

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da população de duas espécies
diazotróficas associativas em tecidos de
braquiária e milho utilizando PCR quantitativa**

Isis Capella Soares

2019



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE
JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E
BIOTECNOLOGIA APLICADA**

**AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE DUAS ESPÉCIES
DIAZOTRÓFICAS ASSOCIATIVAS EM TECIDOS DE
BRAQUIÁRIA E MILHO UTILIZANDO PCR
QUANTITATIVA**

ISIS CAPELLA SOARES

Sob a Orientação do Doutor

Jean Luiz Simões de Araújo

e Co-orientação do Doutor

Rafael Sanches Pacheco

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fissanidade e Biotecnologia Aplicada, Área de Concentração em Biotecnologia Aplicada

Seropédica, RJ
Dezembro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S676a Soares, Isis Capella, 02/03/1992-
Avaliação da população de duas espécies diazotróficas associativas em tecidos de braquiária e milho utilizando PCR quantitativa / Isis Capella Soares. - Rio de Janeiro, 2019.
85 f.: il.

Orientador: Jean Luiz Simões de Araújo.
Coorientador: Rafael Sanches Pacheco.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, 2019.

1. Azospirillum brasilense. 2. Herbaspirillum seropedicae. 3. PCR em tempo real. 4. primers estirpe específicos. I. de Araújo, Jean Luiz Simões, 1969-, orient. II. Pacheco, Rafael Sanches, 1981-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada. IV. Título.

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001 “This Study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Finance Code 001”

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOSSANIDADE E BIOTECNOLOGIA
APLICADA**

ISIS CAPELLA SOARES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada, área de Concentração em Biotecnologia Aplicada.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/12/2019

Rafael Sanches Pacheco. Dr. UFRRJ
(Co-orientador)

Luc Felicianus Marie Rouws. Dr. UFRJ

Marcia Soares Vidal. Dr^a. UFRJ

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar esse trabalho a todos os estudantes ingressantes das universidades públicas desse país. Parabenizo-os por essa conquista e desejo-lhes boa sorte nessa jornada que se inicia. Permito-me dar o conselho de que valorizem essa oportunidade conquistada. Desfrutem do que a universidade pública pode oferecer de melhor e que futuramente contribuirá para sua formação profissional e pessoal. Considerem-se parte de suas instituições de ensino e as cuidem com apreço. Acima de tudo nunca se esqueçam de que a universidade pública de qualidade é um direito de todos e que a educação pública é a base para o desenvolvimento de um país. Com carinho e esperança dedico o presente trabalho realizado e que o mesmo possa inspirar futuros jovens cientistas.

AGRADECIMENTOS

Faço um agradecimento especial às mulheres da minha família, que desde as minhas queridas avós Helena e Senhorinha, batalham com força e determinação pelos seus ideais e sonhos.

Agradeço aos meus pais Leila e Bira, por incentivarem a busca por conhecimento, como forma de construção pessoal, e pelo apoio e carinho. Aos meus irmãos, Gabriel e Maian, agradeço a nossa parceria e desejo que cuidemos uns dos outros sempre. Subo mais um degrau da minha jornada com muita gratidão a todos.

Ao meu namorado Juan, retribuo todo o companheirismo com muito amor e gratidão. Que as nossas caminhadas continuem a se encontrar e possamos seguir de mãos dadas por novos horizontes.

Dedico meu carinho as irmãs que a vida me proporcionou, Rapha, Isabela, Patrícia, Ayla, Nathalia e Andressa. Permaneceremos sempre juntas diante de qualquer distância temporal ou física.

Um obrigada carregado de medalhas para o time de meninas incríveis que partilham em quadra a mesma paixão pelo basquete. O encerramento dessa etapa é mais um troféu nosso levantado.

Agradeço meu orientador Jean Luiz Simões de Araújo pela oportunidade de desenvolver meu projeto de mestrado e orientação.

Ao meu co-orientador Rafael Sanches Pacheco, gratidão pelo suporte em todos os momentos e principalmente pela parceria.

Um enorme agradecimento a todos integrantes do Laboratório Genética e Bioquímica (LGB). Aos pesquisadores Márcia Soares Vidal e José Ivo Baldani, pelo auxílio e por tornarem possível esse projeto. Aos alunos de graduação e pós-graduação, pelas descontraídas horas de almoço e companheirismo, principalmente aos pós-graduandos Cleudson G. Nascimento e Daniella Villarinho pela ajuda e atenção dedicada.

Agradeço a Embrapa Agrobiologia pela estrutura e apoio financeiro disponibilizados para realização do trabalho. A todos os funcionários da instituição, em especial para as analistas comandantes do LGB; Carol Nachi e Paty Gitahy e o queridíssimo Seu Claudinho, obrigada por todo o suporte e carinho.

Agradeço à UFRRJ, ao curso de pós-graduação PPGFBA e seus professores e à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado para a realização do meu projeto e estudos.

BIOGRAFIA

Isis Capella Soares, filha de Leila Maria Correa Capella e Ubirajara Sotelino Soares, nasceu em 2 de março de 1992 na cidade do Rio de Janeiro, RJ. Em 2006, cursou o ensino médio no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFRJ) no Rio de Janeiro, RJ. Gradou-se em Agronomia pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no ano de 2017. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica no Laboratório de Bacteriologia Veterinária (LabVet) da UFRRJ de março de 2014 a dezembro de 2016 sob orientação da Dr^a. Irene da Silva Coelho. Em 2017 ingressou no Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob orientação do Dr. Jean Luiz Simões de Araújo.

RESUMO

SOARES, Isis Capella. **Avaliação da população de duas espécies diazotróficas associativas em tecidos de braquiária e milho utilizando PCR quantitativa**. 2019. 85f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Bactérias diazotróficas dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, em associação com gramíneas como o milho e forrageiras do gênero *Brachiaria* podem promover efeitos benéficos às plantas, como a fixação biológica de nitrogênio (FBN). A técnica de PCR quantitativa (qPCR) é eficiente no monitoramento de populações de bactérias diazotróficas inoculadas, porém sua aplicabilidade em nível de estirpe necessita de maiores estudos. Este trabalho teve o objetivo de selecionar oligonucleotídeos (*primers*) para posterior quantificação da população de *A. brasilense* em tecidos de raiz e colmo de braquiária (*Brachiaria* spp.) e *H. seropedicae* em raiz de milho (*Zea mays*) por qPCR. Os *primers* desenhados foram avaliados quanto a sua especificidade em nível de estirpe e espécie, por meio de PCR convencional. Já a sensibilidade e eficiência dos *primers* foram determinadas por reações de qPCR. A quantificação por qPCR estirpe-específica de *A. brasilense* e *H. seropedicae* associadas a tecidos de braquiária e milho foi feita a partir de duas curvas-padrão diferentes. Os resultados obtidos por PCR quantitativa com os pares de *primer* selecionados foram comparados a contagem por microgota. A quantificação da estirpe *A. brasilense* Sp245 foi feita a partir do DNA extraído de tecidos de colmo e raiz de cultivares de braquiária inoculada e sem inoculação, crescidas em condições de campo. A população bacteriana das estirpes *A. brasilense* Sp245 e *H. Seropedicae* ZAE94 foi quantificada através do DNA genômico de raiz de milho inoculado com cada estirpe-alvo e plantas controle, sem inoculação, crescidas em condições de casa de vegetação com substrato estéril sob duas dosagens de N (3 e 0,3 mM). O par de *primer* Sp245p10, foi específico para a estirpe Sp245 e os pares de *primer* ZAEF1R1 e ZAEF2R2 foram específicos para a estirpe ZAE94. A quantificação, por qPCR, das estirpes Sp245 e ZAE94 apresentou resultados similares à contagem por microgota. Em relação ao experimento a campo com braquiária, o número de células bacterianas da estirpe Sp245 foi maior em plantas inoculadas das cultivares Basilik e Piatã. No experimento com milho em casa de vegetação, a dose de 3 mM de N favoreceu a população endógena de bactérias da estirpe Sp245 em plantas do tratamento controle, enquanto que a dose de N não interferiu na população das estirpes Sp245 e ZAE94 nas plantas inoculadas.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, *primers* estirpe-específicos, PCR em Tempo Real.

GENERAL ABSTRACT

SOARES, Isis Capella. **Population evaluation of two associated diazotrophic species in brachiaria and maize tissues using quantitative PCR.** 2019. 85f. Dissertation (Master Science in Plant Health and Applied Biotechnology). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Entomologia e Fitopatologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Diazotrophic bacteria, from *Azospirillum* and *Herbaspirillum* genus, in association with grasses, such as maize and brachiaria, can promote benefits for the plant, such as biological nitrogen fixation (BNF). Quantitative PCR technique (qPCR) is effective in monitoring the endophytic bacterial population, however its applicability at strain-specific level needs further study. This study aimed to select oligonucleotides (primers) for quantification of strains populations of *A. brasilense* in roots and stems of brachiaria (*Brachiaria* spp.) and *H. seropedicae* in root of maize (*Zea mays*) by strain-specific qPCR. The primers designed were evaluated by conventional PCR for specificity for strain and species. Primers sensitivity and efficiency were determined by qPCR reactions. The quantification by strain-specific qPCR of the *A. brasilense* and *H. seropedicae* associated with brachiaria and maize tissues were made by using two different standard curves. The results of quantitative PCR using the selected primers were compared to the microdrop count technique. The strain *A. brasilense* Sp245 was quantified from DNA extracted from stems and root tissues of inoculated and non-inoculated brachiaria cultivars grown under field conditions. The bacterial population of the *A. brasilense* Sp245 and *H. seropedicae* ZAE94 strains was quantified by maize root genomic DNA from inoculated and non-inoculated plants. Maize plants were grown under greenhouse conditions with sterile substrate and different N doses (3 and 0.3 mM). The primer Sp245p10 was specific for Sp245 strain, and the primers ZAEF1R1 and ZAEF2R2 were specific for the ZAE94 strain. Quantifications by qPCR of Sp245 and ZAE94 strains presented similar results to micro drop count. In the field-grow brachiaria experiment, the number of Sp245 strain cells was higher in inoculated plants from Basilik and Piatã cultivars. In the greenhouse experiment, the N dose with 3 mM favored the endogenous population of Sp245 bacteria in non-inoculated maize plants, while the N dose did not affect the Sp245 and ZAE94 population in inoculated plants.

Key words: *Azospirillum brasilense*, *Herbaspirillum seropedicae*, strain-specific primer, Real Time PCR.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estirpes de <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> utilizadas no presente trabalho.	13
Tabela 2: Espécies de bactérias diazotróficas utilizadas para avaliar a especificidade dos <i>primers</i> desenhados.	18
Tabela 3: Espécies e estirpes não-alvo de bactérias diazotróficas utilizadas para avaliar a especificidade dos <i>primers</i> desenhados para <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ZAE94.	19
Tabela 4: Tamanho do genoma das estirpes-alvo dos <i>primers</i> desenhados.	20
Tabela 5: Pares de <i>primer</i> para estirpes de <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ZAE94 selecionados pelos testes de especificidade em nível de estirpe.	23
Tabela 6: Resultados dos testes de especificidade dos <i>primers</i> desenhados para as estirpes de <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	32
Tabela 7: Número de cópias do fragmento de DNA-alvo, detectados através de qPCR com os respectivos pares de <i>primer</i> selecionados.	35
Tabela 8: Eficiência de amplificação dos pares de <i>primer</i> para uso na qPCR.	37
Tabela 9: Eficiência de amplificação do par de <i>primer</i> Sp245p10 utilizando as curvas-padrão de colmo e raiz de braquiária com diluições seriadas da estirpe-alvo Sp245 de <i>A. brasilense</i>	40
Tabela 10: Eficiência de amplificação dos pares de <i>primer</i> Sp245p10, ZAECont2223F1R1 e ZAECont2223F2R2, utilizando as curvas padrão de raiz de milho com diluições seriadas da estirpes alvo correspondentes.	41

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação dos quadrantes na região chamada retículo de Neubauer..... 14
- Figura 2:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA da bactéria-alvo (2 ng μL^{-1}), utilizando os pares de *primer* Ab-V5p1 (A), Ab-V5Cont7209 (B) e Ab-V5Cont7203 (C), testados contra DNAs bacterianos de estirpes não-alvo de *A. brasilense*..... 24
- Figura 3:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR da amostra de DNA da estirpe FP2 (2 ng μL^{-1}), utilizando os pares de *primer* FP2Cont9982 (A) e FP2Cont11061 (B), testados contra DNAs bacterianos de estirpes não-alvo de *A. brasilense*..... 25
- Figura 4:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR da amostra de DNA da estirpe FP2 (2 ng μL^{-1}), utilizando os pares de *primer* FP2p1 (A) e FP2p1.1 (B), testados contra DNAs bacterianos de estirpes não-alvo de *A. brasilense*..... 25
- Figura 5:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA da estirpe Sp245 (2 ng μL^{-1}), utilizando os pares de *primer* Sp245p10 (A) e Sp245Plasm1 (B), testado contra DNAs bacterianos de estirpes não-alvo de *A. brasilense*..... 26
- Figura 6:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA da estirpe Sp245 (2 ng μL^{-1}), utilizando os pares de *primer* Sp245p5 (A) e Sp245p9 (B), testado contra DNAs bacterianos de estirpes não-alvo de *A. brasilense*..... 26
- Figura 7:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA da estirpe ZAE94 (2 ng μL^{-1}), utilizando o par de *primer* ZAECont2219, testado contra DNAs bacterianos de outras estirpes de *A. brasilense*..... 27
- Figura 8:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR da amostra de DNA da estirpe ZAE94 (2 ng μL^{-1}) utilizando os pares de *primer* específicos ZAECont2223F1R1 (A) e ZAECont2223F1R1 (B), testado contra DNAs bacterianos de outras estirpes de *H. Seropedicae*..... 28
- Figura 9:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de *A. brasilense* e de estirpes de outras espécies de bactéria (2 ng μL^{-1}), utilizando o par de *primer* Ab-V5p1..... 28
- Figura 10:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de *A. brasilense* e de estirpes de outras espécies de bactéria (2 ng μL^{-1}), utilizando o par de *primer* FP2Cont11061..... 29
- Figura 11:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de *A. brasilense* e de estirpes de outras espécies de bactéria (2 ng μL^{-1}), utilizando o par de *primer* FP2Cont9982..... 29
- Figura 12:** Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de *A. brasilense* e de estirpes de outras espécies de bactéria (2 ng μL^{-1}), utilizando o par de *primer* Sp245p10..... 30

Figura 13: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de <i>A. brasilense</i> e de estirpes de outras espécies de bactéria (2 ng μL^{-1}), utilizando o par de <i>primer</i> Sp245Plasm1.	30
Figura 14: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de <i>H. seropedicae</i> e de outras espécies (2 ng μL^{-1}), utilizando os pares de <i>primer</i> específicos ZAECont2223F1R1 (A) e ZAECont2223F1R1 (B).	32
Figura 15: Gel de agarose (2% p/v) com o produto da qPCR para a curva com diluições em série do DNA genômico da estirpe-alvo do par de <i>primer</i> Sp245p10. Concentração final de cada amostra variando de 10 a 0,0001 ng $15 \mu\text{L}^{-1}$	35
Figura 16: Gel de agarose (2% p/v) com o produto da qPCR para a curva com diluições em série do DNA genômico da estirpe-alvo dos pares de <i>primer</i> ZAEF1R1 (A) e ZAEF2R2 (B). Concentração final de cada amostra variando de 10 a 0,0001 ng $15 \mu\text{L}^{-1}$	36
Figura 17: Curvas padrão dos pares de <i>primer</i> Sp245p10 (A), ZAEF1R1 (B) e ZAEF2R2 (C).	37
Figura 18: Curvas de Melting dos pares de <i>primer</i> Sp245p10 (A), ZAEF1R1 (B) e ZAEF2R2 (C).	39
Figura 19: Curvas padrão do DNA extraído dos tecidos de colmo (A) e raiz (B) com diluições seriadas de <i>A. brasilense</i> estirpe Sp245 para o par de <i>primer</i> Sp245p10.	40
Figura 20: Curvas padrão de tecidos de raiz de milho com diluições seriadas das estirpes Sp245 para o par de <i>primer</i> Sp245p10 (A) e ZAE94, para os pares de <i>primer</i> ZAECont2223F1R1 (B) e ZAECont2223F2R2 (C).	41
Figura 21: Comparação da quantificação da estirpe Sp245 de <i>A. brasilense</i> pelas técnicas de contagem por microgota ou por qPCR utilizando o par de <i>primer</i> Sp245p10 estirpe-específico.	43
Figura 22: Comparação da quantificação da estirpe ZAE94 de <i>H. seropedicae</i> pelas técnicas de contagem por microgota ou por qPCR utilizando os pares de <i>primer</i> ZAEF1R1 (ZAECont2223F1R1) e ZAEF2R2 (ZAECont2223F2R2) estirpe-específicos.	43
Figura 23: Quantificação da bactéria <i>A. brasilense</i> por qPCR em tecido do colmo de plantas de braquiária inoculadas com a estirpe Sp245 e de plantas controle (sem inoculação), crescidas em condições de campo. Foi utilizado o par de <i>primer</i> Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido.	44
Figura 24: Quantificação da bactéria <i>A. brasilense</i> por qPCR em tecido do colmo de cultivares de braquiária inoculadas com a estirpe Sp245 ou sem inoculação (tratamento controle), crescidas em condições de campo. Foi utilizado o par de <i>primer</i> Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido.	45
Figura 25: Quantificação da bactéria <i>A. brasilense</i> por qPCR em tecido da raiz de plantas de braquiária inoculadas com a estirpe Sp245 e de plantas controle (sem inoculação), crescidas em condições de campo. Foi utilizado o par de <i>primer</i> Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido.	46
Figura 26: Quantificação da bactéria <i>A. brasilense</i> por qPCR em tecido do raiz de cultivares de braquiária inoculadas com a estirpe Sp245 ou sem inoculação	

(tratamento controle), crescidas em condições de campo. Foi utilizado o par de *primer* Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. 47

Figura 27: Quantificação da bactéria *A. brasilense* por qPCR em tecidos do colmo e da raiz de plantas de braquiária inoculadas com a estirpe Sp245, crescidas em condições de campo. Foi utilizado o par de *primer* Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido..... 48

Figura 28: Quantificação da bactéria *A. brasilense* por qPCR em tecido da raiz de plantas de milho inoculadas com a estirpe Sp245 e de plantas controle (sem inoculação), crescidas em condições de casa de vegetação com substrato estéril com duas dosagens de N (3,0 e 0,3 mM). Foi utilizado o par de *primer* Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. 49

Figura 29: Quantificação da bactéria *H. seropedicae* por qPCR em tecido da raiz de plantas de milho inoculadas com a estirpe ZAE94 e de plantas controle (sem inoculação), crescidas em condições de casa de vegetação com substrato estéril com duas dosagens de N (3,0 e 0,3 mM). Foi utilizado o par de *primer* ZAECont2223F1R1, específico para a estirpe ZAE94. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. 50

Figura 30: Quantificação da bactéria *H. seropedicae* por qPCR em tecido da raiz de plantas de milho inoculadas com a estirpe ZAE94 e de plantas controle (sem inoculação), crescidas em condições de casa de vegetação com substrato estéril com duas dosagens de N (3,0 e 0,3 mM). Foi utilizado o par de *primer* ZAECont2223F2R2, específico para a estirpe ZAE94. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. 51

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Panorama da produção de milho e braquiária no Brasil	3
2.1.1	A cultura do Milho (<i>Zea mays</i> L.)	4
2.1.2	A cultura da braquiária (<i>Brachiaria</i> spp.)	4
2.2	Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP)	5
2.2.1	Uso de bactérias dos gêneros <i>Azospirillum</i> e <i>Herbaspirillum</i> como promotoras de crescimento vegetal	7
2.2.2	Importância da fixação biológica de nitrogênio em gramíneas.....	9
2.3	Métodos de identificação de bactérias diazotróficas inoculadas em gramíneas... 10	
2.3.1	PCR quantitativa (qPCR) como método para identificar e quantificar bactérias endofíticas	10
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1	Experimento de campo com variedades de <i>Brachiaria</i> inoculadas com estirpes de <i>Azospirillum brasilense</i>	12
3.2	Experimento em casa de vegetação com plantas de milho inoculadas com <i>A. brasilense</i> Sp245 e <i>H. seropedicae</i> ZAE94 sob duas dosagens de N.....	12
3.3	Cultivo de bactérias para extração de DNA	12
3.3.1	Contagem em câmara de Neubauer das estirpes de <i>Azospirillum brasilense</i> 13	
3.3.2	Contagem de bactérias pelo método da microgota.....	14
3.4	Extração do DNA genômico de bactérias.....	15
3.4.1	Avaliação da quantidade e qualidade do DNA total extraído	15
3.4.2	PCR utilizando <i>primers</i> para o gene 16S rRNA.....	16
3.5	Extração de DNA genômico de tecidos vegetais de braquiária e milho	16
3.5.1	Avaliação da quantidade e qualidade do DNA total extraído de tecido vegetal	16
3.5.2	Avaliação qualidade do DNA extraído de tecido vegetal por PCR com <i>primers</i> do gene 16S rRNA	16
3.6	Extração de DNA de tecido vegetal com diluição seriada das estirpes alvo.....	16
3.7	Desenho dos <i>primers</i>	17
3.8	Avaliação estirpe-específica dos <i>primers</i> desenhados para as estirpes de <i>Azospirillum brasilense</i> por PCR convencional	17
3.9	Avaliação estirpe-específica dos <i>primers</i> desenhados para a estirpe <i>H. seropedicae</i> ZAE94 por PCR convencional.....	18
3.10	Avaliação da especificidade espécie-específico dos <i>primers</i> por PCR convencional.....	19
3.11	Testes por PCR em tempo real (qPCR) dos <i>primers</i> selecionados.....	19
3.12	Cálculo do número de cópias do fragmento de DNA-alvo	20
3.13	Avaliação da sensibilidade da qPCR com <i>primers</i> específicos.....	21
3.14	Eficiência de amplificação dos <i>primers</i> selecionados para qPCR.....	21
3.15	Avaliação da qualidade do DNA extraído de tecido vegetal com diluições em série das estirpes-alvo	21
3.16	Uso da PCR em Tempo Real (qPCR) para quantificação estirpe-específica de <i>A. brasilense</i> e <i>H. seropedicae</i> em tecidos vegetais de braquiária e milho	21

3.17	Determinação do número de células por grama de tecido vegetal	21
3.17.1	Curva padrão da mistura de tecido vegetal com diluições em série das estirpes-alvo.....	22
3.18	Análise Estatística.....	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1	Avaliação e seleção de <i>primers</i> específicos em nível de estirpe	23
4.1.1	Teste estirpe-específico dos <i>primers</i> desenhados para <i>Azospirillum brasilense</i>	24
4.1.2	Teste estirpe-específico dos <i>primers</i> desenhados para <i>H. seropedicae</i> ZAE94	27
4.2	Avaliação e seleção de <i>primers</i> específicos em nível de espécie	28
4.2.1	Teste espécie-específico dos <i>primers</i> desenhados para <i>Azospirillum brasilense</i>	28
4.2.2	Teste espécie-específico dos <i>primers</i> desenhados para <i>H. seropedicae</i> ZAE94	31
4.3	<i>Primers</i> selecionados para qPCR	34
4.3.1	Sensibilidade dos <i>primers</i> selecionados	34
4.3.2	Eficiência de amplificação e coeficiente de determinação	37
4.3.3	Curva de Melting	38
4.4	Curva padrão do DNA extraído de raiz e colmo de braquiária com diluições em série da estirpe-alvo <i>A. brasilense</i> Sp245 e as reações de qPCR	39
4.5	Curva padrão do DNA extraído de raiz de milho com diluições em série das estirpes-alvo <i>A. brasilense</i> Sp245 e <i>H. seropedicae</i> ZAE94 e as reações de qPCR ..	40
4.6	Comparação entre as técnicas de contagem por microgota em placa e PCR em Tempo Real da estirpe <i>A. brasilense</i> Sp245	42
4.7	Comparação entre as técnicas de contagem por microgota em placa e PCR em Tempo Real da estirpe <i>H. seropedicae</i>	43
4.8	Quantificação por qPCR da estirpe Sp245 de <i>A. brasilense</i> em tecido de colmo e raiz de braquiária	44
4.9	Quantificação por qPCR das estirpes Sp245 de <i>A. brasilense</i> e ZAE94 de <i>H. seropedicae</i> em raiz de milho	48
5	CONCLUSÕES	52
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	ANEXOS	67

ANEXOS

A. Meio DYGS	67
B. Meio NFbHP	67
C. Meio NFb.....	67
D. <i>Primers</i> desenhados para as estirpes bacterianas de <i>Azospirillum brasilense</i> e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> ZAE94 a serem quantificadas em tecidos de braquiária e milho por meio da técnica de qPCR.....	67
E. Condições ajustadas da reação de PCR convencional para os testes estirpe-específico dos <i>primers</i> desenhados para estirpes de <i>A. brasilense</i>	68
F. Condições ajustadas para a amplificação por qPCR utilizando os <i>primers</i> selecionados. Volume final da reação igual a 15 µL.....	69
G. Resultados médios da Contagem por microgota em placa das estirpes de <i>A. brasilense</i> e <i>H. seropedicae</i> selecionadas.	69

1 INTRODUÇÃO

A cadeia produtiva que engloba a agropecuária no Brasil representa 21,6% do PIB nacional, e entre suas atividades estão a produção de grãos e a pecuária (MAPA, 2019). O milho (*Zea mays* L.) se destaca por representar a terceira maior commodity agrícola brasileira sendo produzidos 91,6 milhões de toneladas de grãos, no último ano (FAOSTAT, 2018; MAPA, 2019). No entanto, a cultura tem alta demanda de adubação nitrogenada o que aumenta os custos de produção, sendo necessário o investimento em alternativas para reduzir estes custos e a dependência desses fertilizantes (DARTORA et al., 2016).

Com relação à atividade pecuária, as pastagens cultivadas são a principal forma de alimentação do gado e estima-se que 85% da área dessas pastagens estão plantadas com as quatro principais espécies de *Brachiaria*: *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. ruziziensis* e *B. humidicola* (BARCELLOS et al., 2000; JANK et al., 2014). Entretanto o plantio em solos com baixa fertilidade e o manejo inadequado do sistema de produção tem causado a degradação de grande parte dessas pastagens (VALENTIM; AMARAL; LANI, 2002). Portanto, é necessário o investimento em programas de melhoramento de pastagens para recuperação dessas áreas, de modo a manter os níveis de produtividade do setor pecuário com um manejo mais sustentável (FONTE et al., 2013).

O uso de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) no desenvolvimento de biofertilizantes tem se mostrado uma alternativa promissora, pois reduz os custos de produção e minimiza os impactos ambientais causados pelo uso de fertilizantes (TIMMUSK et al., 2017). Assim, vem crescendo o investimento em pesquisas voltadas para o desenvolvimento de novos inoculantes, capazes de proporcionar aumento de produtividade em pastagens (ANTUNES et al., 2019; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016; REIS JUNIOR et al., 2004) e em outras gramíneas de importância agrícola (HUNGRIA et al., 2010; ALVES et al., 2014; SCHULTZ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2018).

Entre as BPCP mais utilizadas encontram-se às pertencentes ao gênero *Azospirillum* e *Herbaspirillum* e o Brasil apresenta um longo histórico de pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de inoculantes envolvendo esses gêneros (BALDANI et al., 1986a; MAGALHAES et al., 1983; PEREIRA et al., 1988). A inoculação de milho com a estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* pode fornecer até 37% da demanda de nitrogênio (N) das plantas através da FBN e mostrou um aumento de 34% no rendimento da cultura (ALVES et al., 2014). Enquanto que a inoculação com *A. brasilense* elevou a produção de grãos em até 30% (HUNGRIA et al., 2010) e reduziu a dose de adubação mineral necessária a ser aplicada (OLIVEIRA et al., 2018).

As pesquisas com uso de BPCP em pastagens no Brasil vêm ganhando importância. Diversos resultados têm mostrado que a promoção de crescimento de plantas de *Brachiaria* spp. inoculada com *A. brasilense* foi equivalente a aplicação de uma dose de 40 kg de nitrogênio (N) ha⁻¹. (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016), sendo possível aumentar a produção de forragem em até 36%, com a inoculação (LEITE et al., 2019). No caso da inoculação do capim Marandu com *A. brasilense*, além de aumentar a produção de forragem, também ocorreu uma diminuição do efeito do déficit hídrico, tanto em condições de campo (LEITE et al., 2019), quanto em casa-de-vegetação (BULEGON et al., 2017).

Dessa forma, torna-se importante o desenvolvimento de métodos para monitoramento da infecção e colonização das bactérias inoculadas para aprimorar o desenvolvimento de novos inoculantes (HUNGRIA et al., 2010; MOREIRA et al., 2010). A técnica de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) tem sido bastante eficiente para esse monitoramento por apresentar alta especificidade, sensibilidade e rapidez permitindo o estudo da dinâmica populacional bacteriana quando inoculadas em culturas de importância econômica (COUILLEROT et al., 2010a; SØRENSEN et al., 2009). Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo estabelecer a metodologia de PCR em tempo real para quantificar as bactérias *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* em tecidos de braquiária e milho.

Este trabalho teve o objetivo de selecionar oligonucleotídeos (*primers*) para posterior quantificação da população de *A. brasilense* em tecidos de raiz e colmo de braquiária (*Brachiaria* spp.) e *H. seropedicae* em raiz de milho (*Zea mays*) por qPCR.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Panorama da produção de milho e braquiária no Brasil

A agropecuária no Brasil apresenta área produtiva de 244,5 milhões de hectares onde são desenvolvidas diversas atividades como a produção de grãos e a criação de gado. A produção de grãos é uma atividade de grande importância para a economia do país, ocupando uma área de 62,6 milhões de hectares, cuja safra de grãos de 2018/2019 foi de 243,1 milhões de toneladas (MAPA, 2019).

Entre as culturas responsáveis pela produção de grãos, destaca-se a cultura do milho, uma das mais importantes *commodities* agrícolas do país com uma área cultivada de 17 milhões de hectares (IBGE, 2019). O Centro-Sul do país é a região com maior produção, alcançando 205,8 milhões de toneladas na safra 2018/2019 em uma área plantada de 51,3 Mha (MAPA, 2019).

