



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MAYARA BARBOSA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXSUDATOS
RADICULARES DE GENÓTIPOS HÍBRIDOS COMERCIAIS
DE MILHO (*Zea mays* L.) E SEUS EFEITOS SOBRE A
RESPOSTA QUIMIOTÁTICA DE *Azospirillum brasilense* E
SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE
MILHO**

Londrina
2017

MAYARA BARBOSA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXSUDATOS
RADICULARES DE GENÓTIPOS HÍBRIDOS COMERCIAIS
DE MILHO (*Zea mays* L.) E SEUS EFEITOS SOBRE A
RESPOSTA QUIMIOTÁTICA DE *Azospirillum brasilense* E
SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE PLANTAS DE
MILHO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia .

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira.

Coorientador: Cesar Augusto Tischer.

Londrina
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586c Silva, Mayara Barbosa.

Caracterização química de exsudatos radiculares de genótipos híbridos comerciais de milho (*Zea mays* L.) e seus efeitos sobre a resposta quimiotática de *Azospirillum* brasileiro e sobre o desenvolvimento inicial de plantas de milho / Mayara Barbosa Silva. - Londrina, 2016.
104 f.: il.

Orientador: André Luiz Martinez de Oliveira.

Coorientador: César Augusto Tischer.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola – Teses. 2. *Azospirillum* brasileiro – Teses. 3. Quimiotaxia – Teses. 4. chemiotaxis. – Teses. I. Oliveira, André Luiz Martinez de. II. Tischer, César Augusto. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 663.1

MAYARA BARBOSA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXSUDATOS RADICULARES DE
GENÓTIPOS HÍBRIDOS COMERCIAIS DE MILHO (*Zea mays* L.) E
SEUS EFEITOS SOBRE A RESPOSTA QUIMIOTÁTICA DE
Azospirillum brasilense E SOBRE O DESENVOLVIMENTO INICIAL DE
PLANTAS DE MILHO**

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia .

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Martinez de
Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Elisete Pains Rodrigues
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.Dr. Fernando Macedo Junior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho a minha mãe Márcia,
à Vórcy e Vôdevar, pelo amor, força e
incentivo ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por mais uma etapa vencida.

Agradeço ao meu orientador André Luiz Martinez de Oliveira não só pela orientação, mas pelos ensinamentos, compreensão e por estar sempre disposto a ajudar.

Agradeço a minha mãe, Marcia por todo amor, companherismo e por ser minha base nos momentos difíceis que não foram poucos, por me aconselhar e sempre estar tão presente!

A minha querida avó Iracy, por aguentar meus choros e lamentações e sempre conseguir me animar dizendo suas palavras doces. Ao vô Edevar, por sempre acreditar em mim e estar presente mesmo de longe em cada dia da minha estadia em Londrina.

A minha irmã Letícia pela parceria e mesmo com tantas brigas pela amizade.

Ao meu amor, Guilherme, por me encorajar e não me deixar fraquejar, pelo apoio e confiança.

Aos meus colegas de laboratório, Karina, Odair, Luan, Monica e Diana, por todos os favores pedidos, dúvidas esclarecidas e troca de conhecimento.

Ao Professor Cesar, pelos ensinamentos.

Aos técnicos de laboratório, Nelson e Silvia, por todo suporte e por aguentar toda enchecção de saco sem reclamar e sendo sempre tão eficiente.

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina e ao programa de Mestradoem Biotecnologia.

A Capes pelo apoio financeiro.

À todos minha eterna gratião!

SILVA, Mayara Barbosa da. **Caracterização química de exsudatos radiculares de genótipos híbridos comerciais de milho (*Zea mays* L.) e seus efeitos sobre a resposta quimiotática de *Azospirillum brasilense* e sobre o desenvolvimento inicial de plantas de milho**. 2016. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Os exsudatos radiculares produzidos por diferentes espécies vegetais são capazes de induzir respostas quimiotáticas sobre a microbiota do solo, mediando interações planta-bactéria. Dentre as biomoléculas presentes nestes exsudatos, estão carboidratos, ácidos orgânicos, peptídeos e flavonoides. Com isso o presente trabalho objetivou caracterização química dos exsudatos radiculares de diferentes genótipos de milho e avaliar o efeito dos exsudatos na quimiotaxia de *Azospirillum* e no desenvolvimento de plantas de milho. Fizemos a caracterização química dos exsudatos radiculares utilizando as técnicas de LCMS, RMN e injeção direta no massas, buscamos também avaliar os efeitos dos exsudatos sobre a quimiotaxia de *Azospirillum brasilense* utilizando placa quimiotática e formação de biofilme, além de avaliar o efeito desses exsudatos na fisiologia do milho, através de testes de germinação inicial e em casa de vegetação. Identificamos 18 compostos presentes no exsudato DKB 390 e 13 no DKB 240, dentre os compostos estão açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos, aminoácidos, enzimas, auxinas, citocininas e os flavonóides; sendo que esses compostos tem ação diferenciada, o genótipo DKB 390 promoveu uma maior quimiotaxia das bactérias promotoras de crescimento vegetal em relação ao DKB 240 isso pode ser explicado pelo fato de que o genótipo DKB 390 apresenta um maior número de diferentes flavonoides além da presença de isoflavonas; as determinações de UFC demonstraram que os exsudatos radiculares dos genótipos DKB 240 e DKB 390 possuem alta capacidade quimiotática sobre *A. brasilense* Ab-V5, sendo que o genótipo DKB 390 proporcionou maiores contagens de UFC do que o genótipo DKB 240. Nenhuma das outras substâncias avaliadas apresentou efeito quimiotático significativo. Quando buscamos avaliar o efeito dos exsudatos radiculares de milho na fisiologia do milho durante seu estágio de desenvolvimento e confirmar seu potencial como quimioatraente para BPCV, foi possível confirmar a ação positiva dos exsudatos radiculares no desenvolvimento de genótipos de milho assim fica claramente estabelecido que exsudatos radiculares são fundamentais mediadores em interações na rizosfera entre planta/microrganismos e sua ação diferenciada em que o exsudato DKB 390 se mostra mais eficiente por apresentar presença de um maior número de flavonoides presente no exsudato.

Palavras-chave: *Azospirillum brasilense*. Exsudatos. Inoculantes. Quimiotaxia, Bactérias promotoras do crescimento vegetal.

SILVA, Mayara Barbosa da. **Chemical characterization of root exudates of commercial hybrid genotypes of maize (*Zea mays* L.) and its effect on the chemotactic response of *Azospirillum brasilense* and the early development of corn plants.** 2016. 104 p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The exudates produced by different plant species are able to induce chemotactic responses on soil microflora, mediating plant-bacteria interactions. Among these exudates biomolecules are carbohydrates, organic acids, peptides and flavonoids. Thus the present study aimed chemical characterization of the root exudates of different genotypes of corn and evaluate the effect of exudates in the chemotaxis of *Azospirillum* and desinvolvimento corn plants. We did the chemical characterization of exudates using the LCMS techniques, NMR and direct injection into the masses, seek also to evaluate the effects of exudates on the chemotaxis of *Azospirillum brasilense* using chemotactic plaque and biofilm formation, and to evaluate the effect of these exudates in physiology corn, through initial germination and greenhouse. We identified 18 compounds present in the exudate DKB 390 and 13 240 in DKB, among compounds are sugars, fatty acids, organic acids, amino acids, enzymes, auxins, cytokinins and flavonoids; and these compounds have differentiated action, DKB genotype 390 promoted increased chemotaxis of bacteria that promote plant growth in relation to DKB 240 this can be explained by the fact that the DKB 390 genotype has a larger number of different flavonoids and the presence of isoflavones; CFU determinations showed that root exudates of genotypes and DKB DKB 240 390 have a high capacity for chemotaxis-V5 Ab A. *brasilense*, wherein the genotype provided DKB 390 CFU counts greater than DKB 240. No other genotype substances evaluated showed significant chemotactic effect. When we sought to evaluate the effect of root maize exudates in the physiology of corn during its stage of development and confirm its potential as a chemoattractant for BPCV, it was possible to confirm the positive action of exudates in the development of milhoassim genotypes is clearly established that exudates are key mediators of interactions between the plant rhizosphere / microorganisms and their differentiated action that DKB 390 exudate is more efficient to present presence of a larger number of flavonoids present in the exudate.

