.. Nutrição mineral do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.): i - deficiência dos macronutrientes - nota prévia. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, [S.L.], v. 32, p. 185-190, 1975. FapUNIFESP (SciELO).

HARTLOVA, A.; KROCOVA, Z.; CERVENY, L.; STULIK, J.. A proteomic view of the host-pathogen interaction: the host perspective. **Proteomics**, [S.L.], v. 11, n. 15, p. 3212-3220, 4 jul. 2011. Wiley.

HASHEM, A.; TABASSUM, B.; ABD-ALLAH, E. F. *Bacillus subtilis*: a plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, [S.L.], v. 26, n. 6, p. 1291-1297, set. 2019. Elsevier BV.

HU, L.; ROBERT, C. A. M; CADOT, S.; YE, M.; LI, B.; MANZO, D.; CHERVET, N.; STEINGER, T.; VAN DER HEIJDEN, M. G. A.; SCHLAEPPI, K.; ERB, M. Root exudate metabolites drive plant-soil feedbacks on growth and defense by shaping the rhizosphere microbiota. **Nature Communications**, v. 9, n. 2739, 2018.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J. C.; CAMPO, R. J.; GRAHAM, P. H.. The Importance of Nitrogen Fixation to Soybean Cropping in South America. **Nitrogen Fixation In Agriculture, Forestry, Ecology, And The Environment**, [S.L.], p. 25-42, 2005. Springer-Verlag

JORQUERA, M.; MARTÍNEZ, O.; MARUYAMA, F.; MARSCHNER, P.; MORA, M. de La L. Current and Future Biotechnological Applications of Bacterial Phytases and Phytase-Producing Bacteria. **Microbes And Environments**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 182-191, 2008. Japanese Society of Microbial Ecology.

- JERS, C.; KOBIR, A.; SONDERGAARD, E. O.; JENSEN, P. R.; MIJAKOVIC, I. *Bacillus subtilis* two-component system sensory Kinase DegS is regulated by serine phosphorylation in its input domain. **PLoS One**, v. 6, n. 2, 2011.
- KLINE, K. L.; OLADOSU, G. A.; WOLFE, A. K.; PERLACK, R. D.; DALE, V. H.; McMAHON, M. **Biofuel feedstock assessment for selected countries**. Tennessee: Oak Ridge National Laboratory (ORNL), Feb. 2008
- KLOEPPER, J. W.. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Plant Growth Under Gnotobiotic Conditions. **Phytopathology**, [S.L.], v. 71, n. 6, p. 642, 1981. Scientific Societies.
- KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M.. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. **Trends In Biotechnology**, [S.L.], v. 7, n. 2, p. 39-44, fev. 1989. Elsevier BV.
- KNIEF, C.; DELMOTTE, N.; CHAFFRON, S.; STARK, M.; INNEREBNER, G.; WASSMANN, R.; VON MERING, C.; A VORHOLT, J.. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. **The Isme Journal**, [S.L.], v. 6, n. 7, p. 1378-1390, 22 dez. 2011. Springer Science and Business Media LLC.
- KOHLER, J.; HERNÁNDEZ, J. A.; CARAVACA, F.; ROLDÁN, A.. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. **Functional Plant Biology**, [S.L.], v. 35, n. 2, p. 141, 2008. CSIRO Publishing.
- KUMAR, S.; EGAN, B. M.; KOCSISOVA, Z.; SCHNEIDER, D. L.; MURPHY, J. T.; DIWAN, A.; KORNFELD, K.. Lifespan Extension in *C. elegans* Caused by Bacterial Colonization of the Intestine and Subsequent Activation of an Innate Immune Response. **Developmental Cell**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 100-117, abr. 2019. Elsevier BV.
- LAZZARETTI, E.; MELO, I. S. de. Influência de *Bacillus subtilis* na promoção de crescimento de plantas e nodulação de raízes de feijoeiro. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 28**, Embrapa. Jaguariúna, 2005.
- LEWANDROWSKI, J.; ROSENFELD, J.; PAPE, D.; HENDRICKSON, T.; JAGLO, K.; MOFFROID, K. The greenhouse gas benefits of corn ethanol – assessing recent evidence. **Biofuels**, v. 11, n. 3, p. 361-375, 2019.
- LI, D.; ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. **Plant and Soil**, v. 108, p. 211-219, 1988.
- LIU, Y.; FENG, H.; CHEN, L.; ZHANG, H.; DONG, X.; XIONG, Q.; ZHANG, R. Root-Secreted spermine binds to *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 histidine kinase KinD and modulates biofilm formation. **International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions**, APS Publications, v. 33, n.3, p. 423-432, 2020.
- LOBO, L. L. B.; DOS SANTOS, R. M.; RIGOBELLO, E. C. Promotion of maize growth using endophytic bacteria under greenhouse and field conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 12, p. 2067-2074, 2019.
- LOPES, M. M., et al. *Altura de plantas de milho em diferentes métodos de inoculação de sementes com Azospirillum brasilense*. XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 31., 2016. Bento Gonçalves. **Anais...** Bento Gonçalves: ABMS, p. 41-46, 2016.
- MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, p. 251, 1980.