O milho é uma das principais culturas agrícolas do país, em que a realização de duas safras anuais é bem estabelecida. A primeira safra ocorre entre os meses de setembro a março e é associada ao período de chuva da região Centro-Sul. Já a segunda safra, chamada de “milho safrinha”, é estabelecida entre janeiro a março, e apresenta condições climáticas mais restritas para o desenvolvimento da cultura (CONAB, 2016).

Apesar de ser uma *commodity* agrícola representativa na produção de grãos do país, sua produtividade ainda está abaixo do potencial da espécie devido a diversos fatores como fertilidade do solo, disponibilidade de água, genótipos inadequados para a região, ocorrência de pragas e doenças (ANDREA et al., 2018; FANCELLI; DOURADO NETO, 2003). Com relação às práticas culturais, o manejo da fertilidade do solo é imprescindível para intensificação da produtividade (DOS SANTOS et al., 2014; LINS et al., 2017). Entre os macronutrientes essenciais para as plantas, o N é o elemento químico absorvido em maior quantidade pela cultura, já que a mesma apresenta alta capacidade de extração desse nutriente do solo (COELHO, 2007; GRANATO et al., 2014; LOURENTE et al., 2007; SANTOS et al., 2010). Entretanto, os fertilizantes nitrogenados são os insumos mais custosos à produção, tornando-se necessária sua aplicação de forma adequada, de modo a minimizar os gastos e os impactos ambientais (KAPPES et al., 2014).

A pecuária também é uma atividade de importância econômica para o Brasil, responsável por gerar um faturamento bruto de 186,3 bilhões de reais em 2018. O país utiliza 158,6 milhões de hectares de pastagens para a atividade pecuária (MAPA, 2019). A pastagem cultivada é a forma tradicional mais econômica de alimentação para a bovinocultura brasileira (JANK et al., 2014), e o país apresenta o maior rebanho bovino do mundo, estimado em 215 milhões de cabeças de gado, representando 17% da produção mundial (ABIEC, 2018; USDA, 2018). O Centro-Oeste é a região com a maior atividade pecuarista do país e possui 34% do total nacional de cabeças de gado (IBGE, 2017). A pecuária de corte se baseia no sistema de criação em pastagens, em que 87% dos animais abatidos são criados a pasto (ABIEC, 2018). Já a bovinocultura de leite, no mesmo ano, produziu 6,7 bilhões de litros de leite e também apresenta a maior parte da sua produção baseada em pastagens (IBGE, 2010; IBGE, 2019).

O Sistema produtivo convencional da pecuária brasileira é caracterizado por pastagens extensivas e apresenta baixa produtividade, devido à degradação dessas áreas e seu manejo inadequado, como a falta de reposição de nutrientes ao solo (CERRI, CARLOS CLEMENTE MOREIRA et al., 2015; DIAS FILHO, 2014). As pastagens cultivadas do Brasil são

compostas majoritariamente pelos gêneros *Brachiaria*, *Panicum* e *Pennisetum*, introduzidos no país a partir de 1970 (PEDREIRA; SILVA; ALONSO, 2015). Estima-se que 99 milhões de hectares de *Brachiaria* sp. foram semeados, como pastos melhorados no país, principalmente com as espécies *B. brizantha* cv. Marandu e *B. decumbens* cv. Basilisk (JANK et al., 2014; MAASS et al., 2015).

A produção do setor agropecuário do país é diversificada e torna-se um desafio manter os níveis de produtividade, através de um manejo sustentável, sem impactos negativos ao ambiente. O aumento da eficiência técnico-econômica do sistema produtivo passa a ser uma demanda para assegurar a competitividade e a lucratividade do empreendimento, através da implementação de alternativas de manejo do solo, de modo sustentável (FONTE et al., 2013; MARTHA JR et al., 2006)

2.1.1 A cultura do Milho (*Zea mays* L.)

O milho pertence à ordem Gramineae, família Gramineae, subfamília Panicoideae, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* (DOEBLEY, 2004). Todos os tipos de milho se incluem nessa espécie que é pertencente à tribo *Maydeae*, composta por sete gêneros, dos quais dois são nativos do hemisfério ocidental (*Zea* e *Tripsacum*) e cinco da Ásia (SCOTT; EMERY, 2016). Estima-se que seu centro de origem seja a América Central ou o México, e que esteja sendo cultivado e modificado há 8 ou 10 mil anos. Os processos de seleção natural e domesticação resultaram na produção de uma planta anual com altura de 1 a 4 m, ereta, robusta, e destinada a produção de grãos (BEDOYA et al., 2017).

Existem cinco classes de milho de acordo com as características dos grãos: dentado, calcário, pipoca, duro e doce. O milho comercial nacional é predominantemente do tipo duro, já em países de clima temperado destaca-se a comercialização do milho dentado (EMBRAPA, 2015; MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

O potencial genético máximo da espécie é atingido quando fatores climáticos como temperatura, precipitação pluviométrica e fotoperíodo alcançam níveis ótimos. Entretanto, a pesquisa tem desenvolvido genótipos variados adaptados a condições de cultivo, que diferem das condições ótimas da cultura e destinados a diferentes usos como alimento, forragem ou na indústria (JOHNSON, 1991). Após o levantamento da safra 2017/2018, realizado pela Embrapa Milho e Sorgo, foram relacionadas 298 cultivares, em que 195 eram transgênicas, representando 65% das cultivares de milho comercializadas (FILHO; BORGHI, 2018). O uso de sementes transgênicas torna-se crescente por proporcionar praticidade no manejo e menor custo de produção (FILHO; BORGHI, 2018), sendo as variedades Bt e RR os híbridos geneticamente modificados que apresentam os resultados mais expressivos de rendimento de grãos a campo (BRIDGES, 2001).

Devido à importância econômica da cultura, tem-se investido em alternativas para reduzir os custos de produção e dependência de fertilizantes nitrogenados. Após diversos estudos terem mostrado o aumento do acúmulo de massa seca e produção dos grãos em plantas inoculadas, o uso de bactérias fixadoras de nitrogênio tem-se apresentado como boa alternativa (DE ARAUJO et al., 2013; DOBBELAERE et al., 2002; DOS REIS et al., 2008; HUNGRIA et al., 2010; KUMAR; TRIVEDI; PANDEY, 2007). O uso de inoculantes para otimizar a aplicação de fertilizantes nitrogenados torna-se uma alternativa sustentável para a produção de cereais em regiões tropicais.

2.1.2 A cultura da braquiária (*Brachiaria* spp.)

O gênero *Brachiaria* primeiramente foi descrito por Trinius em 1834, como uma subdivisão de *Panicum* e depois elevado a gênero por Grisebach em 1853 (GONZÁLEZ;

MORTON, 2005). Este grupo pertence à tribo Paniceae, subfamília Panicoideae da família Poaceae e possui centro de origem na África oriental, para as principais espécies (BOGDAN, 1977; GONZÁLEZ; MORTON, 2005). O gênero é pantropical, distribuído em diferentes habitats, desde o semi-deserto ao pântano, apresentando maior ocorrência em vegetação de savana. O gênero *Brachiaria* apresenta cerca de 100 espécies, encontradas em regiões tropicais e subtropicais (BOGDAN, 1977).

As forrageiras pertencentes ao gênero são importantes para a produção da pecuária na América Latina (JANK et al., 2014). As espécies comerciais de *Brachiaria* sp. como *B. brizantha*, *B. decumbens*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis*, se destacam como as forrageiras de maior importância econômica nas Américas, pertencentes a esse gênero (JANK et al., 2014; VALLE; JANK; RESENDE, 2009). Estas foram introduzidas na América Latina tropical através do acesso ao banco de germoplasma natural, proveniente da África Oriental, ao longo da metade do século 20 (RENVOIZE; CLAYTON; KABUYE, 1996). As cultivares de *Brachiaria* sp. de maior importância têm sido desenvolvidas a partir da seleção direta de genótipos de ocorrência natural, coletados na África Oriental (JANK et al., 2014).

O impacto causado pela introdução dessas forrageiras foi maior no Brasil com relação aos demais países latino-americanos, uma vez que apresenta extensas áreas de pasto e demanda por alta qualidade, produtividade e forrageiras bem adaptadas para alimentação do gado (JANK et al., 2014), o que provocou uma revolução na atividade pecuária e na produtividade das pastagens (COSTA; OLIVEIRA; FAQUIN, 2006).

A utilização de espécies de *Brachiaria* sp. nas pastagens brasileiras ocorreu a partir de 1970, quando foram iniciados os plantios em larga escala com *Brachiaria decumbens* (PEDREIRA; SILVA; ALONSO, 2015; PIZARRO et al., 1996). Vastas áreas, principalmente no Cerrado, foram estabelecidas a partir de sementes de *Brachiaria decumbens*, importadas pelo governo brasileiro. O sucesso do uso dessa espécie foi devido a sua boa adaptação a solos ácidos e de baixa fertilidade e fácil propagação por sementes (PEDREIRA; SILVA; ALONSO, 2015). Posteriormente, na década de 80, uma cultivar de *B. brizantha* foi lançada pela EMBRAPA, nomeada comercialmente como Marandu (NUNES et al., 1984), que apresentava maior rendimento e resistência à cigarrinha-das-pastagens comparada a *B. decumbens*, tornando-se a forrageira mais plantada no país (KARIA; DUARTE; ARAÚJO, 2006).

Aproximadamente 70% das pastagens cultivadas no país encontram-se degradadas (DIAS FILHO, 2014) e, portanto, uma das preocupações do setor pecuário é intensificar os níveis de produtividade através de melhoramento de pastagens e manejo sustentável, reduzindo os impactos negativos ao ambiente e minimizando possíveis barreiras não tarifárias à produção pecuária do país (VILELA; MARTHA JÚNIOR; BARIONI, 2005). O uso de BPCP, capazes de solubilizar fosfato e fixar nitrogênio atmosférico, pode se apresentar como alternativa para redução dos custos de produção e dos impactos ambientais, com ganhos de produtividade (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016; TIMMUSK et al., 2017).

2.2 Bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP)

Bactérias promotoras de crescimento são microrganismos que proporcionam benefícios às plantas e podem colonizar a superfície de raízes ou o tecido interno dos vegetais (DAVISON, 1988; KLOPPER; LIFSHITZ; ZABLOTOVICZ, 1989). Essas associações benéficas possivelmente se iniciam com a atração das bactérias para a região do entorno das raízes (rizosfera), em que há maior disponibilidade de aminoácidos e açúcares, fornecidos pelas plantas (BALSANELLI et al., 2010; GRAY; SMITH, 2005; NUNES et al., 1984).

A maior ocorrência de interações benéficas entre microrganismos e plantas nessa região é devido ao processo de rizodeposição, que consiste na transferência total de carbono das raízes das plantas para o solo através de secreções (grandes moléculas como enzimas), exudados (pequenas moléculas), mucilagens e lisados de células mortas radiculares (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; OKON, 2009). Portanto, na rizosfera são ocasionadas mudanças no pH e gradientes redox do solo, que influenciam na definição da comunidade microbiana que se estabelece nessa porção de solo próximo às raízes (LAREEN; BURTON; SCHÄFER, 2016).

As BPCP possuem moléculas importantes para sua constituição celular, como lipopolissacarídeos (LPS e constituintes celulares) e flagelos (proteínas constituintes dos flagelos), que são reconhecidos pelas plantas como ativadores de metabolismo e contribuem para que a associação planta-microrganismo seja estabelecida (KASCHUK; ALBERTON; HUNGRIA, 2010).

Os benefícios proporcionados por esse tipo de interação para as plantas podem ser diretos ou indiretos. Os benefícios diretos incluem: aumento da biomassa radicular, através de modificações fisiológicas, moleculares e estruturais (GUERRERO-MOLINA et al., 2015), fixação biológica de N₂, solubilização de fosfatos (TIMMUSK et al., 2017), produção de fitohormônios (ácido indolacético, citocinina e giberilina) e sideróforos (AHEMAD; KIBRET, 2014; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; OKON, 2009; TIMMUSK et al., 2017). Enquanto os benefícios indiretos destacam-se a proteção contra patógenos, através da indução de sistema de resistência, competição e produção de antibióticos (FILIPPI et al., 2011; GUERRERO-MOLINA et al., 2015).

O potencial biotecnológico dessas bactérias tem intensificado os estudos da interação desse grupo com espécies vegetais de importância econômica para aumentar a produtividade das culturas e otimizar custos de produção, com a redução do uso de adubos nitrogenados e preservação do meio ambiente (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2016). Aguirre et al. (2018) mostraram que a inoculação de *Azospirillum brasilense* em pastos de capim Coastcross-1 aumentou a produção de forragem sem a aplicação de N, não sendo necessário realizar uma reinoculação. Lopes et al. (2018) também encontraram aumento da produção de biomassa em *B. brizantha* cv. Piatã, quando inoculada com *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia pyrrocinia* e co-inoculadas juntas, em relação às plantas controles sem fertilização e inoculação. Já Araujo et al. (2016) constataram aumento do acúmulo de N e K nos grãos de milho, pertencente ao tratamento inoculado com *A. brasilense* sem fertilização nitrogenada, comparado aos inoculados com *A. brasilense* e *H. seropedicae* e fertilizados com nitrogênio, corroborando Calvo et al. (2017), que também observaram aumento da concentração de N, P e K nos estágios de crescimento V6 e V7 de milho inoculado com um *mix* de quatro estirpes BPCP de *Bacillus* spp, comparado ao tratamento não-inoculado.

Com relação aos efeitos indiretos proporcionados pelas BPCP, Lopes et al. (2017) observaram aumento da tolerância à sombra da *B. brizantha*, quando co-inoculada com *Burkholderia pyrrocinia* e *Pseudomonas fluorescens*. Bulegon et al. (2017) mostraram aumento da tolerância à seca em *B. ruziziensis*, após a aplicação foliar do inóculo de *A. brasilense*, sob condições de déficit de água severo. Yasmin et al. (2017) também mostraram que houve maior adaptação às condições de estresse hídrico em milho inoculado com *Pseudomonas* sp. e *Bacillus pumilus*. Em relação à proteção contra patógenos, Weber et al. (2007) sugeriram o uso do gênero *Herbaspirillum* sp. como agente de biocontrole, uma vez que sua presença em plântulas de banana foi associada à redução da severidade da murcha, causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

O uso de bactérias diazotróficas para aumento da produção agrícola sob um manejo

mais sustentável ainda é pouco explorado em vista do seu potencial, necessitando maior entendimento sobre o funcionamento genético e fisiológico das bactérias diazotróficas e os processos relacionados com a interação planta-microrganismo (KASCHUK; HUNGRIA, 2017; KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004; MARKS et al., 2015). Nesse contexto, tornam-se importantes os estudos que buscam o entendimento da dinâmica ecológica dessas bactérias com as plantas e aplicação biotecnológica desse grupo bacteriano na área de promoção de crescimento (KUKLINSKY-SOBRAL et al., 2004).

2.2.1 Uso de bactérias dos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* como promotoras de crescimento vegetal

Dentre as bactérias diazotróficas mais estudadas destacam-se aquelas pertencentes aos gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* (ARAUJO et al., 2016; BRUSAMARELLO-SANTOS et al., 2017; MARTINS et al., 2017). As bactérias que compõem esses dois gêneros podem ser encontradas na superfície de raízes de diferentes plantas, incluindo gramíneas, denominadas de bactérias associativas rizosféricas. Este grupo de bactérias também pode colonizar tecidos internos vegetais sem causar danos às plantas, classificado como bactérias endofíticas (BALDANI; BALDANI, 2005). Entretanto a diferença entre a colonização endofítica e associativa em plantas nem sempre é bem definida, uma vez que bactérias associativas também podem ser encontradas dentro dos tecidos das plantas e no solo (BALDANI, J et al., 1997; ELMERICH, 2007).

A produção de inoculantes bacterianos para a agricultura tem um alto potencial econômico e estima-se que esse mercado aumentará para 1,66 bilhões, com uma média de crescimento anual de 13%, até 2022 (GLOBAL MARKET INSIGHTS, 2014). Os gêneros *Azospirillum* e *Herbaspirillum* apresentam grande potencial para serem usados como inoculante em culturas pertencentes ao grupo das gramíneas, tornando-se os gêneros mais estudados e aplicados no desenvolvimento de inoculantes (BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 2000; CASSÁN; OKON; CREUS, 2015; MONTEIRO et al., 2012; PEREG; DE-BASHAN; BASHAN, 2015). A seleção de estirpes de BPCP adaptadas a condições específicas de solo e planta é fundamental para o sucesso da produção de inoculantes em larga escala e conseqüentemente para o aumento da produtividade das culturas (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; MUSTAFA et al., 2019).

O gênero *Azospirillum*, pertencente à classe *Alphaproteobacteria*, é composto por bactérias endofíticas facultativas classificadas como gram-negativas, microaerofílicas, não-fermentativas e quimio-organotróficas (BALDANI, et al., 1997; MEHNAZ, 2015). Esse grupo tem apresentado capacidade de beneficiar o desenvolvimento de diferentes espécies de plantas (HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2011), incluindo cereais de importância econômica como o milho, sorgo, trigo e arroz (ANDRADE et al., 2019; HUNGRIA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2008). A inoculação de sementes de milho com *A. brasilense* elevou a eficiência no uso de N pelas plantas (ZEFFA et al., 2019), e aumentou o crescimento e a produtividade da cultura (OLIVEIRA et al., 2018).

Inoculantes com *Azospirillum* também têm sido aplicados em espécies leguminosas, associados ao inoculante rizobiano, visando aumento da nodulação e eficiência da FBN (HUNGRIA; MENDES; MERCANTE, 2013) e também em diversas espécies hortícolas (RUZZI; AROCA, 2015). No caso específico das pastagens, Oliveira et al. (2007) a partir de estudos com braquiária cv. Marandu inoculadas com estirpes de *A. brasilense*, mostraram maior produção de forragem no tratamento inoculado comparado à testemunha. Hungria et al. (2018) encontraram maior produção de biomassa das forrageiras *B. brizantha* e *B. ruziziensis* no tratamento com N fertilizante + inoculação com *A. brasilense* em comparação com o

controle somente adubado com N mineral, resultando em redução da quantidade do fertilizante aplicado na cultura. Mais recentemente Leite et al. (2019) também mostraram que a inoculação com *A. brasilense* permite uma redução de até 20% na adubação nitrogenada e incrementa a produção de forragem em até 36%. Isso corroborou com Sá et al. (2019) que observaram aumento da absorção de nutrientes e do acúmulo de biomassa de raiz e parte aérea.

Atualmente, já é possível encontrar no mercado, inoculantes formulados a partir de estirpes de *Azospirillum*; na Europa, utiliza-se a estirpe CRT1 (WALKER et al., 2012), na Argentina, a estirpe Az39 (OKON et al., 2015) e no Brasil, duas das principais estirpes utilizadas são Abv5 e Abv6, recomendadas para gramíneas em geral, além de espécies leguminosas (FUKAMI et al., 2016; HUNGRIA, 2011; HUNGRIA et al., 2010; HUNGRIA; NOGUEIRA; ARAUJO, 2015, 2016; MARKS et al., 2015). No entanto, outras estirpes de *A. brasilense* como a Sp245 também merecem destaque, dentre as mais usadas em inoculantes. A Sp245 foi isolada no Brasil em 1986 a partir de raízes de trigo (BALDANI et al., 1986b). A inoculação com Sp245 em trigo altera a morfologia da raiz, aumentando a produção de pêlos radiculares, devido à produção de AIA por essa estirpe (SPAEPEN et al., 2008). Além disso, a inoculação de trigo com *A. brasilense* Sp245 aumentou o peso seco da planta, percentagem de N na parte aérea e o rendimento de grãos em até 31% (BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 1987).

Outro importante grupo de bactérias endofíticas é o do gênero *Herbaspirillum*, classificadas como gram-negativas, pertencentes à classe beta de Proteobacteria (BALDANI et al., 1986a). Estas foram isoladas de diferentes ambientes, tanto aquáticos (DING; YOKOTA, 2004), quanto em associação com tecidos de plantas, na rizosfera e no solo (IM et al., 2004; JUNG et al., 2007). O gênero inclui a espécie *Herbaspirillum seropedicae*, descrita no Brasil por Baldani et al. (1986a), com diversas estirpes aplicadas em diferentes gramíneas de importância econômica como milho e arroz (ALVES et al., 2014; BALDANI; BALDANI; DÖBEREINER, 2000; MONTEIRO et al., 2008). A espécie *H. seropedicae* pode colonizar as regiões internas e externas do tecido vegetal de diversas gramíneas (OLIVARES et al., 1996). Essas bactérias, quando inoculadas, são capazes de promover o crescimento das plantas através de diferentes mecanismos, entre eles a produção de fitohormônios, indução de genes de tolerância a estresse e de defesa, produção de sideróforos, solubilização de fosfatos além de realizar a FBN (BALDANI et al., 1986a; BASTIÁN et al., 1998; MONTEIRO et al., 2012; RICHARDSON et al., 2009; ROSCONI et al., 2013; WAGH et al., 2014).

Resultados promissores vêm sendo obtidos a partir da inoculação do milho com a estirpe ZAE94 de *H. seropedicae*. Esta estirpe foi selecionada entre 21 linhagens de *Herbaspirillum* spp. como a que promoveu maior produção de biomassa vegetal em ensaios em casa de vegetação, e aumento na eficiência agrônômica de duas cultivares de milho em condições de campo (ALVES et al., 2014). Esses estudos mostram que ZAE94 contribuiu com 37% do N vegetal através da FBN e aumentou o rendimento de milho em até 34%, dependendo do genótipo da planta (ALVES et al., 2014). Essa variabilidade genotípica na resposta do milho à inoculação com ZAE94 já havia sido observada anteriormente (DE ARAUJO et al., 2013). Recentemente Breda et al. (2019) mostraram que a inoculação de plantas de milho com *H. seropedicae* ZAE94 aumentou os níveis de NO_3^- e redução do N-amino, açúcares e de NH_4^+ na parte aérea das plantas, alterando o metabolismo do N e promovendo maior desenvolvimento da cultura, além de maior acúmulo de P e K.

2.2.2 Importância da fixação biológica de nitrogênio em gramíneas

A FBN consiste na produção de amônia a partir de nitrogênio atmosférico (N_2) realizado por microrganismos diazotróficos, particularmente dos domínios bactéria e archaea (CANFIELD; GLAZER; FALKOWSKI, 2010; DIXON; KAHN, 2004). A FBN é catalisada pela nitrogenase que é capaz de romper a tripla ligação do N_2 atmosférico e catalisar a sua redução até amônia (NH_3^+) (NEWTON, 2007; RUBIO; LUDDEN, 2005). Nitrogenases são compostas por duas subunidades básicas de proteínas, que se distinguem pela composição metálica, a dinitrogenase redutase, ferro-proteína (NifH), coletora da força redutora e de energia, e a dinitrogenase, proteína ferro-molibdênio (NifDK), que coleta e reduz o substrato (HOWARD; REES, 1994; REES; HOWARD, 2000; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

A FBN contribui com 65% da entrada total de nitrogênio no planeta Terra e o nitrogênio fixado via FBN representa 96% da entrada de N por processos naturais (ORMENÕ-ORRILLO; HUNGRIA; MARTINEZ-ROMERO, 2013). A FBN participa de uma etapa importante do ciclo geoquímico do nitrogênio, uma vez que o N_2 não é assimilado pela maior parte dos organismos vivos, incluindo eucariotos (CURATTI; RUBIO, 2014; DIXON; KAHN, 2004). Dessa forma, a FBN pode ajudar a suprir a demanda de N de todos os organismos para sintetizar biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos (FRANCHE; LINDSTRÖM; ELMERICH, 2009; NEWTON, 2000). O uso agrícola da FBN é acessível ao produtor e ambientalmente viável, portanto é uma alternativa promissora aos fertilizantes químicos (CURATTI; RUBIO, 2014).

Além do sucesso já estabelecido do uso de inoculantes em leguminosas, muitos estudos têm mostrado o sucesso da fixação de N_2 em monocotiledôneas como a cana-de-açúcar, cereais e forrageiras (BODDEY et al., 2003; BODDEY; DOBEREINER, 1988; DE SOUZA et al., 2016; URQUIAGA; CRUZ; BODDEY, 1992; YEOH et al., 2016). Em gramíneas, as bactérias fixadoras de N_2 colonizam a rizosfera ou os tecidos vegetais internos, sem a formação de nódulos. Os gêneros, *Azoarcus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Gluconacetobacter* e *Herbaspirillum* são os mais estudados. Silva et al. (2010) estimaram, através da técnica de abundância natural de ^{15}N , que a contribuição da FBN pode ser de 10 a 42% em pastagens formadas por *B. decumbens*, *B. humidicola* e *Pennisetum purpureum*, na Zona da Mata de Pernambuco. Utilizando a mesma técnica de quantificação da FBN, Marques et al. (2017) mostraram que em *Aristida laevis*, inoculada com bactérias diazotróficas dos gêneros *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Herbaspirillum*, a contribuição da FBN foi de 36% comparada com outras forrageiras não inoculadas. No caso de *Pennisetum purpureum* a contribuição de FBN em diferentes genótipos variou entre 18 a 70% de N acumulado na planta, correspondendo a 36 e 132 kg N ha⁻¹, respectivamente, como demonstrado por De Moraes et al. (2012). Enquanto dos Santos et al. (2017) mostraram que em sorgo a contribuição por FBN aumentou em 4% (9,5 kg ha⁻¹ N por FBN) após a inoculação com bactérias diazotróficas, em relação ao controle não-inoculado.

Esses resultados demonstram que o uso de inoculantes pode ser benéfico para os sistemas de produção por contribuir de forma significativa para suprir a demanda de N em cultivos com gramíneas. Porém, ainda existem poucos estudos sobre o melhor método de inoculação e os mecanismos de infecção e colonização das bactérias inoculadas (BALSANELLI et al., 2010; MONTEIRO et al., 2008). Além disso, há pouco conhecimento a respeito das interações entre a inoculação e as práticas convencionais de adubação com fertilizantes nitrogenados (MÜLLER et al., 2016).

2.3 Métodos de identificação de bactérias diazotróficas inoculadas em gramíneas

O crescente uso de inoculantes, a partir de BPCP, intensificou a necessidade de metodologias capazes de monitorar a presença destes microrganismos no interior dos tecidos vegetais (FELTEN; DÉFAGO; MAURHOFER, 2010). A etapa de identificação torna-se importante para o monitoramento da dinâmica populacional bacteriana e da qualidade dos inoculantes produzidos. Porém, ainda são poucas as técnicas que permitem identificar e quantificar as bactérias nos tecidos internos da planta de maneira rápida, eficiente e confiável (COUILLEROT et al., 2010a; MONTEIRO et al., 2008).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para o monitoramento de populações microbianas, entre eles o método clássico de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos crescidos em meio de cultivo seletivo (SAVAZZINI et al., 2008). Essa metodologia apresenta baixa reprodutibilidade, principalmente quando usada em ambientes naturais ou em amostras ambientais, e não quantifica o número de células viáveis que não são cultiváveis em meio de cultura, podendo subestimar o real tamanho de uma população (FELTEN; DÉFAGO; MAURHOFER, 2010; OLIVER, 2010; SOTO-MUÑOZ et al., 2015). Outra desvantagem é a inviabilidade desse método no monitoramento rápido de experimentos em larga escala, já que é muito trabalhoso e demanda tempo até a obtenção de resultados (FELTEN; DÉFAGO; MAURHOFER, 2010).

A quantificação e identificação de microrganismos a nível de espécie e estirpe, na ausência de meio de cultura seletivo disponível, tornou-se possível através de outros métodos como análise morfológica, ensaios imunológicos (e.g. ELISA), métodos moleculares como hibridização da sequência 16S rRNA ou a análise com marcadores microssatélites (NAEF; SENATORE; DÉFAGO, 2006; STOFFELS; CASTELLANOS; HARTMANN, 2001). Muitos métodos independentes de cultivo também apresentam limitações, visto que a maioria não avalia quantitativamente de forma precisa e se baseia nas sequências de codificação do gene 16S rRNA. A confiabilidade dos resultados abrange apenas níveis de gênero e espécie em alguns casos. Os resultados não são específicos o suficiente para permitir o estudo da dinâmica da população bacteriana, fator importante no monitoramento de inoculantes. Dessa forma, não é possível obter a associação quantitativa da falha ou sucesso da promoção do crescimento da planta alcançada com as bactérias inoculadas de estirpes específicas (COUILLEROT et al., 2010b).

Assim, a PCR em tempo real, também chamada de PCR quantitativa (qPCR) tem se tornado a técnica mais difundida para detectar e quantificar sequências de microrganismos (SCHENA et al., 2004; VALASEK; REPA, 2005). Os marcadores de qPCR para a identificação de microrganismos a nível de gênero, espécie e estirpe podem ser desenvolvidos a partir de diferentes regiões do genoma. Os genes ou sequências podem ter suas funções conhecidas, como a região do separador intergênico 16S–23S rDNA, genes 16S rRNA e o gene responsável pela fixação biológica de nitrogênio (*nif*), ou podem ser desconhecidas, como os marcadores SCAR (*sequence characterized amplified regions*) (BAUDOIN et al., 2010; CORDIER et al., 2007; PUJOL et al., 2005, 2006; SHIME-HATTORI et al., 2011). A qPCR, tem sido uma alternativa para o monitoramento da colonização das BPCP quando inoculadas em culturas de importância econômica ou em condições experimentais de campo (POLLARD; OKUBARA, 2019; SHIME-HATTORI et al., 2011).

2.3.1 PCR quantitativa (qPCR) como método para identificar e quantificar bactérias endofíticas

A qPCR tem se difundido como técnica por determinar de forma eficiente e com alto rendimento o número de moléculas de DNA de uma determinada sequência alvo (BRAUN-

KIEWNICK et al., 2012; POLLARD; OKUBARA, 2019). Ela permite o monitoramento rápido e confiável de microrganismos em associação com plantas em ambientes naturais e *in vitro*, visto que apresenta alta especificidade, velocidade e sensibilidade (COUILLEROT et al., 2010b; FELTEN; DÉFAGO; MAURHOFER, 2010; SØRENSEN et al., 2009). Essas características tornaram a qPCR uma metodologia com papel fundamental no processo de desenvolvimento de produtos agrícolas compostos por microrganismos, pois permite o monitoramento da dinâmica populacional ao longo do tempo, possibilitando a elaboração de protocolos de aplicação confiáveis desses produtos (MARTINI et al., 2015).