Keywords: *Azospirillum brasilense*. Exudates. Inoculants. Chemotaxis. Bacteria promoting plant growth.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Produção mundial de milho pelos dez maiores países produtores no ano de 2015.....	18
Figura 2	– Estrutura geral da raiz, ambiente rizosferico e seus efeitos.....	23
Figura 3	– Componentes básicos do espectrômetro de massas.....	24
Figura 4	– Montagem da placa quimiotática.....	46
Figura 5	– Cromatograma de referência do exsudato radicular do genótipo híbrido de milho DKB 240, obtido por UPLC-MS. Os números acima dos picos representam os picos de interesse, isolados por EIC a partir do cromatograma total.	49
Figura 6	– Cromatograma de referência do exsudato radicular do genótipo híbrido de milho DKB 240, obtido por UPLC-MS. Os números acima dos picos representam os picos de interesse, isolados por EIC a partir do cromatograma total.	49
Figura 7	– Espectro cromatográfico dos flavonóides encontrados no exsudato radicular do genótipo de milho DKB 240 de forma separada. A- Crisina, b- Raminetina, c- Petunidina.....	52
Figura 8	– Espectro cromatográfico dos flavonódes e isoflavonas encontrados no exsudato radicular do genótipo de milho DKB 390. A- Crisina, b- Petunidina, c- Acacetin, d- Rutina, e- Metildaidzeína 1,26 hexacosanediol.....	53
Figura 9	– Espectro cromatográfico identificando a presença do precursor de opinas SAGITTARIOL, no exsudato radicular do genótipo de milho DKB 390.....	54
Figura 10	– Espectro de RMN ¹ H em D ₂ O comparando os exsudatos DKB 390 a cima e DKB 240 em baixo.....	55
Figura 11	– Cromatograma da injeção direta no espectrometro de massas do exsudato radicular DKB 390.....	56
Figura 12	– Cromatograma da injeção direta no espectrometro de massas do exsudato radicular DKB 240.....	56
Figura 13	– Número de UFC de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 em capilares preenchidos com diferentes substâncias e exsudatos radiculares de dois genótipos	

	híbridos de milho (DKB 390 e DKB 240). As contagens são apresentadas como Log10 de UFC.....	58
Figura 14	– Contagem de UFC/mL em log/UFC do biofilme de AbV-5 nas sementes de milho com e sem exsudatos.....	60
Figura 15	– Contagem de UFC/mL em log/UFC do desenvolvimento inicial de raízes de milho.....	83
Figura 16	– Análise dos componentes principais, mostrando as variações dos parâmetros avaliados: número médio de raiz (NMR), diâmetro médio de raiz (DMR), volume médio de raiz (VMR), área superficial de raiz (ASR), comprimento médio de raiz (CMR) e perímetro médio de raiz (PMR), a figura A representa o experimento com 7 dias de transplântio e a figura B 14 dias.....	86
Figura 17	– Taxas fotossintéticas medidas pelo analisador de gás infravermelho o IRGA aos 30 dias de plantio.....	88
Figura 18	– Taxas de condutância estomática medidas pelo analisador de gás infravermelho o IRGA aos 30 dias de plantio.....	88
Figura 19	– Análise dos componentes principais do genótipo DKB 240 mostrando as variações dos parâmetros avaliados: número médio de raiz (NMR), diâmetro médio de raiz (DMR), volume médio de raiz (VMR), área superficial de raiz (ASR), comprimento médio de raiz (CMR) e perímetro médio de raiz (PMR), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR).....	91
Figura 24	– Análise dos componentes principais do genótipo P30F53H mostrando as variações dos parâmetros avaliados: número médio de raiz (NMR), diâmetro médio de raiz (DMR), volume médio de raiz (VMR), área superficial de raiz (ASR), comprimento médio de raiz (CMR) e perímetro médio de raiz (PMR), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR).....	92
Figura 25	– Contagem de UFC/mL em log/UFC do experimento casa de vegetação.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos orgânicos presentes nos exsudatos liberados no solo pelas raízes das plantas	19
Tabela 2 – Características agronômicas dos genótipos híbridos comerciais utilizados neste estudo.....	43
Tabela 3 – Composição química dos exsudatos radiculares de dois genótipos híbridos comerciais de milho (DKB240 e DKB390) identificados a partir dos íons isolados por UPLC-MS	50
Tabela 4 – Características agronômicas dos genótipos híbridos comerciais utilizados neste estudo.....	74
Tabela 5 – Descrição dos tratamentos utilizados para a determinação do efeito alelopático (homólogo e heterólogo) de exsudatos radiculares de plantas de milho sobre o desenvolvimento e fisiologia de milho, na presença e na ausência de inoculação com <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5.....	79
Tabela 6 – Comparação dos parâmetros avaliados pelo software <i>giaRoots</i> no desenvolvimento inicial de sementes de milho em rolos de germinação	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPCV	Bactéria Promotora de Crescimento vegetal
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
LC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas
MS	Espectrometria de Massas
UPLC-MS	Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to mass spectrometry
CG	Cromatografia gasosa
ESI	Ionização por eletro spray
RMN	Ressonância magnética nuclear
G _s	Condutância estomática
A	Fotossíntese Líquida
IRGA	Analisador de gás infravermelho
PPFD	Densidade de fluxo de fótons

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	OBJETIVO	15
3.	JUSTIFICATIVA	15
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4.1	Milho	17
4.2	Exsudatos Radiculares	18
4.3	BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL E SEUS EFEITOS NA RIZOSFERA	22
4.4	Métodos e técnicas para estudo de exsudatos radiculares e efeito sobre os microrganismos	26
4.4.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas - UPLC-MS	26
4.4.2	Ressonância Magnética Nuclear – RMN	28
5.	REFERÊNCIAS	29
6	Capítulo 1: Caracterização Química e Avaliação do Efeito dos Exsudatos Radiculares de Genótipos Híbridos Comerciais de Milho (<i>Zea Mays</i> L.) sobre a Quimiotaxia de <i>Azospirillum brasilense</i>	39
6.1	RESUMO	39
6.2	ABSTRACT	40
6.3	INTRODUÇÃO	41
6.4	MATERIAL E MÉTODOS	43
6.4.1	Material vegetal e obtenção de exsudatos radiculares	43
6.4.2	Determinação da composição química dos exsudatos radiculares de milho por UPLC-MS	44
6.4.3	Ressonância Magnética Nuclear	45
6.4.4	Injeção direta no espectrômetro de massas	45