- MALINOWSKI, D. P.; BELESKY, D. P.. Adaptations of Endophyte-Infected Cool-Season Grasses to Environmental Stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. **Crop Science**, [S.L.], v. 40, n. 4, p. 923-940, jul. 2000. Wiley.
- MARKS, B. B.; MEGÍAS, M.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M.. Biotechnological potential of rhizobial metabolites to enhance the performance of *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense* inoculants with soybean and maize. **Amb Express**, [S.L.], v. 3, n. 1, p. 1-10, 17 abr. 2013. Springer Science and Business Media LLC.
- MARTÍNEZ-GIL, M.; YOUSEF-CORONADO, F.; ESPINOSA-URGEL, M. LapF, the second largest *Pseudomonas putida* protein, contributes to plant root colonization and determines biofilm architecture. **Molecular microbiology**, v. 77, n. 3, p. 549-561, 2010.
- MASCARENHAS, H. A. A.; TANAKA, R. T.; WUTKE, E. B.; KIKUTI, H. Nitrogênio: a soja aduba a lavoura da cana. **O Agrônomo**. Campinas, v. 1, n. 57, 2005.
- MEENA, K. K.; SORTY, A. M.; BITLA, U. M.; CHOUDHARY, K.; GUPTA, P.; PAREEK, A.; DHANANJAYA, P. S.; PRABHA, R.; SAHU, P. K.; GUPTA, V. K.; SINGH, H. B.; KRISHANANI, K. K.; MINHAS, P. S. Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 172, 2017.
- MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L.; RAAIJMAKERS, Jos M.. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 73, n. 22, p. 7259-7267, 15 nov. 2007. American Society for Microbiology.
- MILANI, R., SANTOS, R. M., BENTES, L. L., KANDASAMY, S., LAZAROVITS, G., RIGOBELLO, E. C. *Bacillus subtilis* isolates with different abilities to promote plant growth in maize, cotton and soybean crops isolation and characterization of bacterial strains. **Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences Paper**, v.21, p.827-836, 2019.
- MOREIRA, F.M.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora UFLA, LAVRAS, v. 2, ed. 2, p. 729, 2006
- MULVANEY, R. L. Nitrogen—inorganic forms, in: **Methods of Soil Analysis** Part 3 Chemical Methods. p. 1123–1184, 1996.
- NOVAIS, R.F.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F. **Ensaio em ambiente controlado**. In: OLIVEIRA, A.J.; GARRIDO, W.E.; ARAÚJO, J.D. & LOURENÇO, S., eds. Métodos de pesquisa em fertilidade do solo. Brasília, Embrapa-SEA, p.189-254, 1991.
- PATTEN, C. L.; GLICK, B. R.. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. **Applied And Environmental Microbiology**, [S.L.], v. 68, n. 8, p. 3795-3801, ago. 2002. American Society for Microbiology.
- POWAR, V. K.; JAGANNATHAN, V. Purification and properties of phytate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 151, p. 1102-1108, 1982.
- RAIJ B.V., CANTARELLA H. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo, **Boletim Técnico 100**. Campinas, p. 56–59, 1997.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, [S.L.], v. 17, n. 4-5, p. 319-339, out. 1999. Elsevier BV.