Diversos autores têm mostrado a utilização da qPCR para o acompanhamento da população microbiana em diferentes tipos de amostras. Mendis et al. (2018), por exemplo, quantificaram a colonização bacteriana em raiz de milho de plantas inoculadas com *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 e *B. firmus* I-1582. As estirpes QST713 e I-1582 são componentes de produtos comerciais usados no biocontrole de patógenos disseminados via solo e muda, e para nematóides, respectivamente. Na mesma área de biocontrole de patógenos de solo, Moruzzi et al. (2017) identificaram a estirpe *Pseudomonas protegens* Pf4, diferenciando o inoculante bacteriano das estirpes de mesma espécie presentes na rizosfera, através de ensaio de qPCR estirpe-específico seguido da análise da curva de Melting (*High Resolution Melting-HRM*). Osei et al. (2017) também utilizaram a qPCR para identificação estirpe-específico de *Bradyrhizobium pachyrhizi* BR 3262 em extratos de nódulos de feijão-caupi inoculado e cultivado no solo. Por meio de qPCR baseado em *SYBR Green I* e visando a região do gene *TEF1*, Pollard & Okubara (2019) quantificaram *Fusarium avenaceum*, utilizado no controle de plantas invasoras, em solo e sementes de aveia selvagem (*Avena fatua* L.).

A qPCR também tem sido utilizada para a quantificação de BPCP inoculadas em gramíneas de interesse agrônômico. Faleiro et al. (2013) desenharam e testaram iniciadores (*primers*), específicos para o gene *nifA* de *Azospirillum*. Esses *primers* foram utilizados na reação de qPCR em plantas de milho em condições estéreis. Couillerot et al. (2010b) também usaram a técnica de qPCR para quantificar o DNA da estirpe *A. lipoferum* CRT1 nos tecidos de raiz de milho e solo aderido as raízes, através do desenho e teste de *primers* estirpe-específicos. Pereira et al. (2014) quantificaram o DNA da estirpe de *H. seropedicae* SmR1, usando *primers* com especificidade em nível de estirpe na reação de qPCR, em raiz de milho, sob cultivo *in vitro* e *in vivo*. Em corroboração, o posterior trabalho de Dall’asta et al. (2019) quantificaram a mesma estirpe SmR1 pré-inoculada em plantas de milho com antracnose cultivadas em substrato húmido. Na cultura do trigo, Stets et al. (2015) desenharam e testaram *primers* para a estirpe de *A. brasilense* FP2, inoculada em trigo em condições estéreis e não estéreis, para a quantificação de seu DNA nos tecidos de raiz por qPCR. Assim, a qPCR se apresenta como importante técnica para estudos futuros a respeito da interação entre plantas e microrganismos (CARDOZO, 2017).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento de campo com variedades de *Brachiaria* inoculadas com estirpes de *Azospirillum brasilense*

As amostras de tecido vegetal usadas para a quantificação da população de *Azospirillum brasilense* em tecido de braquiária foram coletadas do experimento de campo do discente de mestrado Rafael Salazar (CPGA-CS/UFRRJ).

O experimento de campo foi realizado na área experimental da Embrapa Agrobiologia, BR 465 km 7, Seropédica-RJ (22°44'38"S, 43°42'28"W e 26 m de altitude). O delineamento foi em blocos inteiramente casualizados, com três repetições. O arranjo fatorial foi 3x3, compostos por três variedades de braquiária (duas de *Brachiaria brizantha*: cv. Paiaguás e cv. Piatã; e uma variedade de *Brachiaria decumbens*: cv. Basilik) e três fontes de nitrogênio: dois inoculantes bacterianos à base de *Azospirillum brasilense* (inoculante comercial: composto pelas estirpes AbV5 e AvB6; e inoculante CNPAB: composto pela estirpe Sp245), além do controle absoluto, sem inoculação e sem adição de N mineral. A inoculação com as estirpes de *A. brasilense* ocorreu via semente na implantação do experimento. A coleta das plantas foi feita aos 60 dias após a emergência, em 08 de agosto de 2017. O material coletado foi separado em tecidos de colmo e raiz e, em seguida, armazenados a -72°C em ultra freezer até a extração de DNA.

3.2 Experimento em casa de vegetação com plantas de milho inoculadas com *A. brasilense* Sp245 e *H. seropedicae* ZAE94 sob duas dosagens de N

O material vegetal de milho utilizado na quantificação da população de *Azospirillum brasilense* Sp245 e *H. seropedicae* ZAE94 em tecido vegetal foi proveniente do experimento em casa de vegetação coordenado pela pós-doutoranda Gabriela Cavalcanti Alves.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Agrobiologia utilizando vasos, cujo substrato era composto por areia e vermiculita (2:1 v/v). O delineamento foi em blocos inteiramente casualizados, com três repetições. O arranjo fatorial foi 2x3, compostos por duas dosagens de N (0,3 e 3,0 mM) na composição da solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) e três níveis de inoculação: dois inoculantes bacterianos compostos cada um pelas estirpes Sp245 de *A. brasilense* e ZAE94 de *H. seropedicae*, respectivamente, além do controle sem inoculação. Nos tratamentos com inoculação, as sementes de milho foram inoculadas no momento do plantio. A coleta das plantas foi feita aos 15 dias após a emergência a partir de corte na base da planta, posterior lavagem das raízes e imediato congelamento em N líquido para futuro armazenamento a -72°C em ultra freezer.

3.3 Cultivo de bactérias para extração de DNA

As três estirpes de bactérias pertencentes à espécie *Azospirillum brasilense* e a estirpe de *Herbaspirillum seropedicae* (Tabela 1) utilizadas no presente trabalho foram fornecidas pelo Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (<https://www.embrapa.br/agrobiologia/crb-jd>), localizado na Embrapa Agrobiologia.

Tabela 1: Estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* utilizadas no presente trabalho.

Espécie	Estirpe	Código CNPAB	Origem da estirpe	Referência
<i>A. brasilense</i>	Ab-V5	BR12186	Milho	Hungria et al. (2010)
	FP2	BR11075	mutações em <i>A. brasilense</i> (Sp7)	Pedrosa & Yates (1984)
	Sp245	BR11005	Trigo	Baldani et al. (1986b)
<i>H. seropedicae</i>	ZAE94	BR 11417	Arroz	Baldani et al. (1986a)

As estirpes de *A. brasilense* foram inoculadas em erlenmeyers contendo 15 mL de meio líquido DYGS (BALDANI et al., 1986b), descrito no ANEXO A. Após a inoculação, as bactérias foram incubadas em agitador tipo *shaker* (Innova 42) a 30°C com agitação de 120 rpm por 48 horas. A utilização inicialmente do meio DYGS teve a função de pré-inóculo para posterior re-inoculação em meio semi-seletivo NFbHP (KLASSEN et al., 1997). Assim, durante o período de crescimento em meio DYGS, foi avaliada a densidade ótica (D.O. 600 nm) dos pré-inóculos. A re-inoculação em meio NFbHP foi feita quando os valores de densidade ótica estavam acima de 1,0, indicando bom crescimento e maior número de células viáveis.

Também foi feita a contagem de bactérias através da câmara de Neubauer, descrita no item 3.3.1, para calcular o volume de pré-inóculo a ser transferido para o meio NFbHP, de modo a ser alcançada uma concentração final de 10^5 células bacterianas mL⁻¹. Foram transferidos 21 uL de cada pré-inóculo para novos erlenmeyers contendo 15 mL de meio NFbHP (ANEXO B) nas mesmas condições de temperatura e agitação, por 72 horas.

Para obter a massa celular, foram alíquotados em microtubos, 1,5 mL de cada inóculo com 5 repetições. Depois foi feita a centrifugação dos materiais a 13000 g durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados, permanecendo os sedimentos celulares formados, posteriormente armazenados no freezer a 4°C para serem usados na extração de DNA bacteriano.

A estirpe de *H. seropedicae* ZAE94 foi inoculada em erlenmeyers contendo 15 mL de meio líquido DYGS (RODRIGUES NETO, 1986), descrito no ANEXO A com pH ajustado para 6.0. Após a inoculação, a bactéria foi incubada em agitador tipo *shaker* (Innova 42) a 30°C com agitação de 120 rpm por aproximadamente 24 horas. O procedimento para obtenção da massa celular foi o mesmo realizado para as estirpes de *A. brasilense*.

3.3.1 Contagem em câmara de Neubauer das estirpes de *Azospirillum brasilense*

A contagem em Câmara de Neubauer foi realizada preparando-se duas diluições em série com fatores de diluição de 10^{-1} e 10^{-2} para cada pré-inóculo. As diluições com fator de 10^{-1} consistiram no preparo de alíquotas de 100 µL de cada pré-inóculo adicionadas em 900 µL de solução salina 0,90% (m/v) de NaCl. Em seguida, 100 uL de cada diluição 10^{-1} foram adicionados a 900 uL de solução salina 0,90% (m/v) de NaCl, sendo preparadas as amostras 100x diluídas.

Foram aplicados 10 uL de cada amostra diluída 100x no retículo de Neubauer, sendo coberto, posteriormente com uma lamínula de vidro. Por meio de microscópio óptico (*Axioplan*, Zeiss), as bactérias presentes em cada amostra, foram contadas. A contagem foi

feita em triplicata, conforme a região C, nas posições 2, 3 e 5, representados na Figura 1. A média aritmética das três contagens foi usada na Equação 1 para determinar o número de células por mL de inoculante presente nos pré-inóculos.

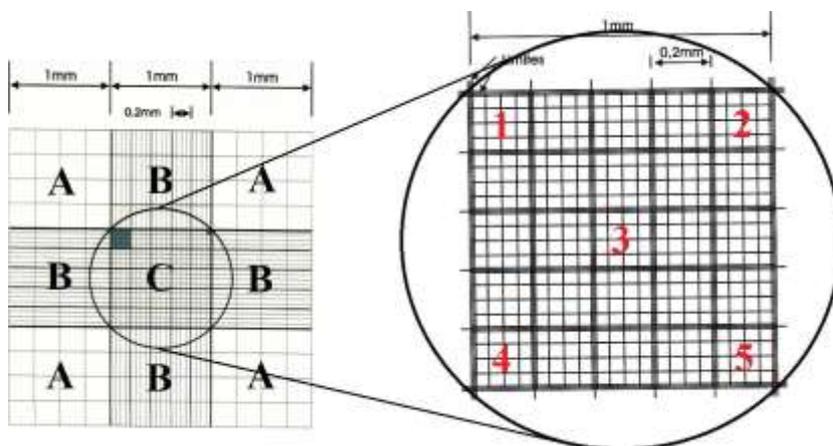


Figura 1: Representação dos quadrantes na região chamada retículo de Neubauer.

Fonte: (ANGELIS; VALSECHI, 2008).

Equação 1

$$\text{N}^\circ \text{ Células} = M \times \text{FD} \times 2,5 \cdot 10^5$$

Onde: N° Células, número de células bacterianas por mL de inoculante; M, média aritmética do número de células das contagens; FD, fator de diluição; e $2,5 \times 10^5$, constante de conversão.

3.3.2 Contagem de bactérias pelo método da microgota

Placas de Petri contendo o meio DYGS sólido foram utilizadas para a contagem do número de unidades formadoras (UFC) de cada estirpe de *A. brasilense* (Tabela 1) pelo método da microgota. O preparo do meio foi feito como descrito no ANEXO A com a adição de agar (15 g L^{-1}). Em paralelo foram feitas diluições em série, com fatores de diluição de 10^{-1} e 10^{-5} , adicionando-se inicialmente 1 mL de inóculo de cada estirpe de *A. brasilense* em 9 mL de solução salina 0,9%. Três gotas ($10 \mu\text{L}$) de cada diluição foram pipetadas de maneira equidistante na superfície das placas de Petri, em três repetições técnicas. As placas foram incubadas em estufa a 30°C por aproximadamente 48 horas. A contagem foi realizada a partir da diluição que se observou de 10 a 100 colônias e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) foi determinado pela Equação 2.

Equação 2

$$\text{N}^\circ \text{ UFC} = C \times 10^d \times 10^2$$

Onde: N° UFC é o número de unidades formadoras de colônia por mL, C, a média aritmética do número de colônias observadas nas três replicas técnicas, d é o valor, em módulo, da diluição onde as colônias foram contadas e 10^2 é uma constante usada para a conversão de μL para mL.

A quantificação da *H. seropedicae* ZAE94 por esse método de contagem foi realizado utilizando-se placas de Petri contendo o meio NFb sólido (BALDANI et al., 2014) modificado descrito no ANEXO C, com o volume de indicador azul de bromotimol triplicado (NFb 3x). Os procedimentos seguidos para a realização da diluição seriada da estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* e a contagem em placa também foram os mesmos realizados para as estirpes de *A. brasilense*.

3.4 Extração do DNA genômico de bactérias

A extração de DNA bacteriano realizada utilizando o tampão CTAB (DOYLE; DOYLE, 1987). O tampão CTAB [2% CTAB; NaCl a 1,42 mM; Tris-HCl a 100 mM pH = 8,0; EDTA a 20 mM pH = 8,0; 2% PVP; ácido ascórbico a 5 mM e DIECA a 4 mM] foi aquecido a 80°C e 800 µL foram adicionados em um tubo tipo eppendorf de 2 mL contendo sedimento celular para cada estirpe de *A. brasilense*. Estas amostras foram homogeneizadas, até que os sedimentos celulares fossem desfeitos e em seguida incubados por 5 min em banho-maria a 80°C. Posteriormente, foram adicionados 5 µL de Proteinase K (20 mg mL⁻¹) e 5 µL de RNase (10 mg mL⁻¹) aos microtubos mantidos em temperatura ambiente. Os tubos foram então incubados a 37°C, em banho-maria, por 30 minutos e adicionou-se 700 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1).

Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 13000 g. A fase aquosa foi transferida para microtubos de 1,5 mL e a etapa de extração orgânica foi repetida. Após a centrifugação, transferiu-se novamente a fase aquosa para novos microtubos. A precipitação do DNA foi realizada em meio alcoólico pela adição de 280 µL de isopropanol, correspondente a 70% do volume transferido da etapa anterior. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 10 min a 13200 g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi lavado com 500 µL de etanol 70%. Novamente o sobrenadante foi descartado e o precipitado seco a temperatura ambiente durante 90 minutos. O processo de extração foi finalizado adicionando 100 µL de água ultrapura livre de nuclease (*Integrated DNA Technologies*) a cada microtubo para dissolver o DNA precipitado.

A extração de DNA bacteriano da estirpe *H. seropedicae* ZAE94 foi realizada com o mesmo método com tampão CTAB já mencionado.

3.4.1 Avaliação da quantidade e qualidade do DNA total extraído

A quantificação do DNA bacteriano das estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* ZAE94 extraído foi feita com o fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen), usando o kit *Qubit ds DNA BR Assay*. A solução de trabalho foi preparada adicionando fluoróforo (*Qubit reagent*) e tampão (*Qubit buffer*) na proporção de 1:199 a um microtubo de 5 mL. As amostras foram preparadas em microtubos de 0,5 mL, adicionando-se 199 µL da solução de trabalho a 1 µL de cada DNA bacteriano extraído. Os dois padrões (*Qubit ds DNA BR Standard 2* e 1) também foram feitos, adicionando 190 µL da solução de trabalho a 10 µL de cada padrão. A seguir, os microtubos foram agitados em *vortex* por três minutos e depois deixados à temperatura ambiente durante dois minutos. Posteriormente, as amostras e os padrões foram analisados no fluorímetro.

A integridade do DNA bacteriano extraído foi avaliada por meio de eletroforese (70V/90 min) em gel de agarose não desnaturante 0,8% (p/v), na presença de tampão TAE 1x (Tris-acetato a 40 mM pH 8,0 e EDTA a 1 mM pH 8,0), aplicando-se 5 µL de DNA bacteriano. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) para posterior fotodocumentação e registrado pelo programa KODAK[®] *Gel Logic Cabinet 100* (Eastman Kodak Company, Rochester, EUA).

3.4.2 PCR utilizando *primers* para o gene 16S rRNA

Foram feitas PCRs convencionais para avaliar a qualidade do DNA extraído das estirpes trabalhadas total, fazendo uso de *primers* do gene 16S rRNA. O par de *primer* 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') (FURUSHITA et al., 2003) e Amp2 (5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3') (WANG; CAO; CERNIGLIA, 1996) foi usado para amplificação de um fragmento de aproximadamente 1.500 pb do gene 16S rRNA. A PCR foi preparada utilizando: 3 µL de cada *primer* a 10 µM; 10 µL de tampão 5x; 5 µL de MgCl₂ a 25 mM; 1,0 µL Taq polimerase a 5 U L⁻¹; 1,0 µL de dNTP a 10 mM; 8,0 µL de DMSO 50%; 2 µL da amostra de DNA bacteriano e água ultrapura, completando o volume final de 50 µL por reação. As condições para as reações de PCR foram: desnaturação inicial de 95°C por 1 min, seguida de 30 ciclos com 30 s a 95°C, 62°C por 45 s e 72°C por 2 min, seguidos de uma extensão final de 72 °C por 10 min.

Após o término da reação, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% (p/v) para em seguida ser corado em brometo de etídeo (0,5 µg mL⁻¹) e posteriormente fotodocumentado.

3.5 Extração de DNA genômico de tecidos vegetais de braquiária e milho

Foram feitas as extrações de DNA dos tecidos de colmo e raiz de braquiária, provenientes do experimento de campo (item 3.1) e de raiz de plantas de milho coletadas do experimento em casa de vegetação (item 3.2). O tecido vegetal foi macerado em N líquido usando pistilo e almofariz de porcelana. Após macerados, aproximadamente 300 mg de tecido foram transferidos para tubo tipo eppendorf de 2 mL. A extração do DNA vegetal foi realizada com o tampão CTAB, seguindo o mesmo protocolo usado para a extração do DNA bacteriano (item 3.4).

3.5.1 Avaliação da quantidade e qualidade do DNA total extraído de tecido vegetal

A quantificação do DNA vegetal extraído foi feita com o fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen) com o mesmo kit *Qubit ds DNA BR Assay* e metodologia usados para o DNA bacteriano no item 3.4.1. O DNA vegetal extraído também foi avaliado quanto a sua qualidade utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo scientific). A concentração de DNA (ng µL⁻¹), foi avaliada com a leitura de absorbância (A) no comprimento de onda de 260 nm. As relações entre os valores de absorbância a 260 nm e 280 nm (260/280) e 260 nm e 230 nm (260/230) foram usadas como indicadores da qualidade do DNA extraído. A presença e integridade do DNA, após a extração, foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose não desnaturante 0,8% (p/v).

3.5.2 Avaliação qualidade do DNA extraído de tecido vegetal por PCR com *primers* do gene 16S rRNA

Foram feitas PCR convencionais para avaliar a qualidade do DNA extraído dos tecidos vegetais, utilizando *primers* do gene 16S rRNA, de acordo com o item 3.4.2.

3.6 Extração de DNA de tecido vegetal com diluição seriada das estirpes alvo

Foi feita a extração da mistura de tecido vegetal (colmo e raiz) com diluições em série de 10⁻¹ a 10⁻⁶ do DNA genômico das estirpes de *A. brasilense* selecionadas, para a construção da curva padrão, usada para quantificar o número de células por grama de tecido vegetal de *Brachiaria* sp. Para a extração de DNA de raiz de milho com diluição seriada das estirpes ZAE94 e Sp245 realizou-se a mesma metodologia.

O preparo da diluição seriada se iniciou com a ressuspensão dos sedimentos celulares das estirpes (item 3.3) em 1000 µL de solução salina 0,9%. As diluições foram feitas a partir de 100 µL da ressuspensão em 900 µL de solução salina. Em seguida, pesou-se 100 mg de tecido vegetal dos tratamentos controle, tanto de raiz quanto colmo, para ser adicionado a 100 µL de cada diluição seriada.

Também foi feita a mistura do tecido vegetal com 100 µL da ressuspensão. As misturas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos para posterior extração de DNA. A extração com tampão CTAB foi realizada conforme descrito anteriormente. Além das amostras contendo as misturas, também foi feita a extração de DNA de 100 mg de cada tecido vegetal e do volume restante da ressuspensão do sedimento celular.

3.7 Desenho dos *primers*

Os *primers* foram desenhados a partir da sequência dos genomas das estirpes Ab-V5 (Número de acesso NCBI: POQV01000001.1), FP2 (Número de acesso NCBI: NZ_APHV00000000.1) e Sp245 (Números de acesso NCBI: CP022253.1 e HE577327.1) de *A. brasilense* e da estirpe ZAE94 (Número de acesso RAST: 6666666.224243) de *H. seropedicae*. O genoma de cada estirpe foi fragmentado *in silico* em “contigs” com 500 pares de base. Esses “contigs” foram submetidos a uma análise de similaridade utilizando o programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) com genomas de outros organismos depositado no banco NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Apenas os “contigs” que não apresentaram similaridade com nenhuma sequência no banco de dados foram utilizados para o desenho dos *primers*.

Os programas *Primer3plus* (UNTERGASSER et al., 2012) e Oligo explorer 1. 1.0 (<http://www.softpedia.com/get/Science-CAD/Oligo-Explorer.shtml>) foram utilizados para o fazer o desenho a partir dos “contigs” exclusivos do genoma das estirpes FP2, Sp245 e Ab-V5 de *A. brasilense* e ZAE94 de *H. seropedicae*. Foram desenhados *primers* com tamanhos de 20 nucleotídeos, conteúdo GC entre 55 a 60%, Tm entre 57,5 a 64°C e amplificação de fragmentos de DNA entre 172 a 214 pb. As sequências nucleotídicas de cada *primer* desenhado e o tamanho do fragmento amplificado (pb) foi descrito no ANEXO D.

3.8 Avaliação estirpe-específica dos *primers* desenhados para as estirpes de *Azospirillum brasilense* por PCR convencional

A especificidade em nível de estirpe dos *primers* desenhados para *A. brasilense* foi testada utilizando o DNA genômico de quatro estirpes; as três estirpes-alvo usadas para os desenhos dos *primers* (Ab-V5, FP2 e Sp245) e a estirpe Ab-V6, descrita na Tabela 2. As reações de PCR para todos os pares de *primers* foram preparadas de acordo com as seguintes condições: 0,5 µL de cada *primer* a 10 µM; 3,0 µL de tampão 5x; 0,9 µL de MgCl₂ a 25 mM; 0,075 µL Taq polimerase a 5 U µL⁻¹; 0,3 µL de dNTP a 10 mM; 1 µL a 2 ng µL⁻¹ da amostra de DNA bacteriano e água ultrapura, completando o volume final de 15 µL por reação.

As condições para as reações de PCR foram: desnaturação inicial de 96°C por 5 min, seguida de 40 ciclos com 1 min a 95°C, 60°C por 45 s e 72°C por 1 min, seguidos de uma extensão final de 72°C por 8 min. Para aumentar a eficiência de amplificação e/ou especificidade de cada *primer* foram feitos ajustes nas condições de reação (ANEXO E). Após o término da reação, utilizou-se 7,5 µL do produto da PCR para eletroforese (90 V/80 min) em gel de agarose 2%, em seguida corado com brometo de etídio e visualizado em fotodocumentador.

Tabela 2: Espécies de bactérias diazotróficas utilizadas para avaliar a especificidade dos *primers* desenhados.

Espécie	Estirpe*¹	Código CNPAB	Origem da estirpe	Referência
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	HCC103	BR11504	Cana-de-açúcar	Oliveira et al. (2003)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	ZAE67	BR11175	Arroz	Baldani et al. (1986a)
	HRC54	BR11335	Cana-de-açúcar	Oliveira et al. (2003)
<i>Paraburkholderia tropica</i>	Ppe8	BR11366	Cana-de-açúcar	Oliveira et al. (2003)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Pal5	BR11281	Cana-de-açúcar	Oliveira et al. (2003)
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	CbAmc	BR11145	Cana-de-açúcar	Oliveira et al. (2003)
	Y1	BR11142	Gramínea	Lin et al. (2014)
<i>Roseomonas fauriae</i>	C610	BR10888	Ferida Humana	Rihs et al. (1993)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Sp80	BR11650	Milho	Tarrand et al. (1978)
	Sp204	BR11978	Milho	Silva & Reis (2009)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Ab-V6	BR12391	Milho	Hungria et al. (2010)
	Sp7	BR11001	<i>Digitaria</i> spp.	Tarrand et al. (1978)
	NH	BR10887	Solo	Nabti et al. (2007)
	Azb60	BR12001	---	CRB-JD* ²
	Azb12	BR11796	---	CRB-JD
	Sp246	BR11003	Trigo	Baldani et al. (1986b)

*¹ DNA genômico das estirpes fornecido pelo Laboratório Genética e Bioquímica (LGB) da Embrapa Agrobiologia.

*²CRB-JD: Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner, Embrapa Agrobiologia.

3.9 Avaliação estirpe-específica dos *primers* desenhados para a estirpe *H. seropedicae* ZAE94 por PCR convencional

Os *primers* foram avaliados quanto a sua especificidade em nível de estirpe utilizando o DNA genômico de três estirpes não-alvo de *H. seropedicae*, além da estirpe-alvo ZAE94, como molde na PCR convencional (Tabela 3). As reações de PCR para todos os pares de *primers* foram preparadas nas seguintes condições: 0,25 µL de cada *primer* a 10 µM; 3,0 µL de tampão 5x; 0,9 µL de MgCl₂ a 25 mM; 0,075 µL Taq polimerase a 5 U µL⁻¹; 0,3 µL de dNTP a 10 mM; 1 µL a 2 ng uL⁻¹ da amostra de DNA bacteriano e água ultrapura,

completando o volume final de 15 µL por reação. As condições para a reação de PCR foram as mesmas descritas no item 3.8, assim como a posterior eletroforese em gel de agarose 2%.

Tabela 3: Espécies e estirpes não-alvo de bactérias diazotróficas utilizadas para avaliar a especificidade dos primers desenhados para *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94.

Espécie	Estirpe*	Código CNPAB	Cultura de origem	Referência
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	HCC103	BR11504	Cana-de-açúcar	Oliveira et al. (2003)
	ZAE67	BR11175	Arroz	Baldani et al. (1986a)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	HRC80	BR11335	Cana-de-açúcar	Olivares (1997)
	HS4	BR11382	Coqueiro	Baldani et al. (1986a)
<i>Paraburkholderia tropica</i>	Ppe8	BR11366	Cana-de-açúcar	Oliveira et al. (2003)
<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	Pa15	BR11281	Cana-de-açúcar	Oliveira et al. (2003)
<i>Nitrospirillum amazonense</i>	CbAmc	BR11145	Cana-de-açúcar	Oliveira et al. (2003)
	Y1	BR11142	Gramínea	Lin et al. (2014)
<i>Roseomonas fauriae</i>	C610	BR10888	Ferida Humana	Rihs et al. (1993)
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Sp80	BR11650	Milho	Tarrand et al. (1978)
	Sp204	BR11978	Milho	Da silva & Reis (2009)
<i>Azospirillum brasilense</i>	Sp7	BR11001	<i>Digitaria</i> spp.	Tarrand et al. (1978)

* DNA genômico das estirpes fornecido pelo Laboratório Genética e Bioquímica (LGB) da Embrapa Agrobiologia.

3.10 Avaliação da especificidade espécie-específico dos primers por PCR convencional

Após a avaliação inicial utilizando a PCR convencional, entre os primers desenhados para as estirpes *A. brasilense*, aqueles com maior especificidade e eficiência de amplificação foram selecionados para serem testados em nível de espécie nas reações de PCR. O DNA genômico de seis estirpes de *A. brasilense* e dez estirpes de outras espécies, descrito na Tabela 2, foram usados como molde para as reações de PCR.

Os primers desenhados para estirpe *H. seropedicae* ZAE94 com maior desempenho de eficiência e especificidade também foram selecionados para serem avaliados quanto à espécie-especificidade. Foi usado o DNA genômico de quatro estirpes de *H. seropedicae* e nove estirpes de outras espécies (Tabela 3). As reações de PCR foram preparadas de acordo com a descrição feita no item 3.8 e ajustadas, conforme o ANEXO E. A eletroforese e posterior visualização do gel de agarose também foram realizadas segundo o item 3.8.

3.11 Testes por PCR em tempo real (qPCR) dos primers selecionados

Para avaliação dos primers selecionados no item anterior por qPCR, foram usados o kit Promega® SYBR Green e o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied

Biosystems). Uma alíquota de DNA genômico extraído de cada estirpe avaliada a $2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ foi diluída em série de 0,1 a 0,00001 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ inicialmente. As reações foram preparadas para o volume final de $15 \mu\text{L}$, contendo: $7,5 \mu\text{L}$ *SYBR Green* (Promega®); $0,25 \mu\text{L}$ de cada *primer* $10 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{L}$ de *Tween 20* 2%, $1,5 \mu\text{L}$ de água ultrapura e $5 \mu\text{L}$ do DNA genômico.

As concentrações finais de DNA variaram de 100 a $0,00001 \text{ ng } 15 \mu\text{L}^{-1}$. As diluições de cada amostra foram pipetadas em duplicata em placas de 96 poços. Modificações nas condições da qPCR, descritas no ANEXO F, foram feitas para aumentar a eficiência de amplificação de cada *primer*. As reações foram realizadas nas seguintes condições: 95°C por 2 min e 40 ciclos de duas temperaturas: 95°C por 45 s e $60,5^\circ\text{C}$ por 30 s.

3.12 Cálculo do número de cópias do fragmento de DNA-alvo

O valor de massa de DNA de cada amostra usada na reação de qPCR (item 3.11), e o tamanho do genoma (Tabela 4) das estirpes-alvo dos *primers* selecionados foram utilizados para calcular o número de cópias do fragmento de DNA alvo amplificado através da Equação 3. O valor encontrado foi considerado como o número de células bacterianas em cada amostra, uma vez que o par de *primers* só se anela a uma única região do genoma e espera-se que cada célula tenha um genoma.

Equação 3:

$$\text{N}^\circ \text{ de células} = [\text{X (ng)} \times 6,0221 \cdot 10^{23} (\text{moléculas} \cdot \text{mol}^{-1})] / [\text{N (pb)} \times 660 (\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}) \times 1 \cdot 10^9 (\text{ng} \cdot \text{g}^{-1})]$$

Onde: N° Células, número de células ou cópias do fragmento de DNA alvo amplificado; X, quantidade de DNA genômico (ng) usado na reação; $6,0221 \times 10^{23}$, constante de Avogadro; N, tamanho do DNA genômico (pb); 660, massa média (ng) de 1 pb de DNA dupla fita; 1×10^9 , constante usada para transformar a massa do fragmento de DNA amplificado de grama (g) para nanograma (ng).