6.4.5	Avaliação da atividade quimiotática de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 aos exsudatos radiculares de milho, ácidos orgânicos e flavonoides.....	45
6.4.6	Avaliação da quimiotaxia de sementes de milho tratadas com exsudatos radiculares sobre <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5.....	47
6.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.5.1	Caracterização química de metabólitos presentes nos exsudatos.....	47
6.5.2	Avaliação da atividade quimiotática de <i>A. brasilense</i> Ab-V5 por capilaridade.....	57
6.5.3	Avaliação da quimiotaxia de sementes de milho tratadas com exsudatos radiculares sobre <i>Azospirillum brasilense</i> Ab-V5.....	60
6.6	CONCLUSÃO	61
6.7	AGRADECIMENTOS	61
6.8	REFERÊNCIAS	62
6.9	ANEXOS	66
7	CAPÍTULO 2 – Ação de exsudatos radiculares de genótipos híbridos comerciais de milho (<i>Zea mays</i> L.) sobre o desenvolvimento inicial de plantas de milho e seus efeitos sobre a quimiotaxia de <i>Azospirillum brasilense</i>	70
7.1	RESUMO	70
7.2	ABSTRACT	71
7.3	INTRODUÇÃO	72
7.4	MATERIAL E MÉTODOS	73
7.4.1	Material vegetal e obtenção de exsudatos radiculares.....	73
7.4.2	Avaliação do efeito alelopático dos exsudatos radiculares: desenvolvimento inicial do milho.....	74
7.4.3	Avaliação do efeito alelopático dos exsudatos radiculares: ensaio em tubo de ensaio com solução nutritiva com o genótipo P30F52H.....	75
7.4.4	Avaliação do efeito alelopático dos exsudatos radiculares: ensaio em casa de vegetação.....	77
7.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
7.5.1	Teste de desenvolvimento inicial de raízes de milho	79
7.5.2	Teste em tubo de ensaio com solução nutritiva	83
7.5.3	Teste em casa de vegetação.....	86

7.6	CONCLUSÃO	94
7.7	REFERÊNCIAS	94
7.8	Anexos.....	98

1. INTRODUÇÃO

A interação entre bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) com diversas culturas agrícolas tem sido tema de pesquisas no mundo todo, devido ao potencial biotecnológico que estes microrganismos possuem. Dentre os efeitos associados ao uso de BPCV às plantas hospedeira estão o aumento no desenvolvimento inicial das raízes, proporcionam o fornecimento direto e indireto de nutrientes além de melhorias no desenvolvimento vegetal resultando num aumento da produtividade. Neste sentido, a utilização de BPCV em cultivos comerciais possibilita a redução dos custos de produção ao diminuir a quantidade de fertilizantes e agroquímicos aplicados, e conseqüentemente contribuindo para a conservação dos recursos ambientais.

Dentre os mecanismos de promoção do crescimento apresentados por BPCV, a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem grande destaque pela possibilidade de atuar diretamente no fornecimento a planta de nitrogênio, um dos macronutrientes de mais relevantes para o alcance de elevadas produtividades. Estudos dirigidos ao isolamento e identificação de bactérias fixadoras de N avançaram bastante nos últimos anos, sendo isolados e descritos diversos gêneros e espécies deste grupo bacteriano em associação a diversas espécies vegetais, incluindo várias gramíneas de interesse agrônômico como o milho. Embora o uso de inoculantes contendo BPCV não seja prática consolidada em cultivos comerciais de plantas não-leguminosas, interações positivas entre BPCV diazotróficas e o milho tem sido relatadas por vários autores, demonstrado que na maioria dos casos se observam melhorias no desenvolvimento vegetal e incrementos na produtividade (VIANA, 2012).

A cultura do milho é uma das principais culturas agrícolas do mundo, possuindo grande importância social, econômica e cultural. Segundo dados do CONAB (2015), são cultivados aproximadamente 15 milhões de hectares de milho no Brasil. Essa cultura é exigente nas condições de fertilidade do solo e nos tratos culturais, sendo geralmente influenciada por problemas de estresse ambiental, dentre os quais se destaca a baixa fertilidade dos solos, principalmente deficiência de N na maioria dos solos. Segundo Santos (2012), a deficiência de nitrogênio pode reduzir o rendimento de grãos de 14 a 80 % em milho. Estudos têm demonstrado que a espécie diazotrófica *Azospirillum brasilense* estimula o crescimento e a produtividade do milho e outras espécies de interesse agrônômico (REIS JUNIOR, 2008).

Os benefícios destas bactérias podem ser diretos e indiretos. Dos quais os primeiros são destacados o processo de fixação biológica de nitrogênio, produção de fitormônios (sobretudo auxinas) e solubilização de fosfato inorgânico. Os benefícios indiretos estão relacionados à indução sistêmica de resistência a doenças, controle biológico e produção de compostos orgânicos que captam ferro (sideróforos) (DOBBELAERE & OKON, 2007).

Já foi descrita a variabilidade na resposta de diferentes genótipos de milho ao uso da tecnologia de inoculação com BPCV (SALOMONE e DOBEREINER, 1996), sendo comprovada que a utilização desse microrganismo contribui para em torno de 20 a 60% de todo N fixado em gramíneas (HUNGRIA, 2011).

A busca por fatores que possam favorecer a compatibilidade planta-bactéria, tem estimulado a pesquisa sobre a influência dos exsudatos vegetais nestas interações. Estes compostos são liberados pelas raízes ou sementes vegetais e compreendem uma mistura complexa de substâncias, incluindo carboidratos e aminoácidos, além de flavonóides (BADRI E VIVANCO, 2009). Os exsudatos agem como quimioatraentes sobre grupos microbianos específicos, componentes da biodiversidade nativa do solo, e induzem nestes organismos a expressão de genes relacionados a síntese de outras biomoléculas, identificadas como lipo-oligossacarídeos ou oligossacarídeos lipoquitínicos. Esses sinais moleculares, produzidos pelas bactérias em resposta aos indutores presentes e liberados pelos exsudatos das plantas, são responsáveis pelas alterações morfológicas nas raízes e pela compatibilidade associativa (MARTINOIA et al., 2002).

A atração da bactéria pelo exsudato ocorre por quimiotaxia, que em sentido geral é o movimento em direção a um gradiente químico desenvolvido por alguns seres vivos. O mecanismo quimiotático é ativado por mudanças no pH, temperatura, osmolaridade, viscosidade e produtos químicos, onde alguns destes últimos são nutrientes ou fatores nutricionais, como metabólitos secundários (PUGLISI et al. 2008). O movimento quimiotático e as respectivas substâncias químicas envolvidas influenciam o metabolismo e o comportamento de alguns organismos unicelulares, como por exemplo direcionando a busca por nutrientes e a comunicação entre indivíduos durante a formação de colônias ou grupos (SINGH, 2014).

Apesar de vários trabalhos relatarem os benefícios da inoculação da bactéria *A. brasilense* na cultura de milho, não existem relatos sobre inoculação associado a adição de exsudatos radiculares, principalmente sobre o efeito no desenvolvimento inicial de sementes de milho, que influenciará diretamente no estabelecimento das plântulas a campo e por consequência na produtividade da cultura. A identificação das substâncias que compõe os

exsudatos são de extrema importância, pois devem estar envolvidas nas respostas quimiotáticas de atração, levando a caracterização de variações na composição dos exsudatos radiculares entre genótipos contrastantes na resposta à inoculação com BPCV.

De modo mais específico, a identificação de biomoléculas exsudadas por raízes de milho que atuem positivamente na compatibilidade entre a planta e bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) pode levar ao desenvolvimento de aditivos para compor formulações biofertilizantes de alta eficiência.

Com isso, o presente trabalho foi dividido em dois capítulos e teve como objetivo a caracterização química dos exsudatos radiculares de genótipos de milho contrastantes na interação com *Azospirillum brasilense* Ab-V5 e os efeitos dos exsudatos radiculares como indutor de compatibilidade entre diferentes genótipos de milho e *A. brasilense* também foram estudados.