- ROTHFUSS, F.; BENDER, M.; CONRAD, R. Survival and Activity of Bacteria in a Deep, Aged Lake Sediment (Lake Constance). **Microbial Ecology**, v. 33, n. 1, p. 69–77, 1 jan. 1997.
- RUDRAPPA, T.; CZYMMEK, K. J.; PARÉ, P. W.; BAIS, H. P.. Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria . **Plant Physiology**, [S.L.], v. 148, n. 3, p. 1547-1556, 26 set. 2008. Oxford University Press (OUP).
- RUPPEL, S.; HECHT-BUCHHOOLZ, C.; REMUS, R.; ORTMANN, U.; SCHMELZER, R. Settlement of the diazotrophic, phytoeffctive bacterial strain *Pantoea agglomerans* on and within winter wheat: an investigation using ELISA and transmission electron microscopy. **Plant and Soil**, v. 145, p. 261-273, 1992.
- SANGOI, L.; SILVA, L. M. M. da; MOTA, M. R.; PANISON, F.; SCHMITT, A.; SOUZA, N. M, de; GIORDANI, W.; SCHENATTO, D. E.. Desempenho agrônômico do milho em razão do tratamento de sementes *Comazospirillum* sp. e da aplicação de doses de nitrogênio mineral. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, [S.L.], v. 39, n. 4, p. 1141-1150, ago. 2015. FapUNIFESP (SciELO).
- SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. del C.; GLICK, B. R.. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 183, p. 92-99, fev. 2016. Elsevier BV.
- SCHORTEMEYER, M.; HARTWIG, U. A.; HENDREY, G. R.; SADOWSKY, M. J. Microbial community changes in the rhizospheres of white clover and perennial ryegrass exposed to free air carbon dioxide enrichment (face). **Soil Biology and Biochemistry**, v.28, p.1717-1724, 1996.
- SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Atividade de microrganismos solubilizadores de fosfatos na presença de nitrogênio, ferro, cálcio e potássio. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p. 1495-1508, dec. 2001.
- SHAHID, I.; HAN, J.; HARDIE, D.; BAIG, D. N.; MALIK, K. A.; BORCHERS, C. H.; MEHNAZ, S.. Profiling of antimicrobial metabolites of plant growth promoting *Pseudomonas* spp. isolated from different plant hosts. **3 Biotech**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 1-14, 11 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC.
- STAM, H.; STOUTHAMER, A. H.; VERSEVELD, H. W. van. Hydrogen metabolism and energy costs of nitrogen fixation. Federation of European Microbiological Societies. Microbiology Reviews, Elsevier, n. 46, p. 73-92, 1987.
- STEINBERG, D.; GOCKEL, J.; WAGNER, N.; OSTMANN, K. **B. subtilis manual**. International Genetically Engineered Machine Foundation, 2016.
- STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, v. 175, n. 2, p. 257-263, 1995.
- TAULÉ, C.; VAZ-JAURI, P.; BATTISTONI, F.. Insights into the early stages of plant–endophytic bacteria interaction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 1, p. 1-9, 2021.
- TEJO, D. P.; FERNANDES, C. H. dos S.; BURATTO, J. S. Soja: Fenologia, Morfologia e Fatores que interferem na produtividade. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia de XIX da FAEF – Faculdade de Ensino Superior e Formação Integral**. v.35, n.1. Junho, 2019.
- TÖR, M.; MANTELL, S. H.; AINSWORTH, C. Endophytic bacteria expression β -glucuronidase cause false positives in transformation of *Dioscorea* species. **Plant Cell Reports**, v. 11, p. 452-456, 1992.

- TURNBULL, P. C. B. *Bacillus*. **In:** Barron's Medical Microbiology (Baron, S. *et al.*, eds.) (4th ed.). University of Texas Medical Branch, 1996.
- TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P.. The plant microbiome. **Genome Biology**, [S.L.], v. 14, n. 6, p. 1-10, jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC.
- TURNER, J.T.; BACKMAN, P.A. Factors relating to peanut yield increases after seed treatment with *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, Saint Paul, v.75, p.347-352, 1991.
- NOVACANA. Etanol de milho pode conquistar 20% do mercado até 2030, aposta Unem. Revista NovaCana, 6 de julho de 2021. Disponível em: <https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/etanol-de-milho-pode-conquistar-20-do-mercado-ate-2030-aposta-unem-060721>, consultado em 04 de setembro de 2021.
- URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F. de; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M. e; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S. de; ALVES, B. J. R.. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant And Soil**, [S.L.], v. 356, n. 1-2, p. 5-21, 22 out. 2011. Springer Science and Business Media LLC.
- VASSEUR-CORONADO, M.; DUBOULOIS, H. D.; PERTOT, I.; PUOPOLO, G.. Selection of plant growth promoting rhizobacteria sharing suitable features to be commercially developed as biostimulant products. **Microbiological Research**, [S.L.], v. 245, p. 126672, abr. 2021. Elsevier BV.
- VENDAN, R. T.; YU, Y. J.; LEE, S. H.; RHEE, Y. H. Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. **The Journal of Microbiology**, v. 48, p. 559–565, 2010.
- VINCENT, A. G.; TURNER, B. L.; TANNER, E. V. J. Soil organic phosphorus dynamics following perturbation of litter cycling in a tropical moist forest. **European Journal of Soil Science**, v. 61, p. 48-57, 2010.
- WALITANG, D. I., KIM, C. G.; KIM, K.; KANG, Y., KIM, Y. K.; SA, T. The influence of host genotype and salt stress on the seed endophytic community of salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 51, 2018.
- WELLBURN A. R.. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal Plant Physiology**. 144: 307–313, 1994.
- WEMHEUER, F.; KRETZSCHMAR, D.; PFEIFFER, B.; WEMHEUER, B. Impact of grassland management regimes on bacterial endophyte diversity differs with grass species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, n. 4, 2016.
- YOUSEIF, S. H. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria and their effects on the growth of maize plants under greenhouse conditions. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 63, n. 1, p. 25-35, 2018
- ZANCOPÉ, G. J.; J. NASSER, M; MORAES, M. V. P. **O Brasil que deu certo: A saga da soja brasileira**. Triade. Curitiba, BR. 2005.
- ZHANG, N.; YANG, D.; WANG, D.; MIAO, Y.; SHAO, J.; ZHOU, X.; XU, Z., LI, Q.; FENG, H.; LI, S.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates. **BMC Genomics**, v. 16 n.685, 2015.