O log 10 do número de cópias de cada amostra de DNA usada na reação foram correlacionados às médias do valor Ct (*Cycle threshold*), obtidas na qPCR, para se plotar uma curva padrão para cada *primer* selecionado anteriormente. A equação da reta gerada foi utilizada para calcular o número de cópias do fragmento de DNA de cada estirpe-alvo nas amostras de tecido vegetal de braquiária e milho.

Tabela 4: Tamanho do genoma das estirpes-alvo dos *primers* desenhados.

Espécie	Estirpe	Tamanho do Genoma (pb)	Referência
<i>Azospirillum brasilense</i>	Ab-V5	6.934.595	Hungria et al. (2018)
	FP2	6.885.108	Stets et al. (2015)
	Sp245	7.530.241	Faleiro et al. (2013)
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	ZAE94	5.653.622	Baldani et al. (2011)

3.13 Avaliação da sensibilidade da qPCR com *primers* específicos

A sensibilidade de cada *primer* selecionado foi definida após analisar o número de cópias do fragmento de DNA das estirpes-alvo, encontrado no item 3.12, correspondente a amostra mais diluída.

3.14 Eficiência de amplificação dos *primers* selecionados para qPCR

O valor da inclinação da reta (*Slope*) gerado pela equação de cada *primer* (item 3.12) foi utilizado na Equação 4 para o cálculo de eficiência.

Equação 4:

$$E = 10^{-(1/\text{Slope})} - 1$$

3.15 Avaliação da qualidade do DNA extraído de tecido vegetal com diluições em série das estirpes-alvo

Avaliou-se a qualidade do DNA extraído da mistura de tecido vegetal de braquiária e milho com diluições em série das estirpes-alvo, usado para construção da curva padrão (item 3.6), através de PCR convencional. As reações de PCR foram feitas usando o DNA extraído das misturas, nos tecidos vegetais, com as estirpes correspondentes aos *primers* já selecionados nos testes anteriores. As condições da reação e o seu preparo foram de acordo com item 3.11 e ajustadas, conforme o ANEXO E. A eletroforese e posterior visualização do gel de agarose foram realizadas segundo o mesmo item.

3.16 Uso da PCR em Tempo Real (qPCR) para quantificação estirpe-específica de *A. brasilense* e *H. seropedicae* em tecidos vegetais de braquiária e milho

Para a reação de qPCR foram utilizados o DNA extraído de tecidos de raiz e colmo de braquiária, provenientes do experimento a campo descrito no item 3.1. Foram selecionadas duas variedades de *B. brizantha*: cv. Paiaguás e cv. Piatã e uma variedade de *B. decumbens*: cv. Basilik inoculadas com a estirpe Sp245 de *A. brasilense*, e sem inoculação e adição de N mineral. Com relação ao experimento em casa de vegetação, foram usadas as amostras de DNA de raízes de milho correspondente aos tratamentos inoculados com as estirpes ZAE94 e Sp245, com duas dosagens de N (3,0 e 0,3 mM) na solução nutritiva de Hoagland, e o controle, sem inoculação, para a reação de qPCR.

As amostras de DNA foram padronizadas para a concentração inicial de 6 ng μL^{-1} e pipetadas em triplicata em placas de 96 poços. A concentração final de DNA na reação foi de 30 ng por 15 μL^{-1} . A condição de reação de qPCR e seu preparo foram segundo a descrição do item 3.11.

3.17 Determinação do número de células por grama de tecido vegetal

A média do Ct (*Cycle threshold*) das 3 repetições técnicas de cada amostra de DNA de tecido vegetal de braquiária e milho foi usada para quantificar as estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* nos tecidos vegetais pela equação da reta específica para cada estirpe. A quantidade de células presentes em cada amostra foi estimada a partir do número de cópias do fragmento, uma vez que o fragmento alvo a ser amplificado tem apenas uma cópia no genoma. O número de células por grama de tecido nas amostras de DNA isoladas dos tratamentos foi calculado através da Equação 5.

Equação 5:

$$\text{N}^\circ \text{ Células} = A \times B \times C / D \times E$$

Onde: A, número de cópias do fragmento obtido através da equação da reta específica para cada estirpe; B, concentração ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) de DNA genômico extraído; C, volume (μL) de DNA extraído; D, massa (ng) de DNA usado na reação de qPCR; E, massa (g) inicial do tecido vegetal para a extração.

3.17.1 Curva padrão da mistura de tecido vegetal com diluições em série das estirpes-alvo

Os pontos da curva da mistura usados na reação de qPCR corresponderam as amostras de DNA extraído das misturas de tecido vegetal com a cultura pura da bactéria e as diluições em série de 10^{-1} a 10^{-5} das estirpes-alvo, correspondentes aos *primers* já selecionados nos testes anteriores. As amostras foram padronizadas para $6 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ e pipetadas em triplicata em placas de 96 poços. A concentração final de DNA na reação foi de $30 \text{ ng por } 15 \mu\text{L}^{-1}$. A condição de reação de qPCR e seu preparo seguiram a descrição do item 3.11.

Para construção da curva padrão da mistura, estimou-se o número de cópias do fragmento de DNA do primeiro ponto da curva, correspondente a mistura de tecido com o volume restante da ressuspensão do pellet (item 3.6), usando a equação específica para cada estirpe (item 3.12). Em seguida, foi calculado o número de células presentes por mL de ressuspensão, através da Equação 5 (item 3.17), substituindo o fator E pelo volume (mL) restante da ressuspensão do pellet usado no início da extração.

O número de células presentes em 100 uL , volume adicionado ao tecido vegetal para posterior extração (item 3.6), foi a quantidade de células estimada para o primeiro ponto da curva. Esse valor foi usado para estipular o número de células dos outros pontos, multiplicando-o pelos fatores de diluição de 10^{-1} a 10^{-5} . Assim, plotou-se a curva padrão correlacionando o Log 10 do número de cópias de cada ponto com as médias do valor Ct, obtidas na qPCR. O número de células por grama de tecido nas amostras de DNA isoladas dos tratamentos foi calculado, segundo o item 3.17, usando a equação da reta da curva padrão da mistura.

3.18 Análise Estatística

Os dados gerados das quantificações realizadas por meio das técnicas de contagem por microgota e qPCR foram comparados estatisticamente, assim como os resultados obtidos por qPCR utilizando as diferentes curvas padrão. Também foi feito um comparativo da quantificação feita nas amostras de braquiária e milho entre os diferentes tratamentos. Os dados foram submetidos a teste de Tukey, com nível de significância de 5%, utilizando o programa estatístico SISVAR 5.6[®] (FERREIRA, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação e seleção de *primers* específicos em nível de estirpe

Foram realizadas reações de PCR Convencional utilizando os pares de *primer* desenhados para as estirpes de *A. brasilense* Sp245, FP2 e Ab-V5 e *H. seropedicae* ZAE94 que compõem os inoculantes utilizados para inocular as plantas de braquiária e milho (ANEXO D). As análises dos *primers* desenhados permitiram a seleção de *primers* estirpe-específicos (Tabela 5), uma vez que os resultados das reações de PCR convencional mostraram a amplificação do fragmento de DNA específico das estirpes bacterianas de interesse (estirpe-alvo).

Para melhorar a eficiência de amplificação foram necessários alguns ajustes na quantidade dos reagentes e condições da reação de PCR convencional para otimizar a amplificação como mostrado no ANEXO E. A concentração de Mg^{2+} é um parâmetro determinante na especificidade e eficiência da PCR (GRUNENWALD, 2003). O íon é cofator da enzima DNA polimerase, tornando-se importante para a atuação da enzima. Porém, sua atividade pode ser comprometida ao se ligar a moléculas de ácidos nucléicos, a dNTPs, aos *primers* e EDTA (HILL; STEWART, 1992). Recomenda-se que a concentração de $MgCl_2$ na reação de PCR esteja entre 0,5-3,0 mM (AZEVEDO; FELIPE; BRÍGIDO, 2003), uma vez que o excesso pode resultar em produtos de amplificação não específicos e em quantidades insuficientes, reduzindo o rendimento do produto de PCR esperado (GRUNENWALD, 2003). Nesse trabalho, a concentração utilizada nas reações de PCR ficou entre 1-1,5 mM.

A concentração de *primer* usada na PCR também é importante, recomendando-se que esteja entre 0,05 e 1,0 μM (GRUNENWALD, 2003). A concentração usada no trabalho variou de 0,11 a 0,33 μM , portanto, dentro da faixa adequada. Diminui-se a concentração de alguns *primers* para evitar rastros, causados por excesso de *primer* (GRUNENWALD, 2003), porém sem afetar a eficiência da PCR (ANEXO E).

A temperatura de anelamento é outro fator importante para potencializar a reação de PCR e recomenda-se que esteja entre 55 e 60°C para PCR e 59 ± 2 °C para a qPCR (BERGKVIST et al., 2014). Para cada *primer*, a temperatura ótima foi encontrada entre 60 e 61°C, depois de vários testes com reações de PCR com gradiente de temperatura (ANEXO E). Foi testada a variação da temperatura para evitar o anelamento indesejado dos *primers*, reduzir a extensão incorreta de nucleotídeos na terminação 3' dos *primers* e melhorar a quantificação por qPCR posteriormente (BERGKVIST et al., 2014; GRUNENWALD, 2003).

Tabela 5: Pares de *primer* para estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 selecionados pelos testes de especificidade em nível de estirpe.

Estirpe	<i>Primers</i>	Sequências (5' - 3')	Amplicon (pb)
Ab-V5 (BR12186)	Ab-V5p1F Ab-V5p1R	GCGGAACTCCACAACCGAT CAGTGGCCAGAAGGTTAAGGT	219
FP2 (BR11075)	FP2Cont9982F FP2Cont9982R	GAAGACCGGGATGGATGCGG CACGCTCTTCTCGTCCAGGC	196

	FP2Cont11061F FP2Cont11061R	CGGACGGCTTCTACCGCGTG CGGACGATTCTTGTCTCCCC	189
Sp245 (BR11005)	Sp245p10F Sp245p10R	CCTCTATCGGAACCGCAACG GCACTTGTTTGATGCCGAGA	203
	Sp245Plasm1F Sp245Plasm1R	TTATGCCTTCGCCATCGACC GGCGAAGATCCGTTCCATCT	171
ZAE94 (BR1417)	ZAECont2223F1 ZAECont2223R1	GGATCACCTTCTTCCGTTGG TCGGCGGTAATGTAAGGAGC	193
	ZAECont2223F2 ZAECont2223R2	GGTCGCTCTTATGACGTGGT GAAGGCGTTGGGATACATCG	196

A especificidade em nível de estirpe dos *primers* desenhados foi avaliada considerando a amplificação bem-sucedida para fragmentos do DNA genômico das estirpes-alvo de *A. brasilense* e *H. seropedicae* e ausência de amplificação para estirpes não-alvo que foram consideradas como controle negativo. Após os testes estirpe-específicos foram selecionados sete pares de *primers* (Tabela 5), entre os 14 pares de *primer* desenhados (ANEXO D), para serem usados nas análises seguintes.

4.1.1 Teste estirpe-específico dos *primers* desenhados para *Azospirillum brasilense*

Os *primers* desenhados para as estirpes de *A. brasilense* foram testados utilizando o DNA genômico de quatro estirpes: Ab-V5, Ab-V6, FP2 e Sp245. Após as análises de especificidade dos *primers*, foram selecionados cinco pares de *primer*: Ab-V5p1, FP2Cont9982, FP2Cont11061, Sp245p10 e Sp245Plasm1, para as posteriores análises (Tabela 5).

Para a estirpe Ab-V5, o par de *primer* Ab-V5p1 apresentou-se o mais específico dentre os *primers* testados para essa estirpe. Como foi observado na Figura 2A houve a amplificação de fragmentos de 219 pb apenas para a estirpe-alvo e a estirpe FP2 de *A. brasilense*.

Os pares de *primer* Ab-V5Cont7209 e Ab-V5Cont7203 não mostraram amplificação bem-sucedida na região esperada para a estirpe-alvo e ainda apresentaram amplificação fragmentos de DNA para as estirpes FP2 e Ab-V6 (Figura 2B e 2C), usadas como controle negativo. Dessa forma não foram usados para os posteriores testes.

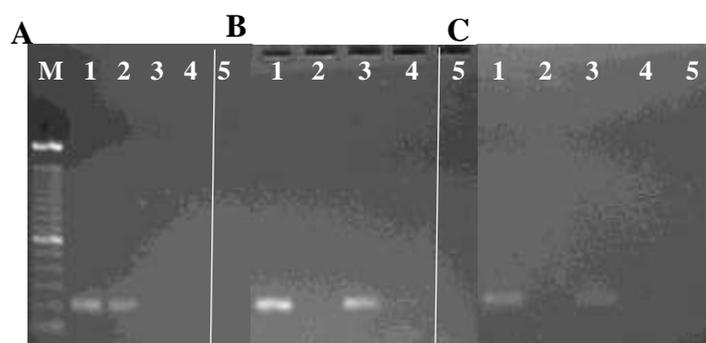


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA da bactéria-alvo (2 ng μL^{-1}), utilizando os pares de *primer* Ab-V5p1

(A), Ab-V5Cont7209 (B) e Ab-V5Cont7203 (C), testados contra DNAs bacterianos de estirpes não-alvo de *A. brasilense*. M- marcador 1 Kb, 1- FP2, 2- Ab-V5 (Positivo), 3- Ab-V6, 4- Sp245, 5- Branco.

Para a estirpe FP2, o par de *primer* FP2Cont9982 foi o que apresentou maior especificidade dentre os *primers* desenhados para essa estirpe. Como pode ser observado na Figura 3A, ocorreu a amplificação de fragmentos de 196 pb para a estirpe-alvo e não houve amplificação para as amostras de DNA das estirpes usadas como controle negativo, exceto a estirpe Ab-V6.

O par de *primer* FP2Cont11061 foi capaz de amplificar fragmentos de 189 pb para a estirpe-alvo. Os fragmentos de DNA amplificados para as estirpes controle Ab-V5 e Sp245 também foram de mesmo tamanho (Figura 3B).

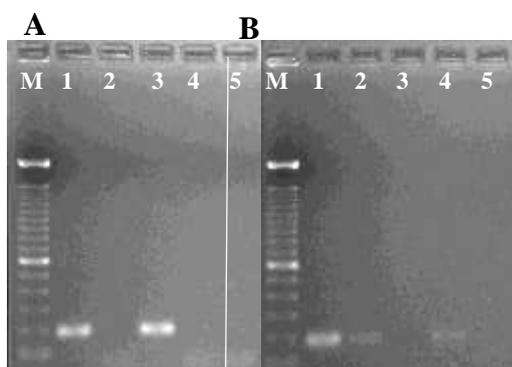


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR da amostra de DNA da estirpe FP2 ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando os pares de *primer* FP2Cont9982 (A) e FP2Cont11061 (B), testados contra DNAs bacterianos de estirpes não-alvo de *A. brasilense*. M- marcador 1 Kb, 1- FP2 (Positivo), 2- Ab-V5, 3- Ab-V6, 4- Sp245, 5- Branco.

Os pares de *primer* FP2p1 e FP2p1.1 foram desenhados para amplificarem fragmentos de DNA da estirpe FP2 de mesmo tamanho (ANEXO D) e não apresentaram amplificações bem-sucedidas na região esperada (fragmentos de 172 pb) para a estirpe alvo e nem para estirpes usadas como controle negativo (Figura 4). Portanto, ambos os pares de *primer* não puderam ser utilizados para as análises posteriores.

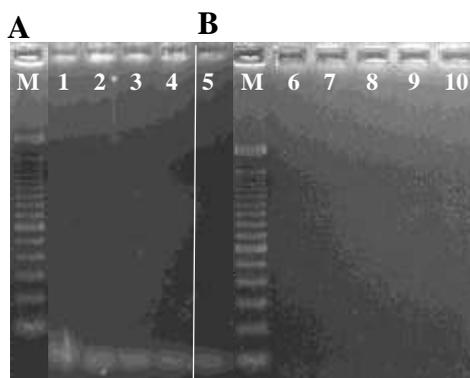


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR da amostra de DNA da estirpe FP2 ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando os pares de *primer* FP2p1 (A) e

FP2p1.1 (B), testados contra DNAs bacterianos de estirpes não-alvo de *A. brasilense*. M- marcador 1 Kb, 1- FP2 (Positivo), 2- Ab-V5, 3- Ab-V6, 4- Sp245, 5- Branco.

Entre os pares de *primer* desenhados para a estirpe Sp245, os pares Sp245p10 e Sp245Plasm1 apresentaram perfis de amplificação semelhantes. Ambos mostraram amplificação específica para a estirpe-alvo, nas regiões esperadas de fragmentos de 203 e 171, respectivamente e ausência de amplificação nos controles (Figura 5). Os dois pares de *primer* foram os mais específicos em nível de estirpe, entre todos os 11 pares de *primers* desenhados para *A. brasilense*, por apresentarem a amplificação positiva apenas para a estirpe-alvo, Sp245, com base nas estirpes testadas.

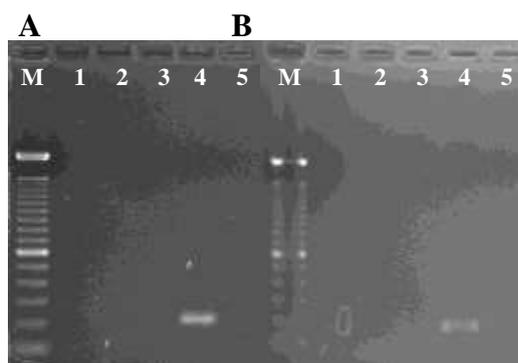


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA da estirpe Sp245 ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando os pares de *primer* Sp245p10 (A) e Sp245Plasm1 (B), testado contra DNAs bacterianos de estirpes não-alvo de *A. brasilense*. M- marcador 1 Kb, 1- FP2, 2- Ab-V5, 3- Ab-V6, 4- Sp245 (Positivo), 5- Branco.

O par de *primer* Sp245p5 foi capaz de amplificar fragmentos de 201 pb a partir do DNA da estirpe-alvo (Figura 6A). Porém, notou-se que a amplificação também ocorreu para todas as estirpes controle em fragmentos de DNA menores, que pode significar que ocorreu o anelamento do *primer* em outra região do genoma.

O par de *primer* Sp245p9 mostrou a amplificação de fragmentos de DNA desejado (214 pb) para a estirpe Sp245 e todas as estirpes controle (Figura 6B). Dessa forma, os dois *primers* não puderam ser utilizados nas análises posteriores.

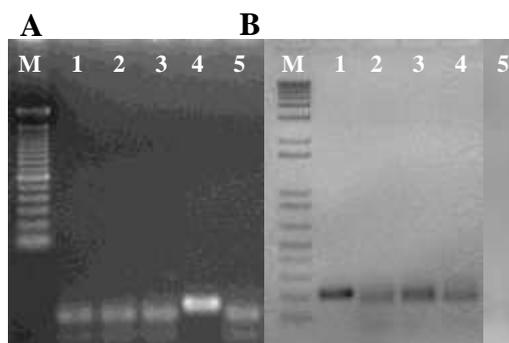


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA da estirpe Sp245 ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando os pares de *primer* Sp245p5 (A) e Sp245p9 (B), testado contra DNAs bacterianos de estirpes não-alvo de *A. brasilense*. M- marcador 1 Kb, 1- FP2, 2- Ab-V5, 3- Ab-V6, 4- Sp245 (Positivo), 5- Branco.

4.1.2 Teste estirpe-específico dos *primers* desenhados para *H. seropedicae* ZAE94

O DNA genômico de três estirpes de *H. seropedicae*; ZAE67, HRC80 e HS4 foram usados como molde na reação de PCR para avaliar a especificidade dos *primers* desenhados para *H. seropedicae* ZAE94. Dois pares de *primer*; ZAEF1R1 e ZAEF2R2, após os testes de especificidade, foram selecionados para serem usados nas análises seguintes (Tabela 5).

Para o par de *primer* ZAECont2219, foi apenas realizada sua avaliação espécie-específica, utilizando o DNA genômico da estirpe ZAE94 e de quatro estirpes de *A. brasilense*; Ab-V5, FP2, Sp245 e Ab-V6, como controles negativos. A Figura 7 mostrou os resultados da amplificação bem-sucedida do par de *primer* em fragmentos de DNA esperados (180 pb) para a estirpe ZAE94. Pode-se observar também a amplificação inespecífica com o DNA genômico dos controles negativos em fragmentos menores, que pode ser devido a formação de dímeros de *primer*. Dessa forma, o par ZAECont2219 não foi usado nas análises seguintes.



Figura 7: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA da estirpe ZAE94 ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando o par de *primer* ZAECont2219, testado contra DNAs bacterianos de outras estirpes de *A. brasilense*. M- marcador 1 Kb, 1- ZAE94 (Positivo), 2- FP2, 3- Ab-V5, 4- Ab-V6, 5- Sp245, 6- Branco.

No que se refere aos pares de *primer* ZAEF1R1 e ZAEF2R2, os testes estirpe-específicos foram realizados utilizando o DNA genômico da estirpe-alvo de ZAE94 e de três outras estirpes de *H. seropedicae* como controle negativo da reação de PCR (Tabela 3).

Os pares de *primer* apresentaram perfis de amplificação semelhantes e foram os mais específicos em nível de estirpe, dentre os *primers* desenhados para *H. seropedicae* ZAE94, com base nas estirpes testadas. Ambos mostraram amplificação exclusiva de fragmentos de DNA de 193 e 196 pb, respectivamente para a estirpe-alvo e não ocorreu a amplificação para as outras estirpes de *H. seropedicae* como observado na Figura 8.

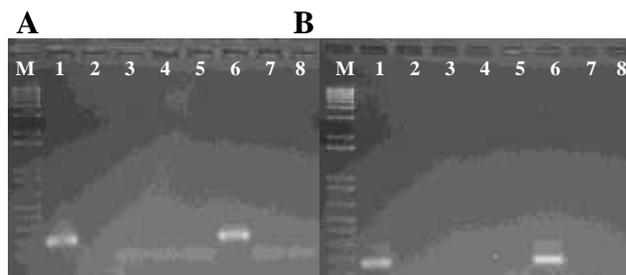


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR da amostra de DNA da estirpe ZAE94 ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) utilizando os pares de *primer* específicos ZAECont2223F1R1 (A) e ZAECont2223F1R1 (B), testado contra DNAs bacterianos de outras estirpes de *H. Seropedicae*. M- marcador 1 Kb, 1- ZAE94 (Positivo), 2- HCC103, 3- ZAE67, 4- ZAE67, 5- HRC80, 6- ZAE94 (Positivo), 7- HS4, 8- Branco.

4.2 Avaliação e seleção de *primers* específicos em nível de espécie

Para ampliar a avaliação da eficiência e especificidade dos *primers* desenhados para as estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* selecionados anteriormente, foram realizados os testes espécie-específicos utilizando PCR convencional. Foram consideradas as amplificações positivas dos *primers* em fragmentos esperados de DNA para as estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* usadas e a ausência de amplificação cruzada com o DNA de estirpes de outras espécies e gêneros avaliados. As quantidades de reagentes e condições da reação da PCR para cada *primer* foram as mesmas descritas no ANEXO E. Após as análises, não foi encontrado nenhum *primer* espécie-específico.

4.2.1 Teste espécie-específico dos *primers* desenhados para *Azospirillum brasilense*

Os *primers* desenhados para as estirpes de *A. brasilense* selecionados no item 4.1.1 foram testados utilizando o DNA genômico de sete estirpes de *A. brasilense* e dez estirpes de outras espécies, descritas na Tabela 2, foram usados como molde para as reações de PCR.

O par de *primer* Ab-V5p1 não foi considerado espécie-específico, pois não apresentou especificidade exclusiva para *A. brasilense*, uma vez que ocorreu a amplificação de fragmentos de DNA em regiões de genoma de estirpes de outras espécies como *Roseomonas fauriae*, *Herbaspirillum seropedicae*, *Nitrosomonas amazonense* e *Azospirillum lipoferum* (Figura 9). Dessa forma o par de *primer* foi desconsiderado para as posteriores análises.

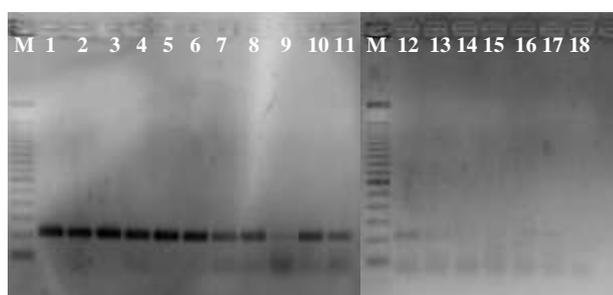


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de *A. brasilense* e de estirpes de outras espécies de bactéria ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando o par de *primer* Ab-V5p1. M- marcador 1 Kb, 1- Ab-V5 (Positivo), 2- Sp245 (*A. brasilense*), 3- NH (*A. brasilense*), 4- C610 (*R. fauriae*), 5- Sp7 (*A. brasilense*), 6- Sp245 (*A. brasilense*), 7- Z67 (*H. seropedicae*), 8- Y1 (*N. amazonense*), 9- Sp80 (*A. lipoferum*), 10- Azb12 (*A. brasilense*), 11- Sp204 (*A. lipoferum*), 12- Azb60 (*A.*

brasiliense), 13- HCC103 (*H. seropedicae*), 14- Pal5 (*G. diazotrophicus*), 15- CbAmc (*N. amazonense*), 16- HRC54 (*H. seropedicae*), 17- PPe8 (*P. tropica*), 18- Branco.

O par de *primer* FP2Cont11061, desenhado para a estirpe FP2, também não mostrou especificidade em nível de espécie, pois não apresentou a amplificação positiva dos fragmentos de DNA genômico para todas as estirpes de *A. brasiliense* testadas, embora tenha apresentado a ausência de ampliações inespecíficas com o DNA de estirpes de outras espécies. Observou-se na Figura 10 que, além da FP2, a amplificação positiva ocorreu para mais duas estirpes (Ab-V6 e NH) de *A. brasiliense*.



Figura 10: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de *A. brasiliense* e de estirpes de outras espécies de bactéria ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando o par de *primer* FP2Cont11061. M- marcador 1 Kb, 1- FP2 (Positivo), 2- Ab-V6 (*A. brasiliense*), 3- Sp7 (*A. brasiliense*), 4- Sp245 (*A. brasiliense*), 5- NH (*A. brasiliense*), 6- Azb60 (*A. brasiliense*), 7- Azb12 (*A. brasiliense*), 8- Sp204 (*A. lipoferum*), 9- PPe8 (*P. tropica*), 10- HCC103 (*H. seropedicae*), 11- Pal5 (*G. diazotrophicus*), 12- CbAmc (*N. amazonense*), 13- HRC54 (*H. seropedicae*), 14- C610 (*R. fauriae*), 15- Y1 (*N. amazonense*), 16- Sp80 (*A. lipoferum*), 17- Z67 (*H. seropedicae*), 18- Branco.

O par FP2Cont9982 apresentou perfil de amplificação semelhante ao par de *primer* FP2Cont11061 e também não foi considerado espécie-específico. De acordo com a Figura 11, notou-se a amplificação bem-sucedida do *primer* para fragmentos de DNA das estirpes Ab-V5 e Sp7 de *A. brasiliense* e ausência de ampliações cruzadas com o DNA genômico de estirpes de outras espécies e gêneros.



Figura 11: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de *A. brasiliense* e de estirpes de outras espécies de bactéria ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando o par de *primer* FP2Cont9982. M- marcador 1 Kb, 1- FP2 (Positivo), 2- Sp245 (*A. brasiliense*), 3- Ab-V5 (*A. brasiliense*), 4- Ab-V6 (*A. brasiliense*), 5- Sp246 (*A. brasiliense*), 6- Sp7 (*A. brasiliense*), 7- Sp245 (*A. brasiliense*), 8- NH (*A. brasiliense*), 9- Azb60 (*A. brasiliense*), 10- Azb12 (*A. brasiliense*), 11- Sp204 (*A. lipoferum*), 12- C610 (*R.*

fauriae), 13- Y1 (*N. amazonense*), 14- Sp80 (*A. lipoferum*), 15- Z67 (*H. seropedicae*), 16- CbAmc (*N. amazonense*), 17- HRC54 (*H. seropedicae*), 18- HCC103 (*H. seropedicae*), 19- PPe8 (*P. tropica*), 20- Pal5 (*G. diazotrophicus*), 21- Branco.

Com relação ao par de *primer* Sp245p10, o mesmo não mostrou especificidade em nível de espécie, porque ocorreu a amplificação apenas dos fragmentos de DNA genômico da estirpe-alvo Sp245 de *A. brasilense* (Figura 12). O resultado obtido é excelente, pois corroborou com a avaliação de especificidade em nível de estirpe realizada anteriormente, em que foi amplificado somente fragmentos de DNA da estirpe Sp245 na região esperada, com base nas estirpes testadas.



Figura 12: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de *A. brasilense* e de estirpes de outras espécies de bactéria ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando o par de *primer* Sp245p10. M- marcador 1 Kb, 1- Sp245 (Positivo), 2- Sp7 (*A. brasilense*), 3- Sp245 (Positivo), 4- NH (*A. brasilense*), 5- Azb60 (*A. brasilense*), 6-Azb12 (*A. brasilense*), 7- Sp204 (*A. lipoferum*), 8-HCC103 (*H. seropedicae*), 9- CbAmc (*N. amazonense*), 10-PPe8 (*P. tropica*), 11-Pal5 (*G. diazotrophicus*), 12-HRC54 (*H. seropedicae*), 13- C610 (*R. fauriae*), 14- Y1 (*N. amazonense*), 15- Sp80 (*A. lipoferum*), 16-Z67 (*H. seropedicae*), 17- Branco.

A especificidade em nível de espécie também não foi considerada para o par Sp245Plasm1, pois não apresentou a amplificação de fragmentos de DNA genômico de todas as estirpes de *A. brasilense*. Na Figura 13 pode ser observado o resultado da amplificação positiva utilizando o par de *primer* Sp245Plasm1 para a maioria das estirpes de *A. brasilense*, exceto para as estirpes Ab-V5, FP2 e Ab-V6 além de ausência de amplificações cruzadas com o DNA de estirpes de outras espécies e gêneros.