O presente trabalho foi dividido em dois capítulos para posterior produção de dois artigos científicos, o primeiro capítulo tem como título: Caracterização química dos exsudatos radiculares de genótipos híbridos comerciais de milho (*Zea mays* L.) sobre a quimiotaxia de *Azospirillum brasilense* e o capítulo 2: Efeitos alelopáticos de exsudatos radiculares de milho na fisiologia e desenvolvimento inicial de genótipos híbridos de milho.

2. OBJETIVO

Os objetivos deste trabalho foram determinar a composição química de exsudatos radiculares em dois genótipos híbridos comerciais de milho, identificando variações na atividade quimiotática dos exsudatos sobre *Azospirillum brasilense*, bem como a ocorrência de possíveis efeitos alelopáticos sobre o desenvolvimento inicial de plântulas de milho e sua colonização por *A. brasilense*.

3. JUSTIFICATIVA

A tecnologia de inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV) pode contribuir significativamente para a redução do uso de agroquímicos, q diminuição do uso de fertilizantes químicos atua sobre a emissão de gases de efeito estufa, diminuindo direta e indiretamente os efeitos deletérios ao ambiente associados à estes gases, diminuindo também a contaminação ambiental relacionada ao uso indiscriminado de fertilizantes minerais solúveis (THEODORO; ALMEIDA, 2013).

Estudos mostram que o uso de inoculantes em milho safrinha pode gerar um incremento de até 50% na produtividade, dependendo da estirpe e do material genético utilizado, e pode ocorrer ainda uma redução de custo em torno de 20% CANGAHUALA-INOCENTE et al., 2013; TAULE et al., 2012; SAIKIA et al., 2012)

O cultivo do milho é dependente de altas doses de adubação nitrogenada, as quais são responsáveis por elevados custos de produção. Uma das alternativas concretas à diminuição da dependência da agricultura brasileira por fertilizantes minerais e por agroquímicos é a ampliação de insumos biológicos de alta eficiência, (GLICK, 2012). A utilização de fertilizantes nitrogenados pela atividade agrícola pode ser substituída parcial ou completamente pelo uso de biofertilizantes contendo BPCV eficientes na fixação biológica do nitrogênio (FBN). Neste contexto, a tecnologia de inoculação com bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCVs), leva a produção de novas formulações de biofertilizantes de alta eficiência, diminuindo a utilização de N mineral e aumentando o rendimento da plantação.

O uso de biofertilizantes em larga escala é possível pelo desenvolvimento de formulações que funcionam como veículo para o microrganismo, fornecendo a suplementação necessária para o seu desenvolvimento e que comece a estabelecer as interações positivas com a planta, além da viabilidade do produto, ou seja, para que o microrganismo se mantenha vivo.

Compostos exsudados na rizosfera podem regular a atividade da comunidade microbiana, induzir resistência a herbívoros, estimular simbioses, modificar propriedades químicas e físicas do solo, e inibir o crescimento de espécies de plantas concorrentes (Nardi et al, 2000).

Exsudatos radiculares representam uma importante fonte de nutrientes para os microrganismos na rizosfera além de participar de colonização precoce induzir respostas quimiotáticas de bactérias rizosféricas aumentando a colonização destes nas raízes (LIMA, et al., 2014) . Apesar de sua importância, existem relativamente poucos relatos sobre a composição e a proporção dos diferentes compostos exsudados pelas plantas (Oburger et al., 2012). É necessário que haja um conhecimento prévio sobre a composição química desses compostos, para então poder utiliza-los como aditivos, por esse motivo a caracterização dos exsudatos radiculares é a etapa inicial para o desenvolvimento deste estudo.

A busca continuada por tecnologias que promovam o aumento no rendimento produtivo do milho, que sejam de baixo custo econômico e que favoreçam a sustentabilidade dos agroecossistemas, permitindo suprir a crescente demanda global por alimentos e energia, encontra na prospecção de recursos biotecnológicos uma ferramenta de extrema importância. A promoção do crescimento vegetal decorrente da exploração racional de associações naturais benéficas, como as existentes entre a planta de milho e algumas bactérias associativas (denominadas de BPCV), capazes de promover aumento do volume de raízes e atuar no suprimento de nutrientes para esta cultura, é uma alternativa viável para o alcance de elevadas produtividades com baixo impacto econômico e ambiental.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Milho

O milho (*Zea mays* L.) pertence à família Poaceae (gramíneas), sendo considerada uma das plantas mais eficientes no armazenamento de energia (PECHANOVA et al., 2013). Geralmente uma planta desenvolvida pode chegar a mais de 2,0 m de altura, dentro de um espaço de tempo de cerca de nove semanas. Nos meses seguintes, essa planta produz cerca de 600 a 1.000 sementes similares àquela da qual se originou (SHAHZAD et al., 2013). Além do elevado potencial produtivo, sua composição química e valor nutricional contribuem para ser uma das mais importantes culturas agrícolas cultivadas e consumidas no mundo. Além disso, o milho possui grande importância econômica decorrente de sua multiplicidade de aplicações, abrangendo desde a alimentação animal até a indústria de alta tecnologia, assumindo relevante papel socioeconômico (YAN et al., 2011).

Atualmente é o cereal mais plantado no mundo, abrangendo no Brasil 15.743,7 de hectares de área plantada, ocupando a décima posição em valores monetários (FAO, 2015). Na temporada 2014/15 a produção de milho primeira safra no Brasil totalizou 30.244,1 mil toneladas, representando um decréscimo de 4,4% em relação ao ocorrido no exercício anterior. A Região Sul, Sudeste e MATOPIBA representaram as maiores participações nacionais, contribuindo com 46%, 26% e 11%, respectivamente, da produção nacional. Na Região Centro-Oeste, maior produtora do cereal de segunda safra, tendo uma produção de 36.836,0 toneladas na última safra. Já a consolidação da produção brasileira do milho, reunindo as duas safras, aponta agora para 84.729,2 mil toneladas, representando um acréscimo de 5,8% em relação à produção passada, que atingiu 80.051,7 mil toneladas. (CONAB, 2015). Dentro da evolução mundial de produção de milho, o Brasil tem se destacado como o terceiro maior produtor, ficando atrás dos Estados Unidos e da China (Figura 1).

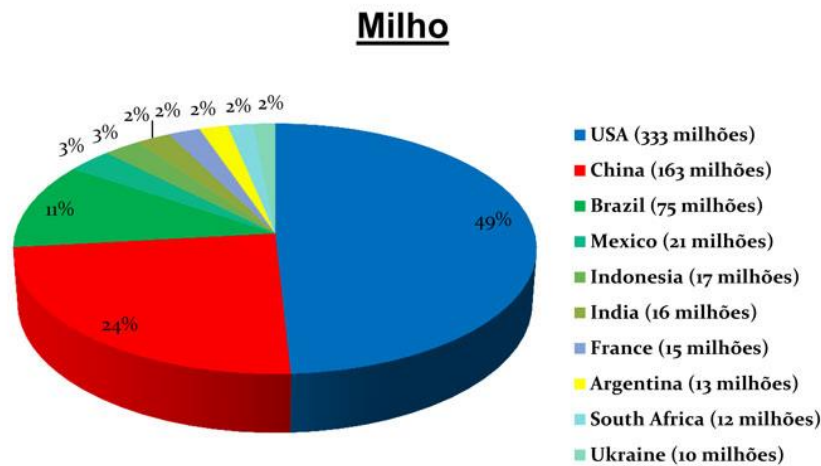


Figura 1 Participação na produção mundial de milho pelos dez maiores países produtores no ano de 2014. **Fonte:** CONAB, 2015.