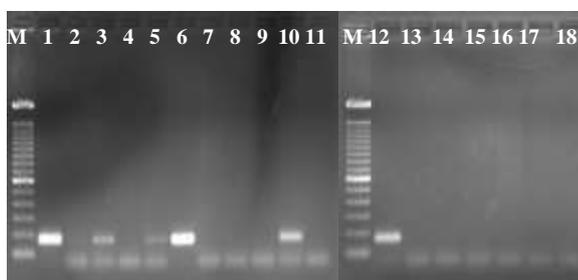


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de *A. brasilense* e de estirpes de outras espécies de bactéria ($2 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$), utilizando o par de *primer* Sp245Plasm1. M- marcador 1 Kb, 1- Sp245 (Positivo), 2- Ab-V5 (*A. brasilense*), 3- NH (*A. brasilense*), 4- C610 (*R. fauriae*), 5- Sp7 (*A. brasilense*), 6- Sp245 (Positivo), 7- Z67 (*H. seropedicae*), 8- Y1 (*N. amazonense*), 9- Sp80

(*A. lipoferum*), 10- Azb12 (*A. brasilense*), 11- Sp204 (*A. lipoferum*), 12- Azb60 (*A. brasilense*), 13- HCC103 (*H. seropedicae*), 14- Pal5 (*G. diazotrophicus*), 15- CbAmc (*N. amazonense*), 16- HRC54 (*H. seropedicae*), 17- PPe8 (*P. tropica*), 18- Branco.

A avaliação de especificidade dos *primers* mostrou que, em nível de estirpe, os pares Sp245Plasm1, FP2Cont11061 e FP2Cont9982 não apresentaram amplificação positiva apenas do fragmento de DNA de suas respectivas estirpes-alvo. Porém, esses três pares de *primer* também não foram considerados espécie-específicos, uma vez que, não ocorreu a amplificação de fragmentos de DNA genômico de todas as estirpes da mesma espécie *Azospirillum brasilense*.

De acordo com Da silva (2017), poderiam ser feitos testes futuros com a técnica BOX-PCR em comparação com a análise de similaridade e filogenia das sequências do gene 16S rRNA, para validar a hipótese sobre a proximidade filogenética entre as estirpes-alvo e as outras estirpes-controle de *A. brasilense*, cujos fragmentos de DNA foram amplificados.

Segundo Stets (2013), outra alternativa seria o alinhamento global do genoma das estirpes-alvo com o genoma das estirpes de *A. brasilense* que também foram amplificadas para que as regiões não alinhadas fossem manualmente escolhidas e usadas para o desenho de novos *primers* mais específicos para determinada estirpe. No entanto, há necessidade do sequenciamento dos genomas de todas as estirpes de interesse.

4.2.2 Teste espécie-específico dos *primers* desenhados para *H. seropedicae* ZAE94

A avaliação espécie-específica foi realizada com os pares de *primer* ZAEF1R1 e ZAEF2R2 selecionados no item 4.1.2. Utilizou-se o DNA genômico de quatro estirpes de *H. seropedicae* e nove estirpes de outras espécies, descrito na Tabela 3, como molde para as reações de PCR.

Os dois pares de *primer* não retrataram especificidade em nível de espécie, pois apresentaram apenas a amplificação de fragmentos do DNA genômico da estirpe ZAE94 (Figura 14). Esse resultado mostra alta especificidade desses pares, visto que eles permitiram apenas a amplificação do DNA da estirpe para o qual eles foram desenhados, mesmo quando confrontados com o DNA de outras estirpes da mesma espécie. O resumo dos resultados obtidos nas avaliações dos *primers* desenhados para estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* em nível de estirpe e espécie está descrito na Tabela 6.

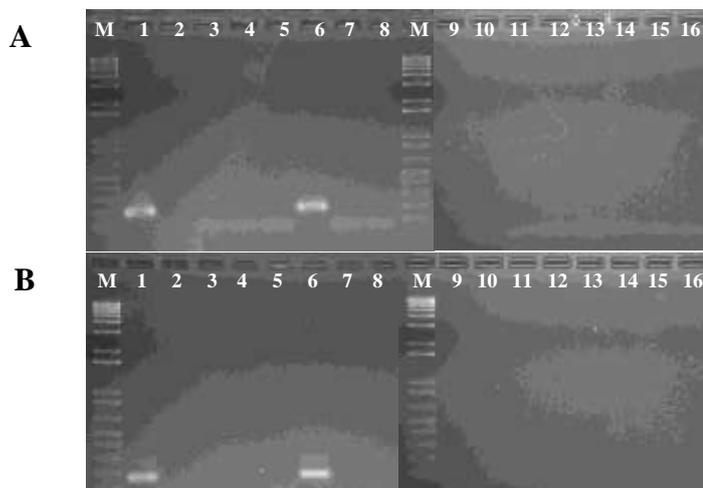


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose não desnaturante (2,0 % p/v) dos produtos de PCR das amostras de DNA bacteriano de estirpes de *H. seropedicae* e de outras espécies (2 ng μL^{-1}), utilizando os pares de *primer* específicos ZAECont2223F1R1 (A) e ZAECont2223F1R1 (B). M- marcador 1 Kb, 1- ZAE94 (Positivo), 2- HCC103 (*H. seropedicae*), 3- ZAE67 (*H. seropedicae*), 4- ZAE67 (*H. seropedicae*), 5- HRC80 (*H. seropedicae*), 6- ZAE94 (*H. seropedicae*), 7- HS4 (*H. seropedicae*), 8- Ppe8 (*P. tropica*), 9- Pal5 (*G. diazotrophicus*), 10- CbAmc (*N. amazonense*), 11- C610 (*R. fauriae*), 12- Sp204 (*A. lipoferum*), 13- Y1 (*N. amazonense*) 14- Sp80 (*A. lipoferum*), 15- Sp7 (*A. brasilense*), 16- Branco.

Tabela 6: Resultados dos testes de especificidade dos *primers* desenhados para as estirpes de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae*.

Estirpe-alvo	Estirpes	Primer	
		Ab-V5p1	
Ab-V5	Ab-V5*	+	
	FP2	+	
	Sp245	+	
	Sp7	+	
	NH	+	
	Azb60	+	
	Azb12	+	
	HCC103	-	
	ZAE67	+	
	HRC54	-	
	Ppe8	-	
	Pal5	-	
	CbAmc	-	
	Y1	+	
	C610	+	
Sp80	-		
Sp204	+		
Estirpe-alvo	Estirpes	Primer	
		FP2Cont9982	FP2Cont11061
FP2	Ab-V5	+	+
	FP2*	+	+
	Sp245	-	+
	Ab-V6	+	+
	Sp7	+	-
	NH	-	+
	Azb60	-	-
	Azb12	-	-
	HCC103	-	-
	ZAE67	-	-
	HRC54	-	-
	Ppe8	-	-
	Pal5	-	-
	CbAmc	-	-

	Y1	-	-
	C610	-	-
	Sp80	-	-
	Sp204	-	-
		<i>Primer</i>	
Estirpe-alvo	Estirpes	Sp245p10	Sp245Plasm1
Sp245	Ab-V5	-	-
	FP2	-	-
	Sp245*	+	+
	Ab-V6	-	-
	Sp7	-	+
	NH	-	+
	Azb60	-	+
	Azb12	-	+
	HCC103	-	-
	ZAE67	-	-
	HRC54	-	-
	Ppe8	-	-
	Pal5	-	-
	CbAmc	-	-
	Y1	-	-
	C610	-	-
	Sp80	-	-
Sp204	-	-	
		<i>Primer</i>	
Estirpe-alvo	Estirpes	ZAECont2223F1R1	ZAECont2223F2R2
ZAE94	ZAE94*	+	+
	ZAE67	-	-
	HRC80	-	-
	HS4	-	-
	HCC103	-	-
	Ppe8	-	-
	Pal5	-	-
	CbAmc	-	-
	Y1	-	-
	C610	-	-
	Sp80	-	-
	Sp204	-	-
Sp7	-	-	

(+) amplifica, (-) não amplifica * estirpe-alvo

Diversos autores propuseram a seleção de *primers* estirpe-específico, entretanto a maioria dos *primers* testados não apresentou especificidade a esse nível (BOA SORTE, 2013; DA SILVA, 2017; STETS, 2013). A principal dificuldade encontrada no desenho desses *primer* é definir regiões que se diferenciam entre sequências genômicas de estirpes da mesma espécie (STETS et al., 2015). Ainda não há uma definição muito bem estabelecida do que

deve ser considerado estirpe dentro de cada espécie de bactéria. Além disso, há uma grande probabilidade da mesma estirpe de bactéria ter sido isolada de plantas de diferentes espécies ou diferentes tecidos de uma mesma planta, sendo classificada com nomenclaturas distintas.

Dessa forma, a análise de especificidade de *primers* estirpe-específicos é fundamental para sua validação. Couillerot et al. (2010b) testaram a especificidade do *primer* desenhado para a quantificação em raiz de milho de *A. lipoferum* CRT1, com 34 estirpes como controle negativo, divididas em três grupos de bactérias; *A. lipoferum*, *A. brasilense* e um grupo com bactérias de rizosfera na reação de qPCR, encontrando especificidade positiva para o par de *primers* CRT1-Q1/CRT1-Q2. Faleiro et al. (2013) utilizaram a mesma estratégia, para a validação de *primers* espécie-específicos de *A. brasilense*, usados para quantificar *A. brasilense* em mudas de milho. Os testes foram realizados utilizando o DNA genômico de 13 espécies bacterianas, a maioria pertencente ao gênero *Herbaspirillum*. Os valores de Ct acima e temperatura de Melting (Tm) abaixo do encontrado para a estirpe alvo de *A. brasilense* foram pré-requisitos para considerar a ausência de amplificação não-específica dos *primers* ao se testar o DNA genômico das 13 espécies bacterianas selecionadas. Stets et al. (2015) usaram outra metodologia para validação dos pares de *primers* desenhados para a estirpe *A. brasilense* FP2, a ser quantificada em raiz de trigo. As análises de especificidade dos *primers* foram feitas através de reações de PCR convencional usando o DNA genômico de 14 bactérias, sendo 10 estirpes de *A. brasilense* e quatro de outras espécies do mesmo gênero. Foram encontrados resultados positivos para três pares de *primers*.

Diferentes estratégias já foram utilizadas para seleção e validação de *primers*. No presente trabalho, a análise de especificidade dos *primers* desenhados para estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* foi feita por PCR convencional utilizando o DNA genômico de sete estirpes de *A. brasilense* e dez estirpes de outras espécies e gêneros e três estirpes de *H. seropedicae* e nove bactérias de outras espécies, respectivamente, corroborando com a metodologia seguida por (COUILLEROT et al., 2010b; STETS et al., 2015).

4.3 Primers selecionados para qPCR

Após as análises iniciais utilizando PCR convencional, entre os *primers* desenhados para *A. brasilense*, foi selecionado o par de *primer* Sp245p10 específico para a estirpe Sp245 para ser testado por qPCR. Com relação aos *primers* desenhados para a estirpe *H. seropedicae* ZAE94, os pares de *primer* ZAEF1R1 e ZAEF2R2 foram selecionados.

As modificações feitas na quantidade de cada *primer* e temperatura de anelamento foram as mesmas seguidas para as reações de PCR convencional (ANEXO D). Foi adicionado 0,5 µL de Tween[®] 20 (2,0% v:v), com o intuito de aumentar a eficiência de amplificação dos *primers* na reação de qPCR. Esse reagente otimiza o rendimento dos produtos de qPCR, pois estabiliza a *Taq polimerase* e também pode impedir a formação de estruturas secundárias (GENE LINK[®], 2014; MCPHERSON; MØLLER, 2006).

4.3.1 Sensibilidade dos primers selecionados

A sensibilidade refere-se à capacidade que cada *primer* tem de detectar a quantidade mínima de DNA ou número de células que gere resultados positivos em pelo menos 95% das réplicas avaliadas (NUTZ; DÖLL; KARLOVSKY, 2011).

Os *primers* foram desenhados de forma que se anelassem em apenas uma região do genoma das estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae*. Dessa forma, o número de cópias do fragmento amplificadas pôde ser convertido em número de genomas ou células bacterianas, de modo que não fosse inferior ao limite de detecção (FVM, 2015).

A sensibilidade de cada par de *primer* selecionado foi avaliada a partir da reação de qPCR em que a quantidade de DNA genômico utilizada variou de 0,0001 a 10 ng 15 μL^{-1} (0,67 a 0,0000067 ng μL^{-1}), para o par de *primer* Sp245p10. Para os pares de *primer* ZAEF1R1 E ZAEF2R2 a variação foi de 0,00001 a 10 ng 15 μL^{-1} (0,67 a 0,00000067 ng μL^{-1}). Recomenda-se o uso aproximado de 0,1 a 1000 ng de DNA por volume final de reação de qPCR (THERMOFISHER, 2016).

O par de *primer* Sp245p10 apresentou limite de detecção para a amostra mais diluída de DNA (0,0001 ng 15 μL^{-1}), correspondendo a $1,2 \times 10^1$ cópias do fragmento de DNA alvo (Figura 15 e Tabela 7).

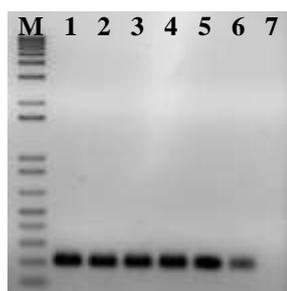


Figura 15: Gel de agarose (2% p/v) com o produto da qPCR para a curva com diluições em série do DNA genômico da estirpe-alvo do par de *primer* Sp245p10. Concentração final de cada amostra variando de 10 a 0,0001 ng 15 μL^{-1} . M- marcador 1Kb, 1- 10 ng 15 μL^{-1} , 2- 1 ng 15 μL^{-1} , 3- 0,1 ng 15 μL^{-1} , 4- 0,01 ng 15 μL^{-1} , 5- 0,001 ng 15 μL^{-1} , 6- 0,0001 ng 15 μL^{-1} , 7- Branco.

Tabela 7: Número de cópias do fragmento de DNA-alvo, detectados através de qPCR com os respectivos pares de *primer* selecionados.

DNA (ng. μL^{-1})	Sp245	ZAE94	
	Sp245p10	ZAEF1R1	ZAEF2R2
$6,7 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
$6,7 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
$6,7 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
$6,7 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$
$6,7 \times 10^{-5}$	$1,2 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
$6,7 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$	$1,6 \times 10^1$
$6,7 \times 10^{-7}$	-	$1,6 \times 10^0$	$1,6 \times 10^0$

O número de cópias do gene-alvo ou da região do genoma a ser amplificado é um dos fatores que pode influenciar a sensibilidade de cada *primer*. Pereira et al. (2014) estabeleceram os melhores *primers* para quantificação da estirpe SmR1 de *H. seropedicae* com sensibilidade de até $6,0 \times 10^{-5}$ ng μL^{-1} , correspondentes a 10^1 cópias do genoma-alvo.

De acordo com Dall’asta et al. (2017), o par de *primer* HERBAS1 que quantificou o DNA de *H. seropedicae* apresentou limite de detecção de 10^1 cópias. Com relação aos pares de *primer* desenhados a partir do gene 16S rDNA, Boa Sorte et al. (2014) determinaram a amplificação de fragmentos do gene 16S rRNA de *G. diazotrophicus* com a concentração mínima de 5×10^{-9} ng μL^{-1} de DNA genômico da bactéria de interesse, equivalente a 12 cópias do fragmento de DNA alvo.

No presente trabalho o limite de detecção de 12 cópias genômicas ($6,7 \times 10^{-6}$ ng μL^{-1}) do par de *primer* Sp245p10 foi inferior ao encontrado por Pereira et al. (2014), cujo par de *primer* HERBAS1, usado para a quantificação da estirpe SmR1 de *H. seropedicae*, apresentou sensibilidade de 10 cópias genômicas. Kang et al. (2012) também encontraram limite de detecção de 5×10^{-7} ng μL^{-1} , maior do que o encontrado no presente trabalho, para o par de *primer* XOC163 específico para *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola*, agente causal da estria bacteriana. Assim como Pollard & Okubara (2019), cujo par de *primer* específico para espécie *Fusarium avenaceum* apresentou sensibilidade de $7,4 \times 10^{-7}$ ng μL^{-1} , porém, para o presente trabalho, o limite de detecção encontrado foi considerado satisfatório.

Os pares de *primer* ZAEF1R1 e ZAEF2R2, desenhados para a estirpe *H. seropedicae*, tiveram sensibilidade para amplificar até 0,00000067 ng de DNA por μL de reação para a amostra mais diluída, correspondente a 2 células μL^{-1} de reação (Figura 16 e Tabela 7). O limite de detecção encontrado para os pares de *primer* mencionados foi superior ao encontrado por Da silva (2017), cujo par de *primer* NaCbCgyrA, estirpe-específico para *Nitrospirillum amazonense* CbAmc, apresentou amplificação para uma concentração de até 0,00000067 ng μL^{-1} .

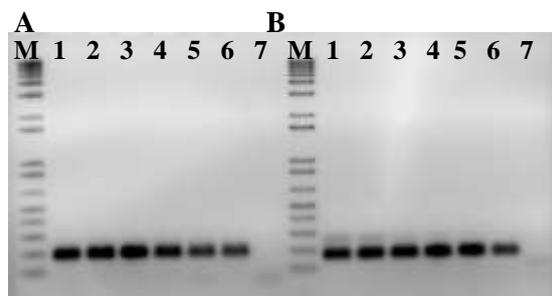


Figura 16: Gel de agarose (2% p/v) com o produto da qPCR para a curva com diluições em série do DNA genômico da estirpe-alvo dos pares de *primer* ZAEF1R1 (A) e ZAEF2R2 (B). Concentração final de cada amostra variando de 10 a 0,0001 ng $15 \mu\text{L}^{-1}$. M- marcador 1Kb, 1- 10 ng $15 \mu\text{L}^{-1}$, 2- 1 ng $15 \mu\text{L}^{-1}$, 3- 0,1 ng $15 \mu\text{L}^{-1}$, 4- 0,01 ng $15 \mu\text{L}^{-1}$, 5- 0,001 ng $15 \mu\text{L}^{-1}$, 6- 0,0001 ng $15 \mu\text{L}^{-1}$, 7- Branco.

A análise de sensibilidade dos *primers* selecionados mostrou que os pares ZAEF1R1 e ZAEF2R2 apresentaram maior sensibilidade à reação de qPCR em relação ao par de *primer* Sp245p10. Ambos apresentaram amplificação de DNA em uma concentração mínima de $6,7 \times 10^{-7}$ ng μL^{-1} , correspondente a 2 células μL^{-1} de reação, comparado ao limite de detecção de 12 células μL^{-1} de reação encontrado para o par de *primer* Sp245p10 (Tabela 7).

Resultado semelhante foi encontrado por Kang et al. (2012), cujo limite de detecção foi de $5,0 \times 10^{-7}$ ng μL^{-1} para o par de *primer* XOC163, específico para *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*. Assim como Pollard & Okubara (2019), que observaram sensibilidade de $7,4 \times 10^{-7}$ ng μL^{-1} para par de *primer* específico da espécie *Fusarium avenaceum*.

4.3.2 Eficiência de amplificação e coeficiente de determinação

A confiabilidade da curva padrão, plotada a partir dos valores de Ct (*Cycle threshold*), obtidos por qPCR, e o Log do número de cópias do fragmento de DNA de cada diluição em série da estirpe-alvo dos pares de *primer* selecionados (Figura 17), depende de que a eficiência de amplificação (E) e o coeficiente de determinação (R^2) estejam de acordo com parâmetros previamente estabelecidos.

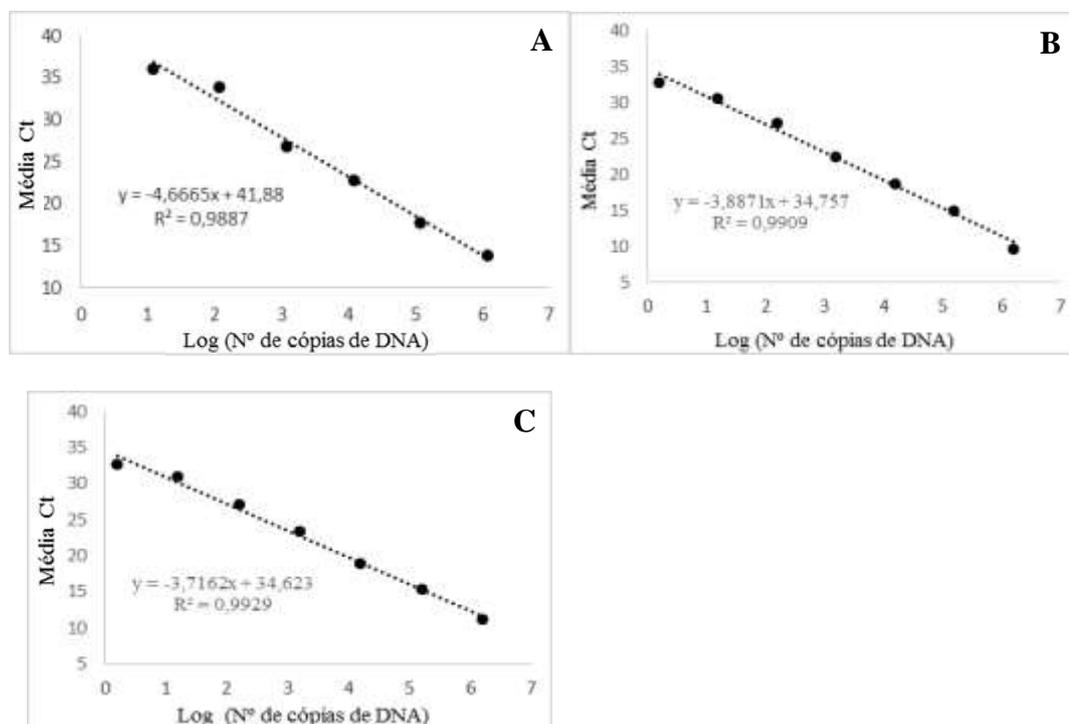


Figura 17: Curvas padrão dos pares de *primer* Sp245p10 (A), ZAEF1R1 (B) e ZAEF2R2 (C).

Segundo Zhang & Fang (2006), uma curva padrão confiável deve ter valores de R^2 acima de 0,95 e *Slope* entre -3,0 a -3,9, correspondendo a uma eficiência de 80 a 115%. O valor de R^2 é a medida que avalia a reprodutibilidade e repetitividade da reação. Torna-se importante a realização das reações de qPCR em triplicata técnica para nivelar a precisão dos dados obtidos (APPLIED BIOSYSTEMS, 2014).

Os valores encontrados para E e R^2 dos pares de *primer* selecionados para qPCR foram descritos na Tabela 8. Os pares de *primer* ZAEF1R1 e ZAEF2R2 apresentaram os melhores valores de eficiência e coeficiente de determinação, dentro dos parâmetros aceitos. Já o par Sp245p10, apresentou uma eficiência menor, apesar do valor de R^2 estar adequado (Tabela 8).

Tabela 8: Eficiência de amplificação dos pares de *primer* para uso na qPCR.

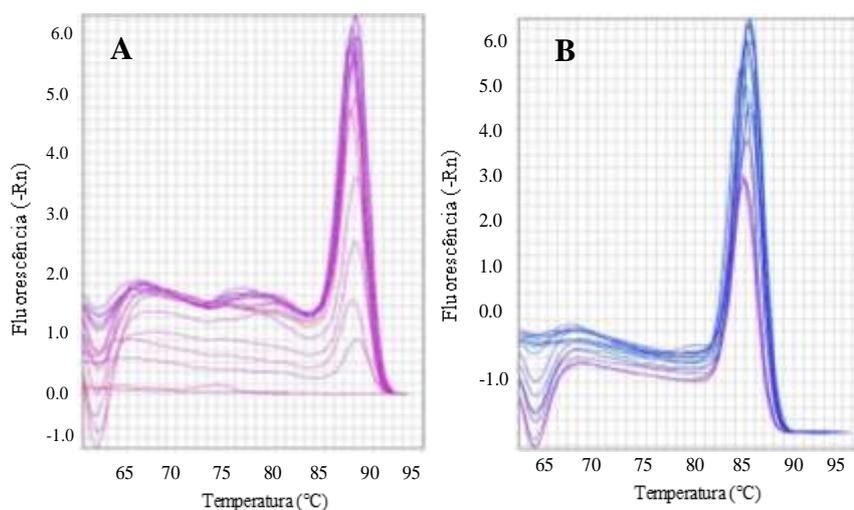
<i>Primers</i>	Ct médio de cada ponto da curva padrão							R^2	<i>Slope</i>	Eficiência (%)
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º			
Sp245p10	13,8	17,7	22,7	26,8	33,9	35,9	-	0,989	-4,66	64
ZAECont2223F1R1	9,6	14,9	18,7	22,4	27,1	30,6	32,7	0,991	-3,88	80

4.3.3 Curva de Melting

A curva de Melting é uma análise importante na qPCR para avaliar a especificidade dos *primers*. Espera-se que ocorra a formação de um pico único, com temperatura maior que 80°C, para todas as amostras de DNA, sugerindo a amplificação de apenas um fragmento, específico para a região para o qual o *primer* foi desenhado (BERGKVIST et al., 2014; NAVARRO et al., 2015). Produtos de qPCR não-específicos e dímeros de *primers* são desnaturados em temperaturas menores que as dos produtos específicos, apresentando picos distintos, diferentes do pico único desejado (RIRIE; RASMUSSEN; WITTEWER, 1997).

As curvas de Melting obtidas no presente trabalho foram construídas a partir do produto de PCR das amostras diluídas em série de 6,7 a $6,7 \times 10^{-6}$ ng μL^{-1} para o par de *primer* Sp245p10. As curvas de Melting dos pares de *primer* ZAEF1R1 E ZAEF2R2 foram construídas a partir de amostras de DNA de diluições variando de 6,7 a $6,7 \times 10^{-7}$ ng μL^{-1} .

A análise das curvas de Melting foi um critério de seleção dos *primers* quanto à especificidade. Os pares de *primer* Sp245p10, ZAEF1R1 e ZAEF2R2 apresentaram apenas um único pico principal desejado, em temperaturas entre 85 e 90°C, determinando sua especificidade (Figura 18). Já que a presença de um único pico com temperatura maior que 80°C em todas as reações de qPCR, sugere que foi amplificado apenas um fragmento de DNA (BERGKVIST et al., 2014).



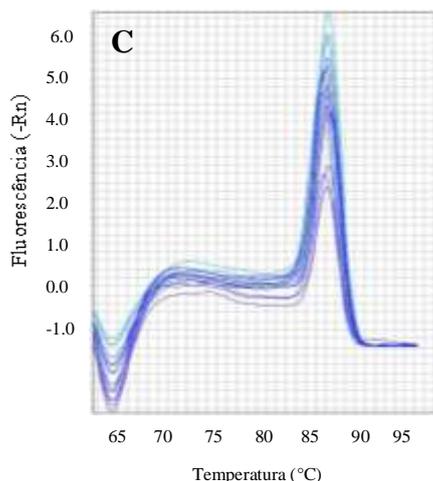


Figura 18: Curvas de Melting dos pares de *primer* Sp245p10 (A), ZAEF1R1 (B) e ZAEF2R2 (C).

O par de *primer* Sp245p10, apesar da eficiência de 58%, abaixo do recomendado, foi selecionado para a quantificação da estirpe Sp245 em tecidos de braquiária e milho, por apresentar alta especificidade em nível de estirpe, de acordo com a curva de Melting (Figura 18A) e pelos géis oriundos das reações de PCR convencional (Figuras 5A e 12).

Sugerem-se possíveis ajustes para tentar aumentar a eficiência do par de *primer*, na temperatura de anelamento, de modo que seja favorável e de acordo com a temperatura de melting (T_m) dos *primers* e na concentração dos *primers*. Ambos os fatores podem influenciar na redução de eficiência de amplificação (THERMOFISHER, 2016).

Os pares de *primer* ZAEF1R1 e ZAEF2R2 foram selecionados para a quantificação de ZAE94 em raiz de milho, pois apresentaram parâmetros de eficiência adequados (Tabela 8) e alta especificidade, após os testes por PCR convencional (Figura 8 e 14) e pela curva de melting (Figura 18B e 18C).

4.4 Curva padrão do DNA extraído de raiz e colmo de braquiária com diluições em série da estirpe-alvo *A. brasilense* Sp245 e as reações de qPCR

Uma curva padrão foi construída a partir da mistura de 100 mg do macerado de cada tecido de braquiária (colmo e raiz), adicionados a 100 μ L de cada diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}) das estirpes-alvo de *A. brasilense* (item 3.6), para simular as condições encontradas durante a extração de DNA de plantas inoculadas.

A quantificação do número de células de *A. brasilense* por grama de tecido vegetal através dessa curva foi comparada à quantificação que utilizou a curva padrão a partir da amplificação de DNA das estirpes-alvo diluídas em série com concentração final de 10 a 0,0001 ng por 15 μ L. Neste caso, foi utilizada apenas a curva padrão da estirpe Sp245 de *A. brasilense*, para a qual o par de *primer* Sp245p10 foi selecionado após os testes por qPCR (item 4.3). O N° de células g^{-1} de tecido para os primeiros pontos das curvas com colmo e raiz foi de $7,9 \times 10^8$ e $4,2 \times 10^8$ respectivamente.

A partir daí, o N° de células g^{-1} de tecido dos outros pontos foram estipulados, multiplicando esse primeiro valor pelos fatores de diluição de 10^{-1} a 10^{-5} , para cada curva de um tecido, como descrito no item 3.6. A curva padrão foi plotada, correlacionando o log 10 do N° de células g^{-1} de tecido dos pontos com as médias do valor de Ct, obtidas na qPCR (Figura 19).

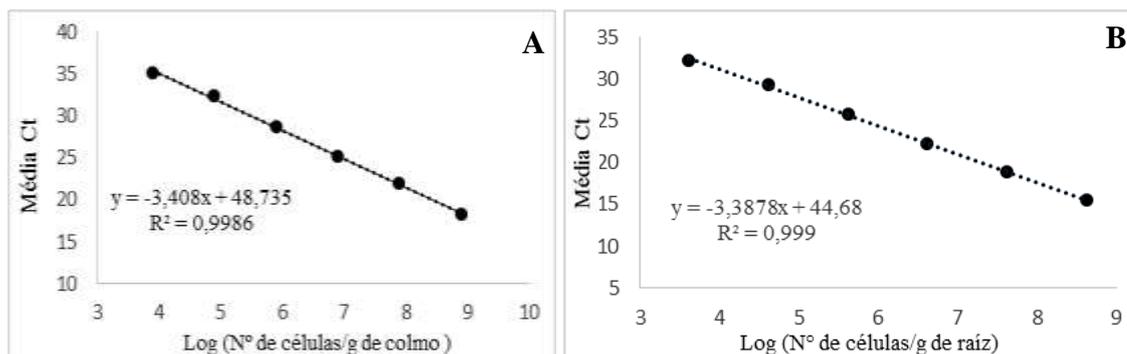


Figura 19: Curvas padrão do DNA extraído dos tecidos de colmo (A) e raiz (B) com diluições seriadas de *A. brasilense* estirpe Sp245 para o par de *primer* Sp245p10.