Nos programas de melhoramento genético de milho, é importante visar o aumento da produtividade de grãos sem comprometer a qualidade nutricional e a constituição do grão, tanto em cultivares transgênicas como em convencionais (COLLI, 2011). Além disso, a composição proteica e aminoacídica dos grãos é influenciada pelo genótipo, ambiente e suas interação entre esses fatores (CALDARELLI & BACCHI, 2012).

A maioria do milho comercial produzido nacionalmente é do tipo duro ou “flint”, a principal diferença entre os tipos de milho é a forma e o tamanho dos grãos, definidos pela estrutura do endosperma e o tamanho do gérmen (COELHO, 2010); considerando a classificação comercial do milho, são considerados cinco tipos ou classes principais de grãos, classificados segundo a estrutura do endosperma - pipoca, duro, dentado, farináceo e doce - existindo tipos intermediários, como o semi-duro ou semi-dentado (STOLLER, 2012).

Em 2050, estima-se que a população mundial seja aproximadamente 50% maior que a atual, com cerca de 9 bilhões de pessoas, as quais irão demandar cerca de 70% mais alimentos que a população atual (YAN et al., 2011). No entanto, a estimativa do aumento na produção mundial de grãos é apenas o dobro do que é atualmente, havendo a necessidade de elevar os índices de produção, seja através do melhoramento genético vegetal ou da mudança nas práticas agrônômicas. Contudo, o risco de aumentar os índices de produtividade traz consigo altos custo ambientais devido, principalmente, da aplicação maciça de fertilizantes sintéticos (ROBERTSON; VITOUSEK, 2009; TILMAN et al., 2002; YAN et al., 2011).

4.2 Exsudatos radiculares

As raízes das plantas liberam no solo uma gama de compostos orgânicos que variam desde simples e solúveis em água até aqueles muito complexos e insolúveis em água. Esses compostos estão agrupados nas seguintes categorias: Exsudatos, Secreções, Mucilagens, Mucigel e Lisados.

Nesse trabalho abordaremos o grupo dos exsudatos, mais precisamente os radiculares, geralmente possuem grande diversidade química, tem baixo peso molecular, geralmente são solúveis em água e são liberados sem gasto de energia das células para o espaço intercelular e depois para o solo. Exsudatos são compostos orgânicos produzidos pelas plantas que têm alta diversidade química, esses compostos compreendem vários tipos de aminoácidos, ácidos orgânicos, carboidratos, derivados de ácidos nucléicos, fatores de crescimento e enzimas, além de diversos outros compostos. Em 1969 Rovira, descreveu os compostos orgânicos liberados de forma significativa nos solos (Tabela 1).

Tabela 1: Compostos presentes nos exsudatos liberados pelas raízes das plantas segundo estudos de Rovira, 1969.

Classe de Compostos	Componentes individuais	Funções
Carboidratos	Glicose, frutose, galactose, maltose, arabinose, rafinose, raminose, sacarose e xilose	Fornecer um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos.
Aminoácidos e amidas	Todos 20 aminoácidos proteínogênicos, ácido aminobutírico, homoserina, cistationina, ácido mugineico, fitosideróforos	Inibir nematoides e crescimento de raízes diferentes além da solubilização de nutrientes como o P e Fe e alguns micronutrientes.
Ácidos alifáticos	Ácido fórmico, acético, butírico, propiónico, maleico, cítrico, isocítrico, oxálico, fumárico, malónico, succínico	Regulação do crescimento de atenuação de toxidez causada por alguns elementos como o Al

	tartárico, oxaloacético, pirúvico, glicólico, chiquímico, acetónico, valérico, gluconico	
Ácidos aromáticos	p-hidroxibenzóico, cafeico, p-coumérico, ferúlico, gálico, gentísico, protocatecoico, salicílico, siringico, sinápico	Estimulam a aquisição de nutrientes, reduzem o estresse anaeróbicas das raízes, intemperismo mineral e atração de patógenos
Diversos compostos fenólicos	Flavonoides, flavonas, flavononas, antocianinas, isoflavonóides	Estímulo a interações entre plantas e microrganismos.
Ácidos graxos	Linoléico linolênico, oleico, palmítico, esteárico	Regulação do crescimento das plantas.
Esteróis	Campesterol, sistoterol, estigamasterol,	Regulação do crescimento das plantas.
Enzimas e outros	Proteases, fosfatase ácida, peroxidase, hidrolase lipase	Solubilização de nutrientes.

A composição dos exsudatos varia de acordo com a espécie da planta e com seu estágio de crescimento, o qual se altera nas distintas fases do desenvolvimento das populações microbianas tanto quantitativa quanto qualitativamente. Os exsudatos exercem ações quimiotáticas para determinados grupos de microrganismos, assim como podem atuar como repelente para outros. As plantas, podem durante a exsudação, regular diversos efeitos, dentre eles, a microbiota da rizosfera, a simbiose além disso é capaz de mudar as propriedade físicas e químicas do solo além de inibir o crescimentos de plantas concorrentes. (Nardi et al., 2000).

Para as plantas, exsudatos radiculares representam um componente importante da comunicação com microrganismos que habitam rizosfera e, para esta comunicação, uma ampla gama de substratos e moléculas de sinalização são produzidas por plantas (HAICHAR, et al., 2014). Apesar da sua importância há poucos estudos sobre a composição total desse composto. Badri & Vaivanco (2009) verificaram nos exsudatos de milho (*Zea Mays*) a presença de açúcares, fenóis, ácidos orgânicos, flavonoides, aminoácidos e também uma pequena quantidade de ácidos graxos, hormônios esteroides e enzimas.

A idade da planta interfere diretamente na quantidade e composição dos compostos exsudados, além de todos os fatores externos como estresse biótico e abiótico (NGUYEN et al., 2003). Aulakh et al. (2001) fez uma avaliação de cultivares de arroz e observou que houve uma mudança no nível de exsudação com o crescimento da planta que a qual libera mais carboidratos que ácidos orgânicos com o passar do tempo, afirmando assim que além da idade da planta, espécies diferentes possuem perfis de exsudação diferentes.

Fatores bióticos e abióticos também estão associados a mudança no perfil de exsudação das plantas, com o objetivo de se adaptarem as condições adversas como toxidez, anoxia, temperatura e intensidade luminosa as plantas exsudam compostos a fim de minimizar os efeitos causados por esses fatores. (Bais et al., 2002; Nardi et al, 2000). A intensidade luminosa afeta diretamente a composição dos exsudatos, pois a maioria do carbono liberado pelas raízes é derivada da fotossíntese feita pela parte aérea das plantas. (Pinton et al. 2007). Outra possível classificação dos exsudatos, são feitas de acordo com sua massa molecular, sendo assim, compostos de baixa ou de alta massa molecular.

Os principais componentes dos exsudatos são flavonóides pertencentes a uma ampla classe de metabólitos secundários, que são liberados por sementes e raízes de uma determinada espécie, consistindo em uma mistura de indutores fracos e fortes (HARBONE, 1967). Os flavonoides são responsáveis por ativarem os genes da nodulação nas leguminosas e por promoverem a quimiotaxia em gramíneas fornecendo assim benefícios como a fixação biológica de nitrogênio (FBN). Esses compostos químicos, induzem a expressão de genes, têm sido identificados em exsudatos de muitas leguminosas, e agora estão sendo testadas em gramíneas. Os flavonóides e seus glicosídeos são compostos biologicamente ativos vulgarmente encontrados em plantas constituem um as maiores classes de produtos naturais conhecidos; estes produtos naturais exibem ampla atividade biológica e um grande poder quimiotaxinômico (Harborne et al, 1975.; harborne e Mabry, 1982; Harborne, 1988).