Os valores observados para a eficiência (E) e coeficiente de determinação (R^2) da curva padrão do DNA extraído de cada tecido vegetal (colmo e raiz) foram próximos (Tabela 9) e estão de acordo com parâmetros estabelecidos por Zhang & Fang (2006), em que uma curva padrão confiável deve apresentar valores de R^2 acima de 0,95 e eficiência de 80 a 115%. Nota-se que as eficiências foram maiores (> 96%) comparadas com a obtida na curva padrão a partir das diluições em série da estirpe Sp245 (64%).

Os resultados obtidos corroboraram com Faleiro et al. (2013) que obtiveram maior eficiência na curva-padrão a partir de diluições seriadas das estirpes FP2 de *A. brasilense* na presença de tecido de raiz de milho e Felten et al. (2010), com a estirpe Pf153 de *Pseudomonas fluorescens* adicionadas a amostras de solo da rizosfera de milho. Sugerindo que a mistura dos dois componentes pode ser mais eficiente quando, comparada à curva feita apenas com diluições seriadas isoladamente.

Tabela 9: Eficiência de amplificação do par de *primer* Sp245p10 utilizando as curvas-padrão de colmo e raiz de braquiária com diluições seriadas da estirpe-alvo Sp245 de *A. brasilense*.

Tecido vegetal	Ct médio para os pontos das curvas padrão						R^2	Slope	Eficiência (%)
	1°	2°	3°	4°	5°	6°			
Colmo	18,3	22,0	25,1	28,6	32,4	35,2	0,998	-3,408	96
Raiz	15,4	18,8	22,2	25,8	29,3	32,1	0,999	-3,388	97

4.5 Curva padrão do DNA extraído de raiz de milho com diluições em série das estirpes-alvo *A. brasilense* Sp245 e *H. seropedicae* ZAE94 e as reações de qPCR

As curvas padrão foram construídas, a partir do macerado de 100 mg de raiz de milho adicionado a 100 μ L de cada diluição seriada (10^{-1} a 10^{-5}) das estirpes-alvo Sp245 de *A. brasilense* e ZAE94 de *H. seropedicae*. O número de células de *A. Brasilense* e *H. seropedicae* por grama de tecido vegetal, obtido através de suas respectivas curvas, foi comparado à quantificação feita com a curva padrão a partir da amplificação de DNA das estirpes alvo Sp245 e ZAE94 diluídas em série, com concentrações finais de 10 a 0,0001 ng por 15 μ L e 10 a 0,00001 ng por 15 μ L, respectivamente.

Foi utilizado o par de *primer* Sp245p10, para a curva padrão de raiz de milho com diluições seriadas de sua estirpe-alvo e os pares ZAEF1R1 e ZAEF2R2, para as curvas com

diluições em série da estirpe ZAE94, selecionados no item 4.3. O N° de células por g⁻¹ de raiz, estimados para os primeiros pontos das curvas estão descritos na Tabela 10. A partir daí, o N° de células g⁻¹ de raiz dos outros pontos foram estipulados como descrito no item 4.4. As curvas padrão foram plotadas, correlacionando o Log 10 do N° de células g⁻¹ de raiz dos pontos com as médias do valor Ct, obtidas na qPCR (Figura 20).

Tabela 10: Eficiência de amplificação dos pares de *primer* Sp245p10, ZAECont2223F1R1 e ZAECont2223F2R2, utilizando as curvas padrão de raiz de milho com diluições seriadas da estirpes alvo correspondentes.

<i>Primers</i>	Ct médio para os pontos das curvas padrão						N° de células g ⁻¹ de raiz*	R ²	Slope	Eficiência (%)
	1°	2°	3°	4°	5°	6°				
Sp245p10	15,9	19,6	23,0	26,9	26,7	29,7	9,4x10 ⁸	0,950	-2,69	135
ZAEF1R1	11,9	13,9	17,8	20,5	21,7	-	4,4x10 ⁷	0,973	-2,60	142
ZAEF2R2	14,8	Log (N° de cópias de DNA) 21,1		22,6	-	-	9,7x10 ⁸	0,981	-2,60	142

*N° de células por g⁻¹ de raiz, estimado para o primeiro ponto da curvas

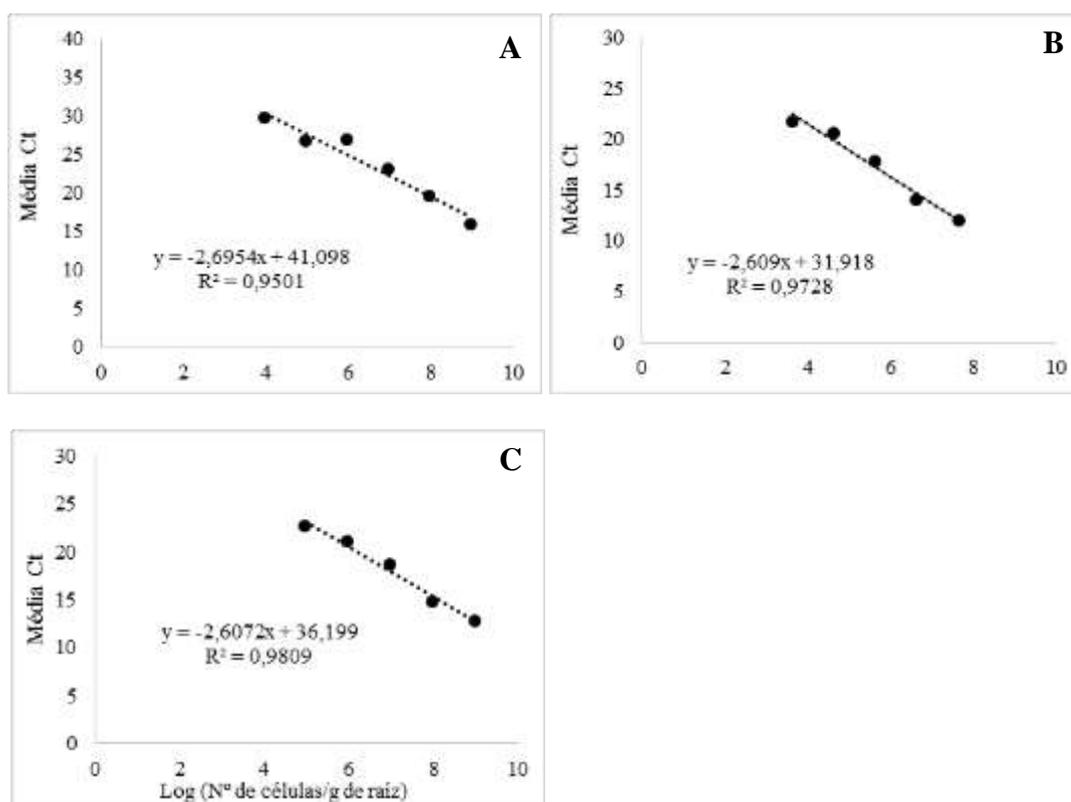


Figura 20: Curvas padrão de tecidos de raiz de milho com diluições seriadas das estirpes Sp245 para o par de *primer* Sp245p10 (A) e ZAE94, para os pares de *primer* ZAECont2223F1R1 (B) e ZAECont2223F2R2 (C).

Os valores encontrados de eficiência (E) e coeficiente de determinação (R^2) para as curvas padrão de cada par de *primer* foram descritos na Tabela 10 e não estavam de acordo com os parâmetros estabelecidos no item 4.3.2. Os valores de eficiência foram acima do recomendado (115%) e maiores do que os encontrados com a curva-padrão apenas com diluições seriadas da bactéria, 80% e 85%.

Os resultados obtidos são semelhantes aos de Cardozo (2017), que encontrou eficiência de 119% para a curva-padrão a partir de diluições seriadas da estirpe FP2 de *A. brasilense* com tecido de raiz de milho, usando o *primer* estirpe-específico AznifAF12/19. Já os coeficientes de determinação, no presente trabalho, estiveram abaixo do limite mínimo desejado (-3,0). Ambos os fatores podem ter sido influenciados por variações da pipetagem ou quantidade de DNA.

O uso de reagentes que apresentam substâncias inibidoras para a reação de qPCR também podem aumentar a eficiência de reação para valores acima de 110%. Assim como a presença de estruturas secundárias indesejáveis ou dímeros de *primers*, geralmente detectadas quando o valor de E é maior que 120% (BERGKVIST et al., 2014; THERMOFISHER, 2016). Dessa forma, a quantificação das amostras-alvo através da técnica pode ser imprecisa, caso a reação de qPCR não seja eficiente. O desenho de *primers* alternativos ou a otimização de sua concentração podem ser maneiras de melhorar a eficiência da reação (APPLIED BIOSYSTEMS, 2014).

4.6 Comparação entre as técnicas de contagem por microgota em placa e PCR em Tempo Real da estirpe *A. brasilense* Sp245

A contagem por microgota em placa, descrita no ANEXO G, foi o método utilizado para comparar com a quantificação por qPCR das estirpes de *A. brasilense* avaliadas. Apesar de terem sido desenhados diversos *primers* para cada estirpe escolhida, selecionou-se apenas o par de *primer* Sp245p10, específico para quantificar a estirpe Sp245 em tecidos de braquiária. Observou-se na Figura 21 que não houve diferença estatística entre os resultados obtidos pelas duas metodologias utilizadas. Entretanto, em valores absolutos, notou-se uma tendência da qPCR quantificar um número maior de células bacterianas do que o método da contagem por microgota, cujos valores foram 8,8 e 8,5 Log₁₀ N° de células/g de tecido, respectivamente.

A maior sensibilidade da qPCR comparada a técnica da microgota em placa, pode estar relacionada ao fato da qPCR amplificar o DNA de células mortas, vivas ou até que estão viáveis, porém não-cultiváveis. Já na técnica de microgota em placa, apenas são quantificadas as células viáveis das bactérias ali presentes (MENDIS et al., 2018).

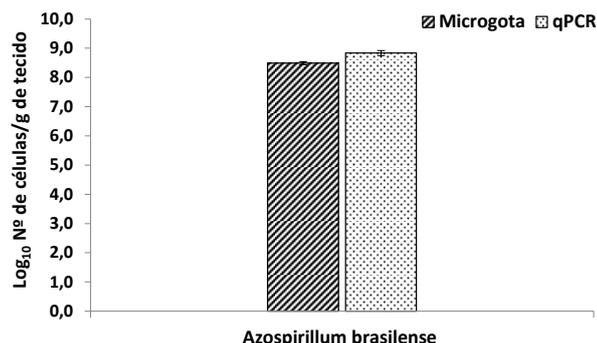


Figura 21: Comparação da quantificação da estirpe Sp245 de *A. brasilense* pelas técnicas de contagem por microgota ou por qPCR utilizando o par de *primer* Sp245p10 estirpe-específico. Os valores são as médias \pm erro padrão e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

4.7 Comparação entre as técnicas de contagem por microgota em placa e PCR em Tempo Real da estirpe *H. seropedicae*

A técnica de contagem por microgota em placa, foi realizada para se comparar com a quantificação por qPCR da estirpe ZAE94 de *H. seropedicae*. Os pares de *primer* ZAEF1R1 e ZAEF2R2, selecionados no item 4.3, foram usados para a quantificação estirpe-específica em raiz de milho.

Nota-se na Figura 22 que não houve diferença estatística entre os resultados obtidos pelas técnicas de contagem por microgota ou por qPCR, para os pares ZAEF1R1 e ZAEF2R2. A tendência de quantificação de uma maior população de bactérias pela técnica de qPCR, (8,95 Log₁₀ N° de células/g de tecido em média), em relação a contagem por microgota (7,70 Log₁₀ N° de células/g de tecido) foi observada (Figura 22), assim como no item 4.6.

A quantificação por qPCR se apresentou mais sensível, provavelmente pelo fato de que a técnica não discrimina a viabilidade das células ao amplificar o DNA de células bacterianas. Diferentemente da contagem por microgota em placa, em que se quantifica, apenas, células viáveis das bactérias presentes na amostra (MENDIS et al., 2018).

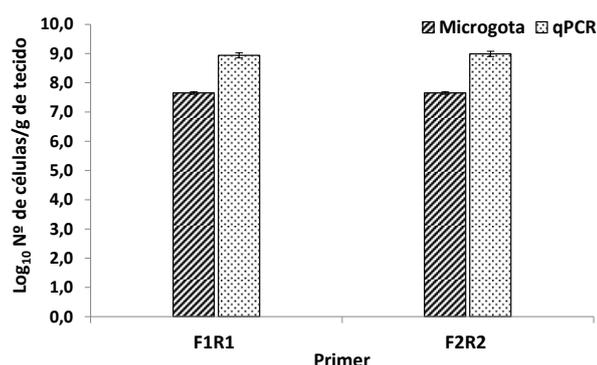


Figura 22: Comparação da quantificação da estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* pelas técnicas de contagem por microgota ou por qPCR utilizando os pares de *primer* ZAEF1R1 (ZAECont2223F1R1) e ZAEF2R2 (ZAECont2223F2R2) estirpe-específicos. Os valores são as médias \pm erro padrão e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%.

Diversos estudos têm mostrado a maior eficiência da qPCR na quantificação de bactérias em relação a contagem em placa. Mendis et al. (2018) quantificaram uma população

bacteriana de *Bacillus firmus* I-1582 maior, estatisticamente, que a determinada pela contagem por diluição em placa, em raízes de milho inoculadas com a estirpe, em diferentes coletas. Da silva. (2017) comparou as técnicas de quantificação estirpe-específica por qPCR e contagem por microgota das bactérias diazotróficas constituintes do inoculante de cana-de-açúcar usado; *H. rubrisubalbicans* HCC103, *H. seropedicae* HRC54, *G. diazotrophicus* Pal5, *N. amazonense* CbAmc e *P. tropica* Ppe8. Foi observado um maior número de bactérias das estirpes de *H. rubrisubalbicans* HCC103 e *H. seropedicae* HRC54 pela técnica de qPCR. Ilha et al. (2016), relataram maior sensibilidade da técnica de qPCR na quantificação de *Lactobacillus paracasei* em amostras de iogurte após 28 dias de fabricação, apresentando diferença significativa comparada a contagem em placa.

A técnica de qPCR é uma ferramenta eficiente e precisa na quantificação de genes alvo, tornando-se adequada para o monitoramento rápido e confiável de microrganismos *in vitro* e em ambientes naturais. (COUILLEROT et al., 2010b; FELTEN; DÉFAGO; MAURHOFER, 2010; SØRENSEN et al., 2009).

4.8 Quantificação por qPCR da estirpe Sp245 de *A. brasilense* em tecido de colmo e raiz de braquiária

Após a seleção do melhor par de *primer*, foram realizadas as reações de qPCR para a quantificação da estirpe de *A. brasilense* associada aos tecidos de colmo e raiz dos tratamentos descritos de *Brachiaria*, das variedades Paiaguás, Piatã e Basilik, inoculados com a estirpe Sp245 (inoculante CNPAB) e o controle, sem inoculação.

Os dados gerados para a quantificação de estirpe Sp245 em tecido de colmo de plantas de braquiária inoculadas com a estirpe-alvo e plantas controle, descritos na Figura 23, mostraram que as cultivares Piatã e Basilik inoculadas apresentaram maior N° de células g⁻¹ de colmo em relação às plantas controle, com diferença significativa, na quantificação pelas duas curvas-padrão estabelecidas. As médias das populações bacterianas encontradas nas cultivares Piatã e Basilik, pelas duas curvas foram 2,85 e 2,05 Log₁₀ N° de células/g de colmo, respectivamente. Esse resultado demonstra que para ambas as cultivares, a inoculação foi fundamental para aumentar a população da estirpe Sp245 em seus colmos.

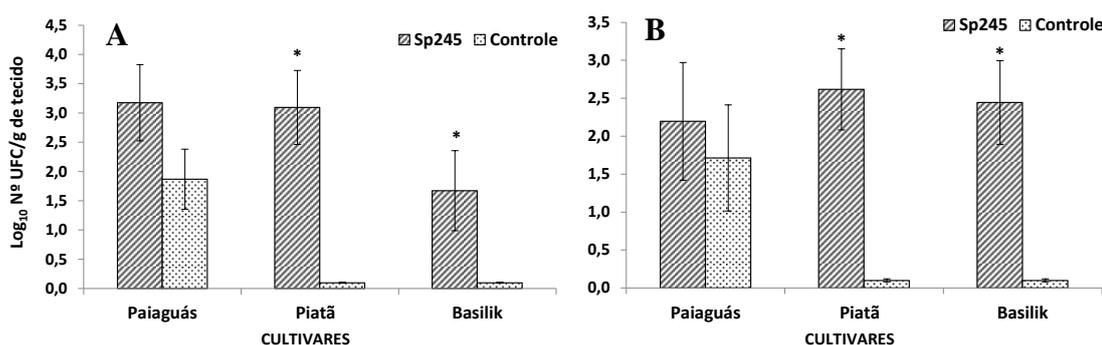


Figura 23: Quantificação da bactéria *A. brasilense* por qPCR em tecido do colmo de plantas de braquiária inoculadas com a estirpe Sp245 e de plantas controle (sem inoculação), crescidas em condições de campo. Foi utilizado o par de *primer* Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. Os valores são as médias ± erro padrão e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. O * indica diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05).

A quantificação de bactérias no colmo das plantas inoculadas da cultivar Paiaguás não apresentou diferença significativa em relação às plantas controle, pelas duas curvas-padrão usadas (Figura 23). Entretanto, a maior população bacteriana presente nas plantas controle foi detectada, por ambas as curvas utilizadas, na cultivar Paiaguás (Figura 24). Esses resultados sugerem que: i) a cultivar Paiaguás apresenta uma maior população bacteriana endógena nativa da estirpe Sp245 ou ii) a cultivar Paiaguás demonstra um alto grau de afinidade com a estirpe Sp245, já que na ausência de inoculação as plantas controle permitiram a associação com a comunidade bacteriana oriunda do solo, uma vez que a composição da microbiota presente na rizosfera é influenciada pelo genótipo das plantas (BULGARELLI et al., 2013; CHAPARRO et al., 2013; RAYNAUD; JAILLARD; LEADLEY, 2008).

A variação do número de bactérias quantificadas por qPCR em diferentes cultivares também foi encontrada por Antonio et al. (2016), que quantificaram populações bacterianas por outro método, a técnica do Número Mais Provável (NMP). Foi realizada a contagem de bactérias diazotróficas endofíticas, presentes em tecidos de raiz e colmo de diferentes variedades de cana-de-açúcar, pelo método NMP. Observou-se, que a distribuição das espécies quantificadas variou entre as cultivares, de modo que cada uma abrigou populações bacterianas de espécies diferentes, mostrando a influência da planta na diversidade bacteriana observada.

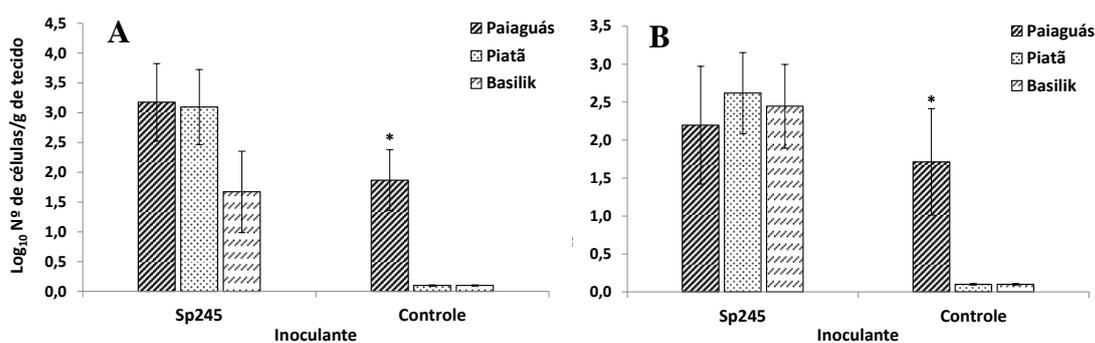


Figura 24: Quantificação da bactéria *A. brasilense* por qPCR em tecido do colmo de cultivares de braquiária inoculadas com a estirpe Sp245 ou sem inoculação (tratamento controle), crescidas em condições de campo. Foi utilizado o par de *primer* Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. Os valores são as médias \pm erro padrão e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. O * indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A quantificação da estirpe Sp245 nas raízes de braquiária apresentou diferença significativa no Nº de células bacterianas g^{-1} de tecido nas plantas inoculadas das três cultivares avaliadas pela curva-padrão feita a partir de diluições em série da bactéria (Figura 25A). No entanto, a quantificação feita através da curva-padrão obtida da mistura das diluições em série do DNA bacteriano + DNA extraído de tecido vegetal, mostrou efeito positivo da inoculação somente nas cultivares Piatã e Basilik, enquanto para Paiaguás não houve diferença entre os tratamentos (Figura 25B). A média populacional bacteriana encontrada na cultivar Basilik, pelas duas curvas-padrão foi maior (4,15 Log₁₀ Nº de células/g de raiz) em relação às plantas controle (2,25 Log₁₀ Nº de células/g de raiz).

Dessa forma, a estirpe Sp245 foi capaz de estabelecer maior nível de colonização de bactérias nas raízes das plantas inoculadas em relação às plantas controle da cultivar Basilik. Felten et al. (2010) encontraram valores semelhantes, 2×10^5 células g^{-1} de rizosfera, para a

quantificação da população bacteriana de Pf153 de *Pseudomonas fluorescens* na rizosfera de plantas inoculadas de milho em duas semanas após a inoculação. De acordo com Couillerot et al., (2010b), a população bacteriana da estirpe CRT1 de *A. lipoferum* detectada na rizosfera de plantas de milho inoculadas, via semente, em diferentes tipos de solo, variou de 10^4 a 10^6 UFC g^{-1} de raiz. Níveis semelhantes foram obtidos no presente trabalho para as cultivares inoculadas trabalhadas.

Destaca-se a eficiência das curvas usadas no trabalho (Figura 25), que possibilitaram a quantificação de uma população bacteriana próxima, em experimento de campo, ao encontrado em trabalhos realizados em casa de vegetação (Couillerot et al., 2010b; Felten et al., 2010). Deve-se considerar a dificuldade de quantificar populações bacterianas em nível de estirpe, inoculadas em plantas crescendo em condições de campo, pois a presença de bactérias no ambiente, muito próximas filogeneticamente, pode interferir na amplificação e quantificação da estirpe-alvo (STETS et al., 2015).

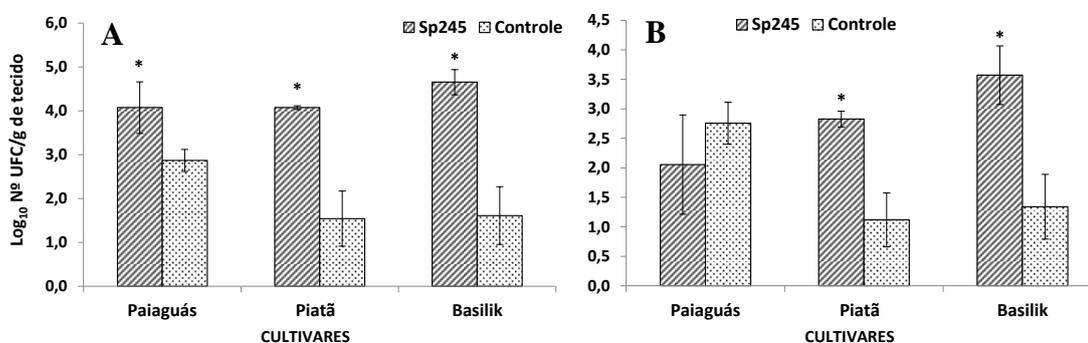


Figura 25: Quantificação da bactéria *A. brasilense* por qPCR em tecido da raiz de plantas de braquiária inoculadas com a estirpe Sp245 e de plantas controle (sem inoculação), crescidas em condições de campo. Foi utilizado o par de *primer* Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. Os valores são as médias \pm erro padrão e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. O * indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Outro dado interessante é que a população natural bacteriana detectada na raiz das plantas controle da cultivar Paiaguás apresentou médias estatisticamente maiores, comparado às outras cultivares, em ambas as curvas usadas (Figura 26). Nota-se que o número de bactérias presentes no colmo das plantas controle dessa mesma cultivar também foi maior estatisticamente em relação às outras cultivares (Figura 24). Entretanto, o valor médio das quantificações por cada curva-padrão no tecido de raiz foi maior numericamente (2,85 Log₁₀ N° de células/g de raiz) que no tecido de colmo (1,8 Log₁₀ N° de células/g de colmo), uma vez que a distribuição de bactérias endógenas não é homogênea (ANTONIO et al., 2016).

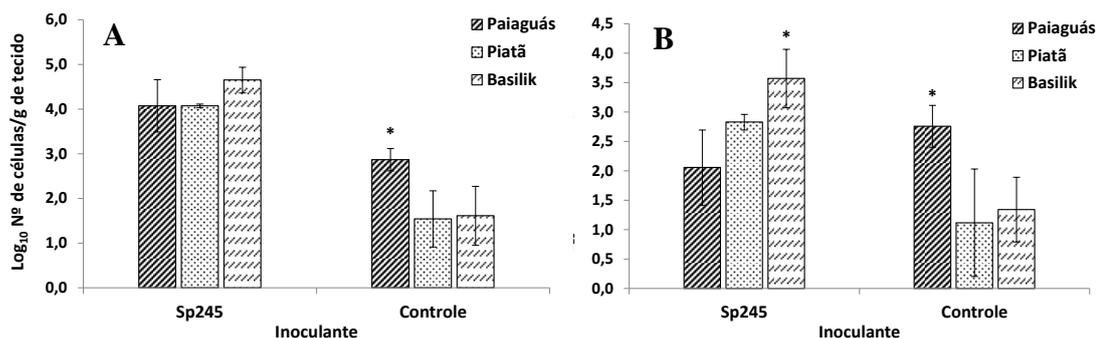


Figura 26: Quantificação da bactéria *A. brasilense* por qPCR em tecido do raiz de cultivares de braquiária inoculadas com a estirpe Sp245 ou sem inoculação (tratamento controle), crescidas em condições de campo. Foi utilizado o par de *primer* Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. Os valores são as médias \pm erro padrão e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. O * indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A comunidade bacteriana presente nas plantas inoculadas das cultivares Piatã e Basilik foi maior estatisticamente em relação às plantas controle, para os dois tecidos vegetais avaliados (Figuras 23 e 25). Porém, as médias foram maiores para a quantificação em raiz (Figura 25), que é o esperado, pois a região das raízes é o local com maior ocorrência de interações benéficas entre microrganismos e plantas, devido à forte influência da rizosfera (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; OKON, 2009).

Outro aspecto avaliado foi o comportamento populacional da estirpe Sp245 nos tecidos de colmo e raiz em cada cultivar de braquiária (Figura 27). Observou-se a diferença significativa entre a quantificação da estirpe-alvo nos dois tecidos para as cultivares Piatã e Basilik, utilizando a curva com diluições em série da bactéria. As maiores médias corresponderam ao número populacional de células em tecido de raiz para essas cultivares. A população bacteriana encontrada em tecido de raiz da cultivar Basilik (4,7 Log₁₀ N° de células/g de raiz), foi maior comparada a cultivar Piatã, 4,1 Log₁₀ N° de células/g de raiz (Figura 28A). Em relação à outra curva-padrão usada, a quantificação da estirpe-alvo em tecido de raiz foi maior, estatisticamente, apenas para a cultivar Basilik. Sua população de células foi de 3,6 Log₁₀ N° de células/g de raiz (Figura 27B), numericamente menor que a encontrada através da curva com diluições em série da bactéria.

A maior população de bactérias da estirpe Sp245 detectada na raiz das cultivares descritas em relação ao tecido de colmo corrobora o fato de que a região das raízes é o local com maior ocorrência de interações benéficas entre microrganismos e plantas (SPAEPEN; VANDERLEYDEN; OKON, 2009). A consolidação da comunidade microbiana em torno das raízes ocorre devido a condições favoráveis de pH e gradiente redox no solo, ocasionados pela rizodeposição de exudados, mucilagem e lisados de células mortas (LAREEN; BURTON; SCHÄFER, 2016; SPAEPEN; VANDERLEYDEN; OKON, 2009).

Os resultados obtidos corroboraram com Da silva (2017), que detectou por qPCR maior número de bactérias diazotróficas em raízes de cana-de-açúcar inoculadas, das variedades RB867515 e RB92579, comparado aos tecidos de parte aérea. Já Barbosa et al. (2006), Milani et al. (2011) e Antonio et al. (2016) encontraram, através da técnica do Número Mais Provável (NMP), maiores populações de bactérias diazotróficas endofíticas em raízes de cana-de-açúcar com relação a tecidos de colmo e folha.

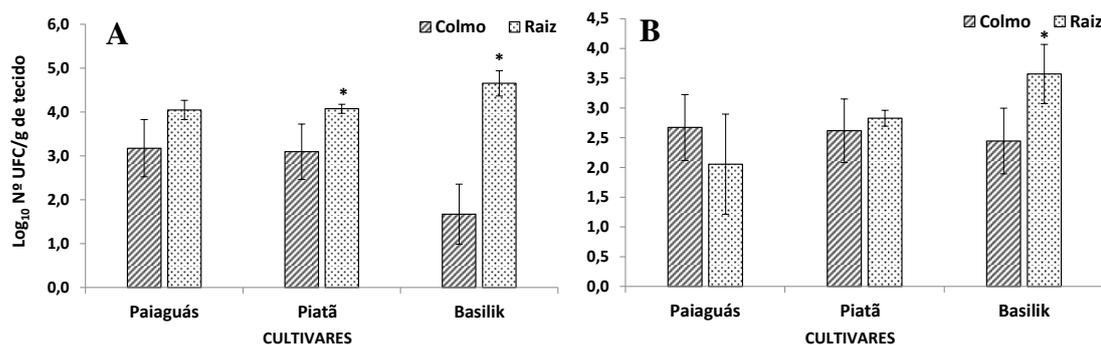


Figura 27: Quantificação da bactéria *A. brasilense* por qPCR em tecidos do colmo e da raiz de plantas de braquiária inoculadas com a estirpe Sp245, crescidas em condições de campo. Foi utilizado o par de *primer* Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. Os valores são as médias \pm erro padrão e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. O * indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Majoritariamente as médias encontradas para a quantificação através das curvas-padrão com diluições em série da estirpe Sp245 mais tecido vegetal de braquiária (colmo e raiz) foram menores que as encontradas para a curva-padrão com apenas as diluições seriadas. A adição do DNA extraído de tecido vegetal na construção da curva-padrão torna a quantificação mais próxima da realidade observada na condição experimental.

O que pode ser observado nos dados obtidos, pois não é esperado que exista uma alta população bacteriana de apenas uma espécie endofítica estabelecida nos tecidos de colmo e raiz de braquiária, em cada tratamento avaliado.

4.9 Quantificação por qPCR das estirpes Sp245 de *A. brasilense* e ZAE94 de *H. seropedicae* em raiz de milho

A quantificação da estirpe Sp245 por qPCR em raízes de milho de plantas inoculadas e plantas controle sob diferentes dosagens de N pode ser observado na Figura 28. Notou-se que a dosagem de N não alterou de forma significativa a população bacteriana dos tratamentos inoculados com a estirpe Sp245. Apenas ocorreu diferença significativa para a quantificação da estirpe-alvo associada à planta controle, para as duas curvas-padrão estabelecidas.

As maiores médias dentro do tratamento não-inoculado corresponderam ao número populacional de células presente nas plantas controle sob dosagem de 3,0 mM de N. A utilização da curva-padrão com diluições em série da bactéria, comparada à curva com adição de tecido vegetal estimou um maior número de células bacterianas, 4,9 Log₁₀ N^o de células/g de raiz (Figura 28A) e 3,7 Log₁₀ N^o de células/g de raiz (Figura 28B) respectivamente.

A aplicação de 3,0 mM de N nas plantas controle favoreceu a população bacteriana endógena nativa, uma vez que as plantas cresceram em casa de vegetação com substrato estéril. A comunidade bacteriana detectada deve ter se originado das sementes, pois é uma via de disseminação de bactérias endofíticas (JAMES et al., 1997). Segundo Adam et al. (2018), em condições axênicas de crescimento, a maioria das bactérias endofíticas encontradas em plantas são oriundas das sementes.

A influência positiva da aplicação de N mineral sob a população bacteriana endofítica também foi observada por Mosimann et al., (2017), que detectaram maior população da estirpe Pf153 de *Pseudomonas fluorescens* em raiz de plantas inoculadas de milho, cultivadas

em vaso com o solo de maior teor de N. Em plantas leguminosas é largamente conhecido o efeito deletério da aplicação de doses elevadas de N sob a eficiência da nodulação e FBN (MÜLLER; PEREIRA; MARTIN, 1993; PAMPANA et al., 2018), porém, por outro lado, pequenas doses de N podem favorecer o processo (TSAI et al., 1993). O presente trabalho mostra que a população da estirpe de *A. brasilense* não foi reduzida mesmo na presença da maior dose de N (Figura 28). Esse dado é de extrema relevância para futuras estratégias no manejo da adubação nitrogenada em lavouras de milho inoculadas com estas estirpes de bactérias diazotróficas.

A cultura do milho é extremamente exigente em nitrogênio, e resultados recentes mostram que na presença de inoculação com *A. brasilense*, o desenvolvimento de milho aumenta linearmente a função das doses de N mineral (DE OLIVEIRA; DA SILVA; TEODORO, 2017) e quando conjugada a inoculação com *Azospirillum* na semeadura + N mineral em cobertura o rendimento de grãos é semelhante ao tratamento com N mineral na semeadura e em cobertura (OLIVEIRA et al., 2018). Respostas positivas da inoculação com *A. brasilense* complementada com adubação com N mineral são observadas em outras gramíneas.

Hungria et al. (2016) constataram aumento de 23 g m⁻² no acúmulo de biomassa de *Brachiaria* spp. inoculada com estirpes de *A. brasilense* Ab-V5 e Ab-V6 associada a aplicação de 40 kg N ha⁻¹. Aguirre et al. (2018) também encontraram efeito positivo no acúmulo de parte aérea seca, ao avaliarem o rendimento da forrageira Croastcross-1 inoculada com *A. brasilense*, mesmo fertilizada com uma dosagem de 100 kg N ha⁻¹, comparado aos tratamentos controle sem inoculação. Assim como Alovizi et al. (2018), ao avaliarem o ganho de rendimento de massa seca de *B. decumbens* cv. Basilik inoculada com *A. brasilense* e associada à dosagem de N mineral.

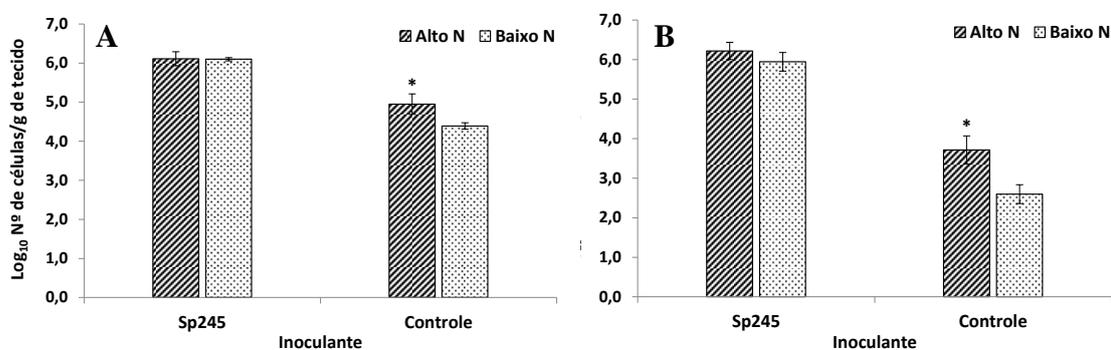


Figura 28: Quantificação da bactéria *A. brasilense* por qPCR em tecido da raiz de plantas de milho inoculadas com a estirpe Sp245 e de plantas controle (sem inoculação), crescidas em condições de casa de vegetação com substrato estéril com duas dosagens de N (3,0 e 0,3 mM). Foi utilizado o par de *primer* Sp245p10, específico para a estirpe Sp245. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. Os valores são as médias ± erro padrão e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. O * indica diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05).

A utilização do par de *primer* ZAEF1R1 para a para a quantificação da estirpe ZAE94 por qPCR em plantas de milho inoculadas com a estirpe-alvo e de plantas controle sob as duas dosagens de N, mostrou que não ocorreu diferença significativa para a quantificação da população bacteriana em nenhum dos tratamentos pelas duas curvas-padrão usadas (Figura 29). Foi observado que a dosagem de N não interferiu na população bacteriana nas plantas

inoculadas com a estirpe ZAE94, por apresentarem médias semelhantes para ambas as doses de N, assim como o ocorrido para estirpe Sp245 (Figura 28).

Em relação às plantas controle, detectou-se uma maior população de bactérias, quando aplicada a dosagem de 0,3 mM de N na planta, através das duas curvas-padrão usadas: 5,9 e 3,9 Log₁₀ N° de células/g de raiz, respectivamente. Curiosamente, as respostas para *H. seropedicae* contrariam as encontradas em *A. brasilense*. Embora sem diferença estatística, notou-se uma tendência de aumento da população de *H. seropedicae* nas plantas controle, na presença da menor dose de N mineral. O comportamento da estirpe ZAE94 de *H. seropedicae* é muito variável, pois a diferença na resposta ao N mineral, bem como à inoculação depende do genótipo (ALVES et al., 2014).

A detecção de uma maior população de bactérias nas plantas adubadas com dose de 0,3 mM de N sugere que a planta requereu um teor de N que a fertilização mineral no substrato não supriu, podendo estar disponível para a planta, através da FBN. Assim, a necessidade da planta de estabelecer associações benéficas com bactérias endofíticas nativas foi maior, em relação aos tratamentos com dosagem de 3,0 mM de N.

As interações benéficas entre plantas e microrganismos são associações, nos quais os custos e benefícios são compartilhados para ambos (BULGARELLI et al., 2013; ODUM; BARRETT, 2005). Para as bactérias diazotróficas endofíticas, a fixação de N é uma atividade com alto requisito energético, além da necessidade de competir por exsudados radiculares, fazendo com que sua capacidade de fixar quantidades significativas de N torna-se limitada (MARTÍNEZ-VIVEROS et al., 2010).

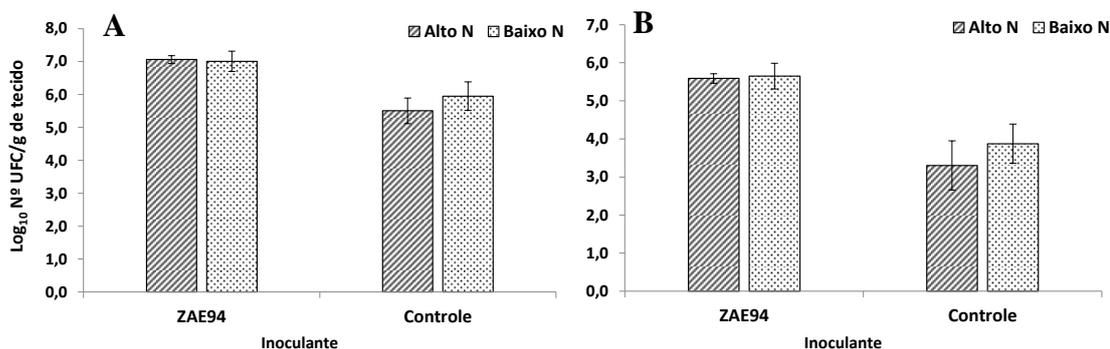


Figura 29: Quantificação da bactéria *H. seropedicae* por qPCR em tecido da raiz de plantas de milho inoculadas com a estirpe ZAE94 e de plantas controle (sem inoculação), crescidas em condições de casa de vegetação com substrato estéril com duas dosagens de N (3,0 e 0,3 mM). Foi utilizado o par de *primer* ZAECont2223F1R1, específico para a estirpe ZAE94. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. Os valores são as médias \pm erro padrão e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. O * indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A quantificação da estirpe ZAE94 por qPCR, obtida utilizando o par de *primer* ZAEF2R2, sob diferentes doses de N (Figura 30) não apresentou diferença significativa para a quantificação da população bacteriana em nenhum dos tratamentos pelas duas curvas-padrão usadas, embora com tendência de aumento da população de ZAE94 em plantas controle sob a menor dosagem de N.

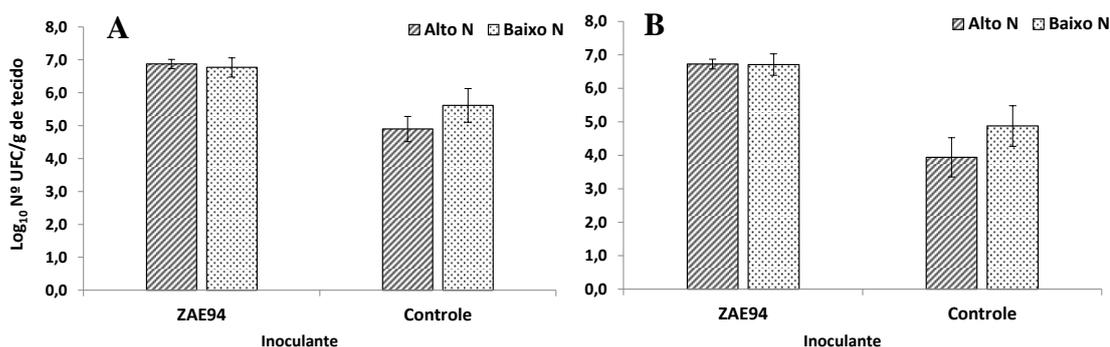


Figura 30: Quantificação da bactéria *H. seropedicae* por qPCR em tecido da raiz de plantas de milho inoculadas com a estirpe ZAE94 e de plantas controle (sem inoculação), crescidas em condições de casa de vegetação com substrato estéril com duas dosagens de N (3,0 e 0,3 mM). Foi utilizado o par de *primer* ZAECont2223F2R2, específico para a estirpe ZAE94. (A) Curva-diluições em série da bactéria, (B) Curva-diluições em série da mistura bactéria + tecido. Os valores são as médias \pm erro padrão e as barras de erro representam intervalos de confiança de 95%. O * indica diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O número de células bacterianas detectadas através dos pares de *primer* ZAEF1R1 e ZAEF2R2 foram bastante semelhantes, uma vez que ambos foram desenhados a partir dos mesmos “contigs” (ANEXO D), e provavelmente amplificam a mesma região do genoma da estirpe ZAE94, para o qual foram desenhados. Logo era esperado que tivessem padrões de quantificação semelhantes.

Após a análise dos dados estatísticos gerados observou-se que a dose de N não afetou a população bacteriana presente nos tratamentos inoculados com ambas as estirpes avaliadas. De acordo com Hanisch et al. (2017), Oliveira et al. (2007) e Brasil et al. (2005) não houve efeito significativo da aplicação de diferentes doses de N em espécies de *Brachiaria* spp. inoculadas com *A. brasilense* sobre o desempenho das forrageiras.

Outra relação estabelecida em todas as análises estatísticas avaliadas foi que a maioria das médias encontradas para a quantificação, através das curvas-padrão com diluições em série da estirpe ZAE94 mais tecido de raiz de milho, foram menores que as encontradas para a curva-padrão com apenas as diluições seriadas. O padrão de quantificação entre as duas curvas-padrão utilizadas foi semelhante ao encontrado para a estirpe Sp245 (Figura 28).

A adição do DNA extraído de tecido de raiz na construção da curva-padrão pode aumentar o limite de detecção da quantificação estirpe-específica por qPCR (COUILLEROT et al., 2010b). Isso justifica as menores médias encontradas para a quantificação das estirpes ZAE94 e Sp245, uma vez que a detecção de uma grande população bacteriana composta por uma única espécie não é esperada. Pois, a dinâmica populacional bacteriana é influenciada por fatores como o genótipo da planta e competição por exsudados radiculares.

5 CONCLUSÕES

- O par de *primer* Sp245p10, desenhado para a estirpe de *A. brasilense* Sp245 e os pares de *primer* ZAEF1R1 e ZAEF2R2, desenhados para a estirpe *H. seropedicae* ZAE94 apresentaram especificidade a nível de estirpe.
- A comparação entre a quantificação por qPCR e contagem por microgota em placa das estirpes Sp245 e ZAE94 apresentaram resultados similares.

Experimento de campo com variedades de *Brachiaria* inoculadas com estirpes de *Azospirillum brasilense*

- A quantidade de bactérias da estirpe Sp245 foi maior em plantas inoculadas de *Brachiaria decumbens* cv. Basilik e *Brachiaria brizantha* cv. Piatã, para os tecidos de colmo e raiz.
- A cultivar Basilik apresentou maior população bacteriana da estirpe Sp245 nos tecidos de raiz.
- Tecido de raiz das cultivares Piatã e Basilik tendem a apresentar população mais elevada da estirpe Sp245 do que os tecidos do colmo.

Experimento em casa de vegetação com plantas de milho inoculadas com Sp245 de *A. brasilense* e ZAE94 de *H. seropedicae* sob duas dosagens de N

- A quantidade de bactérias da estirpe Sp245 nativa foi maior nas plantas controle de milho não inoculadas sob a maior dosagem de N (3,0 mM).
- A dose de N aplicada não interferiu na população bacteriana das estirpes Sp245 no tratamento inoculado e na população da estirpe ZAE94, em ambos os tratamentos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIEC- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA EXPORTADORA DE CARNES 2018. **Exportações de carne bovina do Brasil; 2018**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/control/uploads/arquivos/sumario2019portugues.pdf>>. Acesso em: 14 maio. 2019.
- ADAM, E. et al. The Cucurbita pepo seed microbiome: genotype-specific composition and implications for breeding. **Plant and Soil**, v. 422, n. 1–2, p. 35–49, 2018.
- AGUIRRE, P. F. et al. Forage yield of Coastcross-1 pastures inoculated with *Azospirillum brasilense*. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v. 40, p. 1–8, 2018.
- AHEMAD, M.; KIBRET, M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University - Science**, v. 26, n. 1, p. 1–20, 2014.
- ALOVISI, A. M. T. et al. Evaluation of *Urochloa decumbens* cv. Basilisk in Response to Nitrogen Fertilization and Inoculation With Diazotrophic Bacterium. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 12, p. 458, 2018.
- ALVES, G. C. et al. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, n. 1–2, p. 307–321, 2014.
- ANDRADE, A. DE F. et al. *Azospirillum brasilense* inoculation methods in corn and sorghum. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, p. 1–9, 2019.
- ANDREA, M. C. DA S. et al. Variability and limitations of maize production in Brazil: Potential yield, water-limited yield and yield gaps. **Agricultural Systems**, v. 165, n. July, p. 264–273, 2018.
- ANGELIS, D. F.; VALSECHI, O. A. **II Curso de monitoramento teórico e prático da fermentação etanólica**. Disponível em: <http://www.cca.ufscar.br/~vico/2_monitoramento/apostila_1.pdf>. Acesso em: 31 out. 2019.
- ANTONIO, C. D. S. et al. Diazotrophic bacteria associated to sugarcane varieties cropped at Northeast Region of Brazil. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 11, n. 4, p. 272–280, 2016.
- ANTUNES, G. D. R. et al. Associative diazotrophic bacteria from forage grasses in the Brazilian semi-arid region are effective plant growth promoters. **Crop and Pasture Science**, v. 70, n. 10, p. 899–907, 2019.
- APPLIED BIOSYSTEMS. **Real-time PCR handbook**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/global/Forms/PDF/real-time-pcr-handbook.pdf>>. Acesso em: 2 dez. 2019.
- ARAUJO, E. DE O. et al. Diazotrophic bacteria inoculation associates with acids and nitrogen in corn. **African Journal of Plant Science**, v. 10, n. 8, p. 162–166, 2016.
- AZEVEDO, M. DE O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. DE M. Técnicas básicas em biologia molecular. p. 212, 2003.
- BALDANI, J. I. et al. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 5–6, p. 911–922, maio 1997.
- BALDANI, J. I. et al. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a Root- Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 1, p. 86–93, 1986a.

- BALDANI, J. I. et al. **Base de dados genômica de estirpes que compõem o inoculante de cana-de-açúcar e milho**. Seropédica, Rio de Janeiro, 2011. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 282).
- BALDANI, J. I. et al. The art of isolating nitrogen-fixing bacteria from non-leguminous plants using N-free semi-solid media: a practical guide for microbiologists. **Plant and Soil**, v. 384, n. 1–2, p. 413–431, 2014.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: Special emphasis on the Brazilian experience. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 77, n. 3, p. 549–579, 2005.
- BALDANI, V. L. D. et al. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. **Plant and Soil**, v. 90, n. 1–3, p. 35–46, 1986b.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 4, n. 1–2, p. 37–40, 1987.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, n. 5–6, p. 485–491, 2000.
- BALSANELLI, E. et al. *Herbaspirillum seropedicae* *rfbB* and *rfbC* genes are required for maize colonization. **Environmental Microbiology**, v. 12, n. 8, p. 2233–2244, 2010.
- BARBOSA, E. A.; PERIN, L.; REIS, V. M. Uso de diferentes fontes de carbono por estirpes de *Gluconacetobacter diazotrophicus* isoladas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 827–833, 2006.
- BARCELLOS, A. DE O. et al. Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. **Simpósio sobre Manejo da Pastagem**, v. 17, p. 297–357, 2000.
- BASTIÁN, F. et al. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. **Plant Growth Regulation**, v. 24, n. 1, p. 7–11, 1998.
- BAUDOIN, E. et al. Applicability of the 16S-23S rDNA internal spacer for PCR detection of the phytostimulatory PGPR inoculant *Azospirillum lipoferum* CRT1 in field soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 25–38, 2010.
- BEDOYA, C. A. et al. Genetic diversity and population structure of native maize populations in Latin America and the Caribbean. **PLoS ONE**, v. 12, n. 4, p. 1–21, 2017.
- BERGKVIST, A. et al. **A Technical Guide PCR TECHNOLOGIES: PCR, RT-PCR; qPCR, RT-qPCR, dPCR**. Sigma-Aldrich, 2014.
- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.
- BOA SORTE, P. M. F. **Utilização de Diferentes Técnicas para Monitorar a Colonização e Estabelecimento de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Plantas de Cana-de-açúcar**. UFRRJ, 2013.
- BOA SORTE, P. M. F. et al. Development of a real-time PCR assay for the detection and quantification of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane grown under field conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2014.
- BODDEY, R. M. et al. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: Present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 139–149, 2003.
- BODDEY, R. M.; DOBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals:

- Recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, v. 108, n. 1, p. 53–65, 1988.
- BOGDAN, A. V. **Tropical pasture and fodder plants**. Longman., 1977.
- BRASIL, M. DA S. et al. Efeitos da inoculação de bactérias diazotróficas em gramíneas forrageiras do Pantanal. **Pasturas Tropicales**, v. 27, n. 3, p. 2–77, 2005.
- BRAUN-KIEWNICK, A. et al. Development of species-, strain- and antibiotic biosynthesis-specific quantitative PCR assays for *Pantoea agglomerans* as tools for biocontrol monitoring. **Journal of Microbiological Methods**, v. 90, n. 3, p. 315–320, 2012.
- BREDA, F. A. DA F. et al. Modulation of nitrogen metabolism of maize plants inoculated with *Azospirillum brasilense* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Archives of Microbiology**, v. 201, n. 4, p. 547–558, 2019.
- BRIDGES, A. **The impact of GMO grains**. Disponível em: <<https://www.millingjournal.com/>>. Acesso em: 22 nov. 2019.
- BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. et al. Metabolic profiling of two maize (*Zea mays* L.) inbred lines inoculated with the nitrogen fixing plant-interacting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* and *Azospirillum brasilense*. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–19, 2017.
- BULEGON, L. G. et al. Physiological responses of *Urochloa ruziziensis* inoculated with *Azospirillum brasilense* to severe drought and rehydration conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, n. 10, p. 1283–1289, 2017.
- BULGARELLI, D. et al. Structure and Functions of the Bacterial Microbiota of Plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, n. 1, p. 807–838, 2013.
- CALVO, P. et al. Effect of microbial-based inoculants on nutrient concentrations and early root morphology of corn (*Zea mays*). **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 180, n. 1, p. 56–70, 2017.
- CANFIELD, D. E.; GLAZER, A. N.; FALKOWSKI, P. G. The Evolution and Future of Earth 's. **Science**, v. 330, n. 6001, p. 2–6, 2010.
- CARDOZO, A. M. **Inoculação de *Azospirillum brasilense* : efeito sobre crescimento de *Zea mays* em solo não estéril e quantificação de DNA bacteriano**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.
- CASSÁN, F. D.; OKON, Y.; CREUS, C. M. **Handbook for *Azospirillum***. Springer, 2015.
- CERRI, CARLOS CLEMENTE MOREIRA, C. S. et al. Assessing the carbon footprint of beef cattle in Brazil: a case study with 22 farms in the State of Mato Grosso. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 2593–2600, 2015.
- CHAPARRO, J. M. et al. Root Exudation of Phytochemicals in Arabidopsis Follows Specific Patterns That Are Developmentally Programmed and Correlate with Soil Microbial Functions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–10, 2013.
- COELHO, A. M. **Manejo da adubação nitrogenada na cultura do milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2007. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 96).
- CONAB- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO 2016. **Pesquisa de safras e informações geográficas da agricultura brasileira**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1534&t=2>>. Acesso em: 21 out. 2019.
- CORDIER, C. et al. SCAR-based real time PCR to identify a biocontrol strain (T1) of *Trichoderma atroviride* and study its population dynamics in soils. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 1, p. 60–68, 2007.
- COSTA, K. A. DE P.; OLIVEIRA, I. P. DE; FAQUIN, V. **Adubação Nitrogenada para Pastagens do Gênero *Brachiaria* em Solos do Cerrado**. Santo Antônio de Goás: Embrapa Arroz e Feijão , 2006. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 192).

- COUILLEROT, O. et al. Assessment of SCAR markers to design real-time PCR primers for rhizosphere quantification of *Azospirillum brasilense* phytostimulatory inoculants of maize. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 528–538, 2010a.
- COUILLEROT, O. et al. Development of a real-time PCR method to quantify the PGPR strain *Azospirillum lipoferum* CRT1 on maize seedlings. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 12, p. 2298–2305, 2010b.
- CURATTI, L.; RUBIO, L. M. Challenges to develop nitrogen-fixing cereals by direct nif-gene transfer. **Plant Science**, v. 225, p. 130–137, 2014.
- DA SILVA, C. G. **Uso da Técnica de PCR em Tempo Real para Quantificação de Bactérias Diazotróficas Endofíticas em Tecidos de Cana-de-açúcar**. UFRRJ, 2017.
- DA SILVA, M. F.; REIS, V. M. Produção, caracterização e aplicação de anticorpo policlonal contra *Azospirillum amazonense* estirpe AM15. **Bragantia**, v. 68, n. 1, p. 1–11, 2009.
- DALL’ASTA, P. et al. Tools to evaluate *Herbaspirillum seropedicae* abundance and nifH and rpoC expression in inoculated maize seedlings grown in vitro and in soil. **Plant Growth Regulation**, v. 83, n. 3, p. 397–408, 2017.
- DALL’ASTA, P. et al. *Herbaspirillum seropedicae* promotes maize growth but fails to control the maize leaf anthracnose. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 25, n. 1, p. 167–176, 2019.
- DARTORA, J. et al. Maize response to inoculation with strains of plant growth-promoting bactéria. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 7, p. 606–611, 2016.
- DAVISON, J. Plant beneficial bacteria. **Bio/technology**, v. 6, n. 3, p. 282, 1988.
- DE ARAUJO, F. F. et al. Híbridos e variedades de milho submetidos à inoculação de sementes com *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 3, p. 1043–1054, 2013.
- DE MORAIS, R. F. et al. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 23–34, 2012.
- DE OLIVEIRA, A. L. M. et al. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 59–61, 2003.
- DE OLIVEIRA, E. P.; DA SILVA, M. G.; TEODORO, P. E. Crescimento inicial do milho em função da inoculação de *Azospirillum brasilense* e doses de nitrogênio. **Bioscience Journal**, v. 33, n. 5, p. 1242–1248, 2017.
- DE SOUZA, R. S. C. et al. Unlocking the bacterial and fungal communities assemblages of sugarcane microbiome. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 30 set. 2016.
- DIAS-FILHO, M. B. **Diagnóstico das Pastagens no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos 402).
- DING, L.; YOKOTA, A. Proposals of *Curvibacter gracilis* gen. nov., sp. nov. and *Herbaspirillum putei* sp. nov. for bacterial strains isolated from well water and reclassification of *Pseudomonas huttiensis*, *Pseudomonas lanceolata*, *Aquaspirillum delicatum* and *Aquaspirillum autotrophicum* as *Herbaspirillum huttiense* comb. nov., *Curvibacter lanceolatus* comb. nov., *Curvibacter delicatus* comb. nov. and *Herbaspirillum autotrophicum* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2223–2230, 2004.
- DIXON, R.; KAHN, D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 8, p. 621–631, 2004.
- DOBBELAERE, S. et al. Effect of inoculation with wild type *Azospirillum brasilense* and *A. irakense* strains on development and nitrogen uptake of spring wheat and grain maize.

- Biology and Fertility of Soils**, v. 36, n. 4, p. 284–297, 2002.
- DOEBLEY, J. The Genetics of Maize Evolution. **Annual Review of Genetics**, v. 38, n. 1, p. 37–59, 2004.
- DOS REIS, F. B. et al. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 3, p. 1139–1146, 2008.
- DOS SANTOS, C. L. R. et al. Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 96–106, 2017.
- DOS SANTOS, P. R. et al. Desempenho de genótipos de milho (*Zea mays* L.) submetidos a dois tipos de adubação. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 1, p. 210–215, 2014.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11–15, 1987.
- ELMERICH, C. Historical Perspective: From Bacterization to Endophytes BT - Associative and Endophytic Nitrogen-fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations. In: ELMERICH, C.; NEWTON, W. E. (Eds.). **Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress**. 5. ed. Springer, 2007. p. 1–20.
- EMBRAPA- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA 2015. **Cultivo do Milho**. Disponível em: <https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemas_deproducao6_1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7905&p_r_p_-996514994_topicoId=8>. Acesso em: 21 out. 2019.
- FALEIRO, A. C. et al. Real time PCR detection targeting *nifA* gene of plant growth promoting bacteria *Azospirillum brasilense* strain FP2 in maize roots. **Symbiosis**, v. 61, n. 3, p. 125–133, 2013.
- FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. Milho: estratégias de manejo para alta produtividade. p. 208, 2003.
- FAOSTAT- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS STATISTICS 2017. **Ranking: Commodities by country**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country>. Acesso em: 21 out. 2019.
- FELTEN, A. VON; DÉFAGO, G.; MAURHOFER, M. Quantification of *Pseudomonas fluorescens* strains F113, CHA0 and Pf153 in the rhizosphere of maize by strain-specific real-time PCR unaffected by the variability of DNA extraction efficiency. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 108–115, 2010.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.
- FILHO, I. A. P.; BORGHI, E. **Sementes de Milho no Brasil – A Dominância dos Transgênicos**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2018. (Embrapa Milho e Sorgo. Documentos, 223).
- FILIPPI, M. C. C. et al. Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. **Biological Control**, v. 58, n. 2, p. 160–166, 2011.
- FISHER, M. J. .; KERRIDGE, P. C. The agronomy and physiology of *Brachiaria* species. In:

- MILES, J. W. .; MASS, B. L. D. .; VALLE, C. B. (Eds.). . **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Colombia: v. 1p. 43–52.
- FONTE, S. J. et al. Pasture degradation impacts soil phosphorus storage via changes to aggregate-associated soil organic matter in highly weathered tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 68, p. 150–157, 2013.
- FRANCHE, C.; LINDSTRÖM, K.; ELMERICH, C. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. **Plant and soil**, v. 321, n. 1–2, p. 35–59, 2009.
- FUKAMI, J. et al. Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Express**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2016.
- FURUSHITA, M. et al. Similarity of tetracycline resistance genes isolated from fish farm bacteria to those from clinical isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5336–5342, 2003.
- FVM- FDA FOODS AND VETERINARY MEDICINE. **Guidelines for the Validation of Analytical Methods for the Detection of Microbial Pathogens in Foods and Feeds**. 2015
- GENE LINK®. **PCR Additives & Enhancers**. Disponível em: <https://www.genelink.com/Literature/ps/M40-3021-PCR_Additives_Ver5.1.pdf>. Acesso em: 28 nov. 2019.
- GLOBAL MARKET INSIGHTS 2014. **Biofertilizers market size to reach \$1.66 billion by 2022USA**, 2014.
- GONZÁLEZ, A. M. . T.; MORTON, C. M. Molecular and morphological phylogenetic analysis of *Brachiaria* and *Urochloa* (Poaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 37, n. 1, p. 36–44, 2005.
- GRANATO, Í. S. C. et al. Index selection of tropical maize genotypes for nitrogen use efficiency. **Bragantia**, v. 73, n. 2, p. 153–159, 2014.
- GRAY, E. J.; SMITH, D. L. Intracellular and extracellular PGPR: Commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 395–412, 2005.
- GRUNENWALD, H. Optimization of Polymerase Chain Reactions. In: BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. (Eds.). . **Methods in Molecular Biology- PCR protocols**. 2. ed. Totowa: v. 226p. 89–99.
- GUERRERO-MOLINA, M. F. et al. Physiological, structural and molecular traits activated in strawberry plants after inoculation with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* REC3. In: **Plant Biology**. 3. ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2015. v. 17p. 766–773.
- HANISCH, A. L.; BALBINOT JR., A. A.; VOGT, G. A. Desempenho produtivo de *Urochloa brizantha* cv. Marandu em função da inoculação com *Azospirillum* e doses de nitrogênio. **Revista Agro@Mambiente on-Line**, v. 11, n. 3, p. 200, 2017.
- HILL, P. J.; STEWART, G. S. A. B. The polymerase chain reaction in molecular and microbiology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 10, n. 1, p. 343–377, 1992.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agr. Expt. Sta. Circ**, v. 347, n. 1, p. 32, 1950.
- HOWARD, J. B.; REES, D. C. NITROGENASE: A Nucleotide-Dependent Molecular Switch. **Annual Review of Biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 235–264, 1994.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1, p. 413–425, 2010.