A exsudação parece estar relacionada com os grupos de bactérias que se estabelecem em populações consideráveis na rizosfera, tais como solubilizadores de fosfato, fixadoras de nitrogênio de vida livre e simbiótico, sendo de grande interesse a relação entre esses grupos de bactérias e os fungos micorrízicos. Os microrganismos como *Rhizobium* e *Azospirillum*, aumentam a exsudação afetando o crescimento da planta.

Exsudatos radiculares representam uma importante fonte de nutrientes para os microrganismos na rizosfera e parecem participar de colonização precoce induzir respostas quimiotáticas de bactérias rizosféricas (BACILIO-JIMÉNEZ, et al., 2003).

Na etapa inicial da comunicação molecular entre o macro e microsimbionte, as plantas hospedeiras exsudam substâncias, incluindo carboidratos, aminoácidos, além de flavonóides, que atuam como quimioatraentes para a bactéria; e promovem no microsimbionte a síntese de outros sinais, identificados como lipo-oligossacarídeos ou oligossacarídeos lipoquitínicos. Esses sinais moleculares, produzidos pelas bactérias em resposta aos indutores presentes e liberados pelas raízes das plantas, são responsáveis pelas alterações morfológicas nas raízes e pela compatibilidade associativa.

4.3 BACTÉRIAS PROMOTORAS DE CRESCIMENTO VEGETAL E EFEITO NA RIZOSFERA

Os microrganismos do solo desempenham papel fundamental na gênese do solo e ainda atuam como reguladores de nutrientes, pela ação na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem dos elementos, atuando na disponibilização de nutrientes para o crescimento das plantas (LISBOA, 2012). O solo contém uma grande variedade de microrganismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários. Os componentes microbianos vivos do solo são também denominados de biomassa microbiana dentre eles as bactérias e fungos respondem por cerca de 90% da atividade microbiana (JAMES e BALDANI, 2012).

Os microrganismos estão envolvidos em diversos processos que contribuem principalmente para agricultura, destacam-se a decomposição da matéria orgânica; ciclagem de nutrientes; transformações bioquímicas específicas (nitrificação, desnitrificação, oxidação e redução do enxofre); fixação biológica do nitrogênio; ação antagônica a patógenos e produção de substâncias promotoras ou inibidoras de crescimento (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002). Microrganismos do solo também influenciam acima do solo nos ecossistemas, contribuindo para a nutrição das plantas, na estrutura e a fertilidade do solo (CARNEIRO, 2000). Devido a sua heterogeneidade física, química e biológica, o solo é um dos maiores reservatórios de biodiversidade microbiana, constituindo um importante recurso para a exploração biotecnológica (OLIVEIRA, et al. 2014).

As bactérias promotoras de crescimento em vegetal (BPCV) representam uma parcela funcionalmente ativa da biota do solo presente na rizosfera e no interior da planta hospedeira. A literatura aponta suas potencialidades como componente do manejo sustentável dos sistemas agrícolas, conferindo ao seu hospedeiro características como maior resistência a condições de estresses biótico e abiótico, promoção de crescimento vegetal e amplo uso biotecnológico (OLIVARES, 2009; TRO et al., 2009).

As BPCV podem estimular o crescimento das plantas por diversas maneiras, sendo as mais relevantes: capacidade de fixação biológica de nitrogênio (Huerdo et al., 2008); aumento na atividade da redutase do nitrato quando crescem endofiticamente nas plantas (Cassán et al., 2008); produção de hormônios como auxinas, citocininas (Tien et al., 1979), giberelinas (Bottini et al., 1989), etileno (Strzelczyk et al., 1994) além uma variedade de outras moléculas (Perrig et al., 2007); solubilização de fosfato (Rodriguez et al., 2004); por atuarem como agente de controle biológico de patógenos (Correa et al., 2008), produção de antibióticos entre outros. Em geral, acredita-se que tais microrganismos favoreçam o crescimento das plantas por combinações entre esses mecanismos (NAIMAN; LATRÓNICO; SALAMONE, 2009; STEENHOUDT; VANDERLEYDEN, 2000).

São determinados rizocompetentes os microrganismos que se destacam na colonização da rizosfera de uma espécie vegetal qualquer (OLIVEIRA, et al. 2014). A rizocompetência possibilita a colonização do ambiente rizosférico pelas espécies microbianas mais competitivas, que deslocam deste habitat os grupos incompatíveis ou de menor competitividade, por serem as primeiras mais adaptadas e eficientes na utilização dos recursos disponibilizados pelos exsudatos radiculares de determinada espécie vegetal (Figura 2).

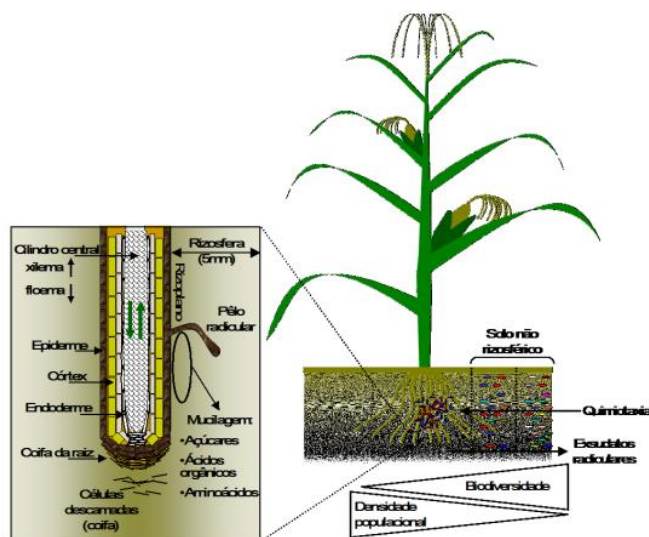


Figura 2. Estrutura geral da raiz, incluindo o ambiente rizosférico e seus efeitos.

Fonte: Adaptado de Maier et al. (2000).

O uso de BPCVs na biotecnologia tem se intensificado, incluindo a produção de antibióticos e outras moléculas bioativas, aplicação nos processos de biorremediação e nas técnicas de transgenia. A principal característica destes micro-organismos é a de favorecer o desenvolvimento vegetal por diferentes mecanismos, onde destacam-se a maior disponibilização de nutrientes seja pela fixação biológica de nitrogênio (FBN), pela solubilização de fosfatos, ou através de mecanismos indiretos como a produção de fitohormônios e o consequente aumento do volume radicular (LUGTENBERG e KAMILOVA, 2009).

Os principais gêneros de BPCVs incluem *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Acetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Herbaspirillum* e *Burkholderia*. A partir destes gêneros, várias formulações comerciais estão disponíveis para uso como inoculantes, desenvolvidas principalmente para gramíneas (KOKALIS-BURELLE et al., 2006).

Com base nos efeitos benéficos das BPCV, os estudos utilizando misturas de inoculantes são muito promissores (Berg 2009). Benefícios promovidos pela interação planta x BPCV incluem aumentos na taxa de germinação de sementes, crescimento foliar, produtividade, área foliar, teor de clorofila, a absorção de nutrientes, teor de proteína, tolerância a estresses, massa de parte aérea e raízes, controle biológico e atraso na senescência (YANG et al., 2009).

O gênero *Azospirillum* abrange um grupo de BPCV de vida livre amplamente distribuído. Tem sido demonstrado que o *Azospirillum* estimula o crescimento e a produtividade de inúmeras espécies de plantas, sendo que muitas dessas plantas têm importância agrônômica e ecológica (BASHAN e HOLGUIN, 1997). É um gênero de vida livre, encontrada em quase toda a Terra (BASHAN, 1999). Os primeiros isolados foram primeiramente descritos como pertencentes ao gênero *Beijerinckia*, sendo então reclassificados para o gênero *Spirillum lipoferum* (NCBI, 2012) devido a facilidade de cultivo utilizando ácidos orgânicos como fonte de carbono e ao formato espiralóide observado em determinadas condições de cultivo (HARTMANN; BALDANI, 2006).

Azospirillum é um gênero versátil, o qual coloniza principalmente gramíneas, embora também realize interações com outras famílias de plantas (JUGE et al., 2012; WHITE-JR et al., 2012). Na maioria das espécies vegetais estudadas, a colonização bacteriana ocorre principalmente na zona de alongamento da raiz (PEREYRA et al., 2012). *Azospirillum* sp. pode existir de forma livre ou endofiticamente, e em qualquer dos casos pode realizar a fixação do nitrogênio atmosférico convertendo-o em íon amônio, em condições de baixa

aeração ou em baixos níveis deste nutriente, de forma que seja facilmente utilizado pelas plantas. (SAIKIA et al., 2012; WHITE-JR et al., 2012).

O aumento da produtividade devido à inoculação com *Azospirillum* nos ensaios conduzidos no Brasil foi correlacionado não só com o aumento do N, mas também com outros nutrientes, como o P e K, fato também relatado em outros países (BASHAN & HOLGUIN, 1997; STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000; BASHAN ET AL., 2004).

Azospirillum produz substâncias promotoras, como o ácido indol acético (IAA), giberelinas e citocininas, atuando na fisiologia de raízes das plantas, podendo promover aumento da massa radicular e numa maior superfície específica, auxiliando na melhor exploração do solo e na captação de água e nutrientes (TAIZ e ZEIGER, 2012)

Determinados isolados bacterianos podem apresentar certa eficiência em alguns genótipos de plantas como milho, mas não em outros (MIYAUCHI et al., 2008); por outro lado algumas bactérias são capazes de colonizar tanto a rizosfera quanto o interior das raízes, assim a utilização de BPCV permite elevar a contribuição da FBN apresentando com isso benefícios não só econômicos mas também ambientais.

A rizosfera é um habitat mutável, sendo que a sua composição e a sua estrutura são influenciadas durante o ciclo vegetativo. Suas dimensões também são determinadas pelo tipo, composição e umidade do solo. A planta pode modificar as características químicas do solo nas proximidades de suas raízes através dos fragmentos descascados da superfície das raízes e dos exsudatos radiculares solúveis, enriquecendo o solo com uma variedade de compostos orgânicos; do consumo de O₂ e liberação de CO₂ modificando a atmosfera radicular; da absorção seletiva de íons nutritivos, diminuindo a concentração de sais; e do consumo de H₂O, reduzindo a umidade, etc. (COMPANT, 2010). A presença das raízes e as modificações físicas e químicas que elas produzem criam um ecossistema especializado, onde o crescimento das populações na comunidade microbiana pode ser beneficiado ou inibido. As propriedades físico-químicas da rizosfera têm elevada estabilidade, que, associadas ao fornecimento constante de substratos orgânicos e fatores de crescimento, favorecem intensa atividade metabólica das populações, influenciando diretamente e positivamente o tempo de geração microbiano (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

No contexto de eventos que ocorrem na interface raiz-solo, a interação microrganismo-microrganismo é crucial para entendermos a característica do processo dinâmico da estabilidade da rizosfera e a manutenção da reciclagem de nutrientes, onde estes microrganismos que interagem com a rizosfera participam de vários ciclos, tais como: nitrogênio, carbono, fósforo e enxofre. Estes microrganismos interagem com a raiz das

plantas, suprem nutrientes e tem uma participação ativa na nutrição e crescimento das plantas (GONZALEZ, 2012).

A comunidade microbiana na rizosfera é representada por populações diversificadas e numerosas em estado de equilíbrio dinâmico, refletindo o ambiente físico, químico, biológico e suas relações. (MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

O processo de interação dos microrganismos pertencentes a este grupo com as plantas se dá primeiramente pela disponibilização de substratos pela planta, que nada mais são que as rizodeposições, como exsudatos e lisados, que são utilizados como fonte de energia para as rizobactérias, as quais irão multiplicar-se e se estabelecer na rizosfera de forma que se associem às plantas não leguminosas (MOREIRA et al., 2010). Como diazotróficos de vida livre, as BPVC colonizam preferencialmente o rizoplane e a rizosfera onde os exsudatos estão envolvidos nessa associação.

4.4 Métodos e técnicas para estudo de exsudatos radiculares e efeito sobre os microrganismos

4.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas - UPLC-MS

Como técnica analítica das mais versáteis e das mais sensíveis, a espectrometria de massas (MS) é atualmente uma das ferramentas analíticas valiosas em diversos estudos nas áreas de Biologia, Ciências Médicas e Ciências Tecnológicas. É possível determinar a massa molecular e quantificar biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos, lipídeos e oligonucleotídeos, e também fragmentá-las de forma a elucidar sua estrutura e confirmar sua identificação. Para análise por MS, as amostras podem ser inseridas diretamente no espectrômetro de massas, ou o equipamento pode ser acoplado a uma técnica de separação, como a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) ou a eletroforese capilar (CHIARADIA, et al., 2008).

O acoplamento de um MS a HPLC que é um método de alta seletividade e eficiência de separação, resulta em um sistema determinado LC-MS que então torna-se uma ferramenta poderosa nas análises de misturas complexas, para determinação de compostos ao nível de traços (LI, et al., 2009). A possibilidade de automação aliada à rapidez das análises permite que grande número de amostras seja analisado em curto período de tempo (segundos ou minutos para cada amostra).

A análise por MS (Figura 3) consiste na geração de íons com base em compostos (orgânicos ou inorgânicos) por meio de um método de ionização apropriado. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação massa–carga (m/z) em um analisador de massas e detectados qualitativamente e/ou quantitativamente por meio de um detector, o qual “conta” os íons. A magnitude do sinal elétrico em função da razão m/z é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (GROSS, 2004).

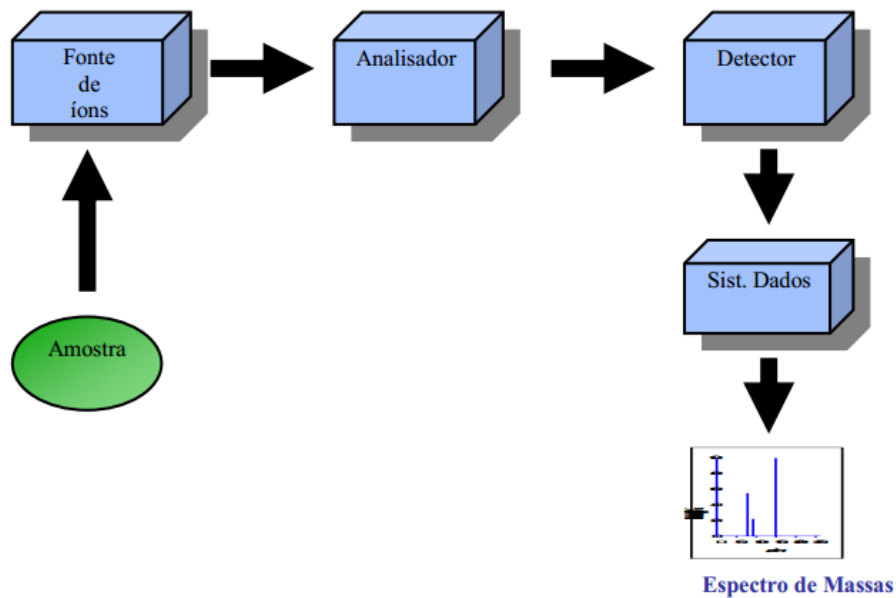


Figura 3. Componentes básicos de um espectrômetro de massas.