- HUNGRIA, M. Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo. **Embrapa Soja**, v. 325, p. 36, 2011.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Soybean Seed Co-Inoculation with *Bradyrhizobium* spp. and *Azospirillum brasilense*: A New Biotechnological Tool to Improve Yield and Sustainability. **American Journal of Plant Sciences**, v. 06, n. 06, p. 811–817, 2015.
- HUNGRIA, M.; NOGUEIRA, M. A.; ARAUJO, R. S. Inoculation of *Brachiaria* spp. with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*: An environment-friendly component in the reclamation of degraded pastures in the tropics. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 221, p. 125–131, 2016.
- HUNGRIA, M.; RIBEIRO, A.; NOGUEIRA, A. Draft Genome Sequences of *Azospirillum brasilense* Strains Ab- V5 and Ab-V6, Commercially Used in Inoculants for Grasses and Legumes in Brazil. v. 6, n. 20, p. 5–6, 2018.
- IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA 2010. **Censo agropecuário**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/default_tab_censoagro.shtm>. Acesso em: 14 maio. 2019.
- IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA 2017. **Sala de imprensa**. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/16992-pecuaria-municipal-2016-centro-oeste-concentra-34-4-do-rebanho-bovino-do-pais>>. Acesso em: 6 jun. 2019.
- IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA 2019. **Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA)**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/leite/brasil>>. Acesso em: 14 maio. 2019.
- ILHA, E. C. et al. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 597–606, 2016.
- IM, W. T. et al. *Herbaspirillum chlorophenicum* sp. nov., a 4-chlorophenol-degrading bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 851–855, 2004.
- JAMES, E. K. et al. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue in leaves of *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, v. 48, n. 3, p. 785–798, 1997.
- JANK, L. et al. The value of improved pastures to Brazilian beef production. **Crop and Pasture Science**, v. 65, n. 11, p. 1132–1137, 2014.
- JOHNSON, L. A. Corn: production, processing and utilization. **Handbook of cereal Science and Technology**, p. 55–131, 1991.
- JUNG, S. Y. et al. *Herbaspirillum rhizosphaerae* sp. nov., isolated from rhizosphere soil of *Allium victorialis* var. platyphyllum. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 2284–2288, 2007.
- KANG, M. J. et al. Quantitative in planta PCR assay for specific detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* using putative membrane protein based primer set. **Crop Protection**, v. 40, p. 22–27, 2012.
- KAPPES, C. et al. Manejo do Nitrogênio em Cobertura na Cultura do Milho em Sistema Plantio Direto. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 13, n. 2, p. 201–217, 2014.
- KARIA, C. T.; DUARTE, J. B.; ARAÚJO, A. C. G. **Desenvolvimento de cultivares do gênero *Brachiaria* (trin.) Griseb. no Brasil**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2006. (Embrapa Cerrados. Documentos, 163).

- KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 1–13, 2010.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Diversity and Importance of Diazotrophic Bacteria to Agricultural Sustainability in the Tropics. In: DE AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. (Eds.). **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. [s.l.: s.n.]. p. 1–439.
- KLASSEN, G. et al. Effect of nitrogen compounds on nitrogenase activity in *Herbaspirillum seropedicae* SMRI Can. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 887–891, 1997.
- KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOVICZ, R. M. Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 2, p. 39–44, 1989.
- KUKLINSKY-SOBRAL, J. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1244–1251, 2004.
- KUMAR, B.; TRIVEDI, P.; PANDEY, A. *Pseudomonas corrugata*: A suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 3093–3100, 2007.
- LAREEN, A.; BURTON, F.; SCHÄFER, P. Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. **Plant Molecular Biology**, v. 90, n. 6, p. 575–587, 2016.
- LEITE, R. D. C. et al. Mitigation of mombasa grass (*Megathyrsus maximus*) dependence on nitrogen fertilization as a function of inoculation with *Azospirillum Brasilense*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 43, p. 1–14, 2019.
- LIN, S. Y. et al. Description of *Niveispirillum fermenti* gen. nov., sp. nov., isolated from a fermentor in Taiwan, transfer of *Azospirillum irakense* (1989) as *Niveispirillum irakense* comb. nov., and reclassification of *Azospirillum amazonense* (1983) as *Nitrospirillum amazonense* gen. nov. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 105, n. 6, p. 1149–1162, 2014.
- LINS, F. J. A. et al. Crescimento de genótipos experimentais de milho em função de doses crescentes de nitrogênio. **Revista Ciência Agrícola**, v. 15, n. 2, p. 19, 2017.
- LOPES, M. J. DOS S. et al. Effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia pyrrocinia* on the Growth Improvement and Physiological Responses in *Brachiaria brizantha*. **American Journal of Plant Sciences**, v. 09, n. 02, p. 250–265, 2018.
- LOPES, M. J. S. et al. Light and plant growth-promoting rhizobacteria effects on *Brachiaria brizantha* growth and phenotypic plasticity to shade. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 2, p. 493–499, 2017.
- LOURENTE, E. R. P. et al. Culturas antecessoras, doses e fontes de nitrogênio nos componentes de produção do milho. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 29, n. 1, p. 55–61, 2007.
- MAASS, B. L. et al. Homecoming of *Brachiaria*: Improved Hybrids Prove Useful for African Animal Agriculture. **East African Agricultural and Forestry Journal**, v. 81, n. 1, p. 71–78, 2015.
- MAGALHAES, F. M. et al. New acid-tolerant *Azospirillum* species. **Anais-Academia Brasileira de Ciências**, 1983.
- MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da Produção de Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 76).
- MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO 2019. **Agropecuária brasileira em números**. Disponível em:

- <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros?fbclid=IwAR2g8qiy6aRdXqy2DmSjyITgeHTJgR1iMnuN9MBxkHG4N5IuCoWFgTqp9K0>>. Acesso em: 23 nov. 2019.
- MARKS, B. B. et al. Maize growth promotion by inoculation with *Azospirillum brasilense* and metabolites of *Rhizobium tropici* enriched on lipo-chitooligosaccharides (LCOs). **AMB Express**, v. 5, 2015.
- MARQUES, A. C. R. et al. Biological nitrogen fixation in C4 grasses of different growth strategies of South America natural grasslands. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 54–62, maio 2017.
- MARTHA JR, G. B. et al. Pecuária de corte no Cerrado: uma visão conjuntural. **Uso Eficiente de Fertilizantes em Pastagens no Cerrado**. Planaltina: Embrapa Cerrados, p. 43–64, 2006.
- MARTÍNEZ-VIVEROS, O. et al. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by Rhizobacteria. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 293–319, 2010.
- MARTINI, M. et al. Quantitative real-time PCR and high-resolution melting (HRM) analysis for strain-specific monitoring of fluorescent pseudomonads used as biocontrol agents against soil-borne pathogens of food crops. **Trends in Food Science and Technology**, v. 46, n. 2, p. 277–285, 2015.
- MARTINS, M. R. et al. Impact of plant growth-promoting bacteria on grain yield, protein content, and urea-15 N recovery by maize in a Cerrado Oxisol. **Plant and Soil**, v. 422, n. 1–2, p. 239–250, 2017.
- MCPHERSON, M. J.; MØLLER, S. G. **PCR- Second Edition**. Taylor & Francis Group In, 2006.
- MEHNAZ, S. *Azospirillum*: A Biofertilizer for Every Crop. In: N., A. (Ed.). **Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets**. New Delhi: Springer, New Delhi, 2015. p. 297–314.
- MENDIS, H. C. et al. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–19, 2018.
- MILANI, K. M. L.; MACHINESKI, O.; BALOTA, E. L. Ocorrência E Isolamento De Bactérias Diazotróficas Associadas À Cana-De-Açúcar. **Enciclopédia Biosfera**, v. 7, n. 13, p. 1345–1351, 2011.
- MONTEIRO, R. A. et al. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 932–937, 2008.
- MONTEIRO, R. A. et al. *Herbaspirillum*-plant interactions: Microscopical, histological and molecular aspects. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 175–196, 2012.
- MOREIRA, F. M. DE S. et al. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v. 1, n. 2, p. 74–100, 2010.
- MORUZZI, S. et al. Genomic-assisted characterisation of *Pseudomonas* sp. strain Pf4, a potential biocontrol agent in hydroponics. **Biocontrol Science and Technology**, v. 27, n. 8, p. 969–991, 2017.
- MOSIMANN, C. et al. Tracing of two *Pseudomonas* strains in the root and rhizoplane of maize, as related to their plant growth-promoting effect in contrasting soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JAN, p. 1–14, 2017.
- MÜLLER, S.; PEREIRA, P. A. A.; MARTIN, P. Effect of different levels of mineral nitrogen

- on nodulation and N₂ fixation of two cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v. 152, n. 1, p. 139–143, 1993.
- MÜLLER, T. M. et al. Combination of inoculation methods of *Azospirillum brasilense* with broadcasting of nitrogen fertilizer increases corn yield. **Ciência Rural**, v. 46, n. 2, p. 210–215, 2016.
- MUSTAFA, S. et al. Plant growth promoting rhizobacteria in sustainable agriculture: from theoretical to pragmatic approach. **Symbiosis**, v. 78, n. 2, p. 115–123, 2019.
- NABTI, E. et al. A halophilic and osmotolerant *Azospirillum brasilense* strain from algerian soil restores wheat growth under saline conditions. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, n. 4, p. 354–360, 2007.
- NAEF, A.; SENATORE, M.; DÉFAGO, G. A microsatellite based method for quantification of fungi in decomposing plant material elucidates the role of *Fusarium graminearum* DON production in the saprophytic competition with *Trichoderma atroviride* in maize tissue microcosms. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 55, n. 2, p. 211–220, 2006.
- NAVARRO, E. et al. Real-time PCR detection chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 439, p. 231–250, 2015.
- NEWTON, W. E. Nitrogen fixation in perspective. In: **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Springer, 2000. p. 3–8.
- NEWTON, W. E. Biology of the nitrogen cycle. In: BOTHE, H.; FERGUSON, S. J.; NEWTON, W. E. (Eds.). **Biology of the Nitrogen Cycle**. Elsevier B.V., 2007. p. 109–130.
- NUNES, S. G. et al. **Brachiaria brizantha cv. Marandu**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 1894. (Embrapa Gado de Corte. Documentos, 21).
- NUTZ, S.; DÖLL, K.; KARLOVSKY, P. Determination of the LOQ in real-time PCR by receiver operating characteristic curve analysis: Application to qPCR assays for *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 2, p. 717–726, 2011.
- ODUM, E. P.; BARRETT, G. W. **Fundamentals of Ecology**. 5th Edn ed. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2005.
- OKON, Y. et al. Agronomic Applications of *Azospirillum* and Other PGPR. In: DE BRUIJN, F. J. (Ed.). **Biological Nitrogen Fixation**. 1. ed. v. 2p. 925–936.
- OLIVARES, F. L. et al. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. in roots, stems, and leaves, predominantly of *Gramineae*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 3, p. 197–200, 1996.
- OLIVARES, F. L. **Taxonomia, ecologia e mecanismos envolvidos na infecção e colonização de plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp. híbrido) por bactérias endofíticas do gênero *Herbaspirillum***. Tese de Doutorado, 1997.
- OLIVEIRA, I. J. et al. Inoculation with *Azospirillum brasiliense* increases maize yield. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 5, n. 6, p. 13–15, 2018.
- OLIVEIRA, P. P. A.; DE OLIVEIRA, W. S. DE; JUNIOR, W. B. **Produção de forragem e qualidade de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu com *Azospirillum brasilense* e fertilizada com nitrogênio**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular Técnica, 54).
- OLIVER, J. D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 34, n. 4, p. 415–425, 2010.
- ORAM, R. N. Register of Australian herbage plant cultivars. 303 p. **Commonwealth Scientific and Industrial Research, East Melbourne, Victoria, Australia**, 1990.
- ORMENÕ-ORRILLO, E.; HUNGRIA, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. The prokaryotes:

- Prokaryotic physiology and biochemistry. In: ROSENBERG, E. et al. (Eds.). . **The Prokaryotes: Prokaryotic Physiology and Biochemistry**. [s.l: s.n.]. p. 1–662.
- OSEI, O. et al. PCR assay for direct specific detection of *Bradyrhizobium elite* strain BR 3262 in root nodule extracts of soil-grown cowpea. **Plant and Soil**, v. 417, n. 1–2, p. 535–548, 2017.
- PAMPANA, S. et al. Nitrogen fixation of grain legumes differs in response to nitrogen fertilisation. **Experimental Agriculture**, v. 54, n. 1, p. 66–82, 2018.
- PEDREIRA, C. G. S.; SILVA, L. S.; ALONSO, M. P. Use of grazed pastures in the brazilian livestock industry: a brief overview. In: EVANGELISTA, A. R. et al. (Eds.). . **International Conference on Forages in Warm Climates Proceedings of the 1st International Conference on Forages in Warm Climates**. Lavras: p. 1–141.
- PEDROSA, F. O.; YATES, M. G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr (gln)* type gene products. **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, n. 1, p. 95–101, 1984.
- PEREG, L.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Assessment of affinity and specificity of *Azospirillum* for plants. **Plant and Soil**, v. 399, n. 1–2, p. 389–414, fev. 2015.
- PEREIRA, J. A. R. et al. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 269–274, 1988.
- PEREIRA, T. P. et al. Real-time PCR quantification of the plant growth promoting bacteria *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 in maize roots. **Molecular Biotechnology**, v. 56, n. 7, p. 660–670, 2014.
- PIZARRO, E. A. et al. Regional experience with *Brachiaria*: Tropical América – Savannas. In: **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Colombia: p. 225–246.
- POLLARD, A. T.; OKUBARA, P. A. Real-time PCR quantification of *Fusarium avenaceum* in soil and seeds. **Journal of Microbiological Methods**, v. 157, p. 21–30, fev. 2019.
- PUJOL, M. et al. Development of a strain-specific quantitative method for monitoring *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, a novel biocontrol agent of fire blight. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, n. 2, p. 343–352, 2005.
- PUJOL, M. et al. Assessment of the Environmental Fate of the Biological Control Agent of Fire Blight, *Pseudomonas fluorescens* EPS62e, on Apple by Culture and Real-Time PCR Methods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2421–2427, 2006.
- RAYNAUD, X.; JAILLARD, B.; LEADLEY, P. W. Plants may alter competition by modifying nutrient bioavailability in rhizosphere: A modeling approach. **American Naturalist**, v. 171, n. 1, p. 44–58, 2008.
- REES, D. C.; HOWARD, J. B. Nitrogenase: Standing at the crossroads. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, n. 5, p. 559–566, 2000.
- REIS JUNIOR, F. B. et al. Identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 28, n. 1, p. 103–113, 2004.
- RENVOIZE, S. A.; CLAYTON, W. B.; KABUYE, C. H. S. Morphology, taxonomy and natural distribution of *Brachiaria* (Trin.) Griseb. In: MILES, J. W.; MAAS, B. L.; VALLE, C. B. (Eds.). . **Brachiaria: biology, agronomy and improvement**. Colombia: p. 1–15.
- RICHARDSON, A. E. et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 305–339, 2009.
- RIHS, J. D. et al. *Roseomonas*, a new genus associated with bacteremia and other human

- infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 12, p. 3275–3283, 1993.
- RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 154–160, 1997.
- RODRIGUES, E. P. et al. *Azospirillum amazonense* inoculation: Effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 302, n. 1–2, p. 249–261, 2008.
- RODRIGUES NETO, J. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathol**, v. 12, p. 16, 1986.
- ROSCONI, F. et al. Identification and structural characterization of serobactins, a suite of lipopeptide siderophores produced by the grass endophyte *Herbaspirillum seropedicae*. **Environmental Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 916–927, 2013.
- RUBIO, L. M.; LUDDEN, P. W. Maturation of Nitrogenase: a Biochemical Puzzle. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 2, p. 405–414, 15 jan. 2005.
- RUZZI, M.; AROCA, R. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 124–134, 2015.
- SÁ, G. C. R. et al. Biomass Yield, Nitrogen Accumulation and Nutritive Value of Mavuno Grass Inoculated with Plant Growth-promoting Bacteria. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 50, n. 15, p. 1931–1942, 2019.
- SANTANA, S. S. et al. Canopy characteristics and tillering dynamics of *Marandu palisade* grass pastures in the rainy–dry transition season. **Grass and Forage Science**, v. 72, n. 2, p. 261–270, 2016.
- SANTOS, M. M. et al. Épocas de aplicação de nitrogênio em cobertura na cultura do milho em plantio direto, e alocação do nitrogênio (15N) na planta. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 34, n. 4, p. 1185–1194, 2010.
- SAVAZZINI, F. et al. Real-time PCR for detection and quantification of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* strain SC1 in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, n. 2, p. 185–194, 2008.
- SCHENA, L. et al. Real-time quantitative PCR: A new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, n.9, p. 893-908, 2004.
- SCOTT, M. P.; EMERY, M. Maize: Overview. In: **Encyclopedia of Food Grains: Second Edition**. 2. ed. Elsevier Ltd., 2016. p. 99–104.
- 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**, v. 111, n. 4, p. 915–924, 2011.
- SILVA, L. L. G. G. et al. Biological Nitrogen fixation in grasslands with different cutting intensities. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 225, p. 21–30, 2010.
- SØRENSEN, J. et al. Molecular tools in rhizosphere microbiology-from single-cell to whole-community analysis. **Plant and Soil**, v. 321, n. 1–2, p. 483–512, 2009.
- SOTO-MUÑOZ, L. et al. DNA-based methodologies for the quantification of live and dead cells in formulated biocontrol products based on *Pantoea agglomerans* CPA-2. **International Journal of Food Microbiology**, v. 210, p. 79–83, 2015.
- SPAEPEN, S. et al. Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. **Plant and Soil**, v. 312, n. 1–2, p. 15–23, 2008.
- SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-Promoting Actions of Rhizobacteria. In: LOON, L. C. VAN (Ed.). **Advances in Botanical Research**. 1. ed. Elsevier Ltd, 2009. v. 51p. 283–320.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing

- bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 487–506, 2000.
- STETS, M. I. **Monitoramento de *Azospirillum brasilense* e estudo da diversidade bacteriana associada a raízes de trigo (*Triticum aestivum*)**. UFPR, 2013.
- STETS, M. I. et al. Quantification of *Azospirillum brasilense* FP2 bacteria in wheat roots by strain-specific quantitative PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 19, p. 6700–6709, 2015.
- STOFFELS, M.; CASTELLANOS, T.; HARTMANN, A. Design and Application of New 16S rRNA-targeted Oligonucleotide Probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista*-Cluster. **Systematic and applied microbiology**, v. 24, n. 1, p. 83–97, 2001.
- TARRANT, J. J.; KRIEG, N. R.; DOBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, n. 8, p. 967–980, 1978.
- THERMOFISHER. **Real-time PCR handbook**. Disponível em: <[https://www.ffclrp.usp.br/divulgacao/emu/real_time/manuais/Apostila qPCR-Handbook.pdf](https://www.ffclrp.usp.br/divulgacao/emu/real_time/manuais/Apostila_qPCR-Handbook.pdf)>. Acesso em: 2 dez. 2019.
- TIMMUSK, S. et al. Perspectives and Challenges of Microbial Application for Crop Improvement. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 49, p. 1–10, 2017.
- TSAI, S. M. et al. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, v. 152, n. 1, p. 131–138, 1993.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3- New Capabilities and Interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. 1–12, 2012.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K. H. S.; BODDEY, R. M. Contribution of Nitrogen Fixation to Sugar Cane: Nitrogen-15 and Nitrogen-Balance Estimates. **Soil Science Society of America Journal**, v. 56, n. 1, p. 105, 1992.
- USDA- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE 2018. **National Agricultural Statistics Service**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#/app/downloads>>. Acesso em: 2 mar. 2019.
- VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education**, v. 29, n. 3, p. 151–159, 2005.
- VALENTIM, J. F.; AMARAL, E. F. DO; LANI, J. L. **Definição de zonas de risco edáfico de morte de pastagens de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu no Estado do Acre**. REUNÃO BRASILEIRA DE MANEJO E CONSERVAÇÃO DO SOLO E DA ÁGUA. **Anais...**2002
- VALLE, C. B.; JANK, L. .; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 460–472, 2009.
- VILELA, L.; MARTHA JÚNIOR, G.; BARIONI, B. I. **Pasture degradation and long-term sustainability of beef cattle systems in the Brazilian Cerrado. Discussion draft presented at the symposium Cerrado land-use and conservation: assessing trade-off between human and ecological needs**. XIX ANNUAL MEETING OF SOCIETY FOR CONSERVATION BIOLOGY CAPACITY BUILDING & PRACTICE IN A GLOBALIZED WORLD. **Anais...**2005
- WAGH, J. et al. Overexpression of citrate operon in *Herbaspirillum seropedicae* Z67 enhances organic acid secretion, mineral phosphate solubilization and growth promotion of *Oryza sativa*. **Plant and Soil**, v. 383, n. 1–2, p. 73–86, 2014.

- WALKER, V. et al. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 151–163, 2012.
- WANG, R.-F.; CAO, W.-W.; CERNIGLIA, C. E. Phylogenetic analysis of *Fusobacterium prausnitzii* based upon the 16S rRNA gene sequence and PCR confirmation. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 341–343, 1996.
- WEBER, O. B. et al. Isolation and characterization of diazotrophic bacteria from banana and pineapple plants. **Plant and Soil**, v. 210, n. 1, p. 103–113, 1999.
- WEBER, O. B. et al. Interaction of endophytic diazotrophic bacteria and *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense on plantlets of banana “Maça”. **Plant and Soil**, v. 298, n. 1–2, p. 47–56, 2007.
- YASMIN, H. et al. L-tryptophan-assisted pgpr-mediated induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Plant Interactions**, v. 12, n. 1, p. 567–578, 2017.
- YEOH, Y. K. et al. The core root microbiome of sugarcane cultivated under varying nitrogen fertilizer application. **Environmental Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 1338–1351, 2016.
- ZEFFA, D. M. et al. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, p. 1–19, 2019.
- ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, n. 3, p. 281–289, 2006.

ANEXOS

A. Meio DYGS

Composição (g L⁻¹): 2,0 g de glicose; 2,0 g de ácido málico; 1,5 g de peptona; 2,0 g de extrato de levedura; 0,5 g de K₂HPO₄; 0,5 g de MgSO₄.7H₂O; 1,5 g de ácido glutâmico; pH 6,8.

B. Meio NFbHP

Composição (g L⁻¹): 6,0 g de K₂HPO₄; 4,0 g de KH₂PO₄; 0,2 g de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g de NaCl; 0,02 g de CaCl₂; 0,056 de ácido nitrilotriacético; 0,02 g de FeEDTA; 5,0 g de ácido málico; pH 6,5.

C. Meio NFb

Composição (g L⁻¹): 5,0 g de ácido málico; 0,5 g de K₂HPO₄; 0,2 g de MgSO₄.7H₂O; 0,1 g de NaCl; 0,02 g de CaCl₂. 2H₂O; 2 mL de solução de micronutrientes (g L⁻¹: 0,04 g de CuSO₄.5H₂O; 0,12 g de ZnSO₄.7H₂O; 1,4 g de H₃BO₃; 1,0 g de Na₂MoO₄.2H₂O; 1,175 g de MnSO₄. H₂O); 2 mL de azul de bromotimol; 4 mL de FeEDTA; 1 mL de solução de vitaminas (100 g mL⁻¹: 10 mg de Biotina; 20 mg de pyridoxal-HCl); 4,5 g de KOH; pH 6,5 e adicionando agar (15 g/L).

D. Primers desenhados para as estirpes bacterianas de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 a serem quantificadas em tecidos de braquiária e milho por meio da técnica de qPCR.

Estirpe	Primers	Sequências (5' - 3')	Amplicon (pb)
Ab-V5 (BR12186)	Ab-V5p1F Ab-V5p1R	GCGGAACTCCACAACCGAT CAGTGGCCAGAAGGTTAAGGT	219
	Ab-V5Cont7209F Ab-V5Cont7209R	CAACGACCTCTATCCCAAGG GAACGATGCAGTATCCGCCG	215
	Ab-V5Cont7203F Ab-V5Cont7203R	AGAGTCTGGATGCCCTGGCG AGTCCCAAGTGTCGTTACC	171
FP2 (BR11075)	FP2p1F FP2p1.1F FP2p1R	TTGCGAGATCCTGGAAGGGA GCGAGATCCTGGAAGGGAGC AGCGCGACTGAGCGCTTCTC	172
	FP2Cont9982F FP2Cont9982R	GAAGACCGGGATGGATGCGG CACGCTCTTCTCGTCCAGGC	196
	FP2Cont11061F FP2Cont11061R	CGGACGGCTTCTACCGCGTG CGGACGATTCTTGTCTCCCC	189

Sp245 (BR11005)	Sp245p5F Sp245p5R	CTATCGGAACCGCAACGTCA CTGCACTTGTGGTGGATGCCGA	201
	Sp245p9F Sp245p9R	CCTACCTCTATCGGAACCGC ACGCCCTGCACTTGTGGTGGAT	214
	Sp245p10F Sp245p10R	CCTCTATCGGAACCGCAACG GCACTTGTGGTGGATGCCGAGA	203
	Sp245Plasm1F Sp245Plasm1R	TTATGCCTTCGCCATCGACC GGCGAAGATCCGTTCCATCT	171
	ZAECont2219F ZAECont2219R	CAGAGGACGTACCTGTGGTG GCGGAATAGAGAGCGTATCG	180
ZAE94 (BR 11417)	ZAECont2223F1 ZAECont2223R1	GGATCACCTTCTTCCGTTGG TCGGCGGTAATGTAAGGAGC	193
	ZAECont2223F2 ZAECont2223R2	GGTCGCTCTTATGACGTGGT GAAGGCGTTGGGATACATCG	196

E. Condições ajustadas da reação de PCR convencional para os testes estirpe-específico dos *primers* desenhados para estirpes de *A. brasiliense*.

Estirpe	Primers	PCR		
		Primer (10 μ M) (μ M)	MgCl ₂ (25 mM) (mM)	Temperatura de anelamento ($^{\circ}$ C)
Ab-V5	Ab-V5p1F Ab-V5p1R	0,17	1,0	60,5
	Ab-V5Cont7209F Ab-V5Cont7209R	0,13	1,25	60,5
	Ab-V5Cont7203F Ab-V5Cont7203R	0,13	1,25	61
FP2	FP2p1F FP2p1R	0,33	1,5	60
	FP2p1.1F FP2p1R	0,33	1,25	60
	FP2Cont9982F FP2Cont9982R	0,13	1	61
	FP2Cont11061F FP2Cont11061R	0,13	1	60,5

Sp245	Sp245p5F Sp245p5R	0,11	1	60
	Sp245p9F Sp245p9R	0,13	1,25	61
	Sp245p10F Sp245p10R	0,16	1,5	61
	Sp245Plasm1F Sp245Plasm1R	0,11	1,5	60,5

F. Condições ajustadas para a amplificação por qPCR utilizando os *primers* selecionados. Volume final da reação igual a 15 μ L.

Estirpe	Primers	qPCR			
		Primer (10 μ M) (μ M)	H2O PCR (μ L)	Sybr Green (μ L)	Tween 20 2% (%)
FP2	FP2Cont11061F FP2Cont11061R	0,13	2,1	7,5	0,06
Sp245	Sp245p10F Sp245p10R	0,16	2	7,5	0,06
	Sp245Plasm1F Sp245Plasm1R	0,11	2,18	7,5	0,06
ZAE94	ZAECont2223F1 ZAECont2223R1	0,16	2	7,5	0,06
	ZAECont2223F2 ZAECont2223R2	0,16	2	7,5	0,06

G. Resultados médios da Contagem por microgota em placa das estirpes de *A. brasilense* e *H. seropedicae* selecionadas.

Espécie	Estirpes	Repetições técnicas		
		R1	R2	R3
<i>A. brasilense</i>	Ab-V5	2,3x10 ⁹	2,8x10 ⁹	4,3x10 ⁸
	FP2	2,5x10 ⁸	2,3x10 ⁸	2,6x10 ⁸
	Sp245	3,8x10 ⁸	2,5x10 ⁸	3,1x10 ⁸
<i>H. seropedicae</i>	ZAE94	1,1x10 ⁹	8,0x10 ⁸	8,0x10 ⁸