Dentre as técnicas de ionização a denominada ionização por eletrospray (ESI) é considerada uma técnica branda de ionização no qual fornece, intrinsecamente, poucos íons para ajudar na confirmação da identidade dos analitos de interesse em baixos níveis de concentração, por meio da alta corrente iônica dos poucos íons gerados.

Desde seu surgimento, ESI-MS tornou-se uma das técnicas analíticas mais poderosas e amplamente utilizadas. Dentre as vantagens de ESI-MS incluem alta sensibilidade e seletividade, facilidade de uso e consumo reduzido de amostra. Uma ampla variedade de substâncias pode ser analisada, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, e até mesmo complexos metálicos, desde que sejam iônicos ou apresentem sítios ácidos ou básicos (LOO, 2000).

Uma outra vantagem da utilização desta técnica é a quantificação dos analitos com base na área gerada por EIC, essa ferramenta permite que os íons de interesse sejam isolados tornando-se possível calcular as porcentagens dos compostos presentes na amostra.

Há essencialmente três características que fazem com que ESI seja considerada uma técnica distinta das outras técnicas de ionização. A primeira destas características é a capacidade para

produzir íons multiplamente carregados, reduzindo assim a razão m/z , de tal modo que é possível analisar compostos de elevada massa molecular. A segunda característica é que as amostras a serem analisadas devem ser introduzidas em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. Por último, ESI é uma técnica de ionização suave, provocando pouca (ou nenhuma) fragmentação dos analitos estudados (HECK e HUEVEL, 2004).

O uso dessa técnica vem ganhando destaque na caracterização de compostos orgânicos presentes em amostras de materiais vegetais entre outros, é possível analisar quantitativa e qualitativamente as amostras quando comparadas aos padrões pré determinados ou se comparando as massas em um banco de dados.

PRUKODINA et al. (2012), utilizou a técnica de LC-MS para realizar uma análise rápida de isoflavonas em amostras de broto de feijão mungo, para isso ele utilizou como fase móvel uma mistura de metanol e ácido fórmico em uma coluna C18, utilizando como fonte ionizadora ESI; como padrões foram usados diferentes flavonoides, como resultado foram detectados 14 analitos e quantificados; incluindo 5 isoflavonas, prenilada, flavonas, flavanonas, cumarina, isoflavonóides e flavonóides eram em sua maioria presentes como glicosídeos, enquanto a única aglicona genisteína foi detectada.

ZHANG et al, (2014) utilizou a mesma técnica para identificar os ácidos orgânicos presentes em exsudatos radiculares de pepino e banana, a fim de determinar o papel desses compostos na interação planta/bactéria.

4.4.2 Ressonância Magnética Nuclear – RMN

A técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) é mais utilizada na determinação de compostos orgânicos e, recentemente, vem crescendo na análises de compostos inorgânicos. A ressonância magnética nuclear é uma ferramenta muito potente no estudo de caracterização de materiais, pode ser utilizada eficientemente para se detectar interações entre moléculas dissolvidas estudando as modificações dos seus espectros e quantificando os deslocamentos químicos encontrados para os diversos grupamentos atômicos que constituem as moléculas. É empregada hoje como um poderoso instrumento na física, química, medicina, biologia, agricultura e, mais recentemente, na chamada informação quântica.

A caracterização de materiais tem a necessidade de gerar o maior número de informações precisas tanto sobre a estrutura química, com relação à morfologia/propriedade, quanto o comportamento dinâmico molecular, que geram respostas sobre o comportamento mecânico dos materiais. Várias técnicas consideradas convencionais são empregadas em

conjunto para se obter uma resposta da composição de determinadas soluções. As técnicas não convencionais, como a ressonância magnética nuclear (RMN), podem ser empregadas devido a sua potencialidade e ser uma técnica alternativa e efetiva na caracterização de diversas substâncias.

5. REFERÊNCIAS

APPLIED BIOSYSTEMS (Org). **Espectrometria de massas e suas aplicações**. São Paulo: Abi Expert Training Center, 2005. 40 p.

AVERNA, E. TIFFANY A., et al. A Decrease in ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopically Determined Citrate in Human Srminal Fluid Accompanies the Deveopment os Prostate Adenocarcinoma. **The Journal of Urology**. February, 2005, Vol. 173, pp. 433-438.

BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J., VAN LOON, L.C. (2007) Induced systemic resistance by fluourescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 97: 239-243.

BADRI, D.V.; VIVANCO, J.M. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*, 32:666–681, 2009.

BALDANI, V.L.D.; OLIVEIRA, E.; BALOTA, E.; BALDANI, J.I.; KIRCHHOF, G.; DÖBEREINER, J. Burkholderia brasilensis sp. nov., uma nova espécie de bactéria diazotrófica endofítica. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.69, n.1, p.116, 1997a.

BALDANI, J.I.; CARUSO, L.; BALDANI, V .L.D.; GOI, R.S.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non legumes plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.922-928, 1997b.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J.Characterization of of Herbaspirillum 46 seropedicae gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen- fixing bacterium. *International Journal of Systematic Bactertology*, Reading, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.;BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; DÖBEREINER, J. Emended description of Herbaspirillum; Inclusion of Pseudomonas rubrisubalbicans, a mild plant pathogen, as Herbaspirillum rubrisubalbicans comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as Herbaspirillum species 3. *International Journal of Systematic Bactertology*, Reading, v. 46, n. 3, p. 8002-810, 1996.

BARASSI, C. A. et al. Seed inoculation with Azospirillum mitigates NaCl effects on lettuce. **Scientia Horticulturae**, v. 109, n. 1, p. 8–14, jun. 2006.

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

BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 3, p. 246–256, 1 jul. 1999.

BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; DE-BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relations **physiological, molecular, agricultural, and environmental advances** (1997-2003). *Can J Microbiol* 50:521-577, 2004.

BASHAN, Y. Interactions of *Azospirillum* spp. in soils: a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 29, n. 3, p. 246–256, 1 jul. 1999.

BERG G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 11-18, 2009.

BRENCIC, A.; WINANS, S. C. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 69, 155 – 194, 2005.

BORNEMAN, J.; SKROCH, P W.; O'SULLIVAN, K. M.; PALUS, J.A.; RUMJANEK, N.G.; JANSEN, J.L.; NIENHUIS, J.; TRIPLETT, E.W. **Molecular Microbial Diversity of an Agricultural Soil in Wisconsin**. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1935-1943. 1996.

BOTTINI, R.; FULCHIERI, M.; PEARCE, D.; PHARIS, R. Identification of gibberelins A1, A3, and iso-A3 in cultures of *A. lipoferum*. **Plant Physiology**, v.90, p.45-47, 1989.

CANGAHUALA-INOCENTE, G. C. et al. Identification of six differentially accumulated proteins of *Zea mays* seedlings (DKB240 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. **European Journal of Soil Biology**, v. 58, p. 45-50, Sep-Oct 2013.

CALDARELLI, C.E.; BACCHI, M.R.P. Fatores de influência no preço do milho no Brasil. **Nova Economia**, v.22, p.141-164, 2012.

CARDOSO, E. J. B. N.; FREITAS, S. S. Rizosfera. In: CARDOSO, E. J. B.N.; ISAI, S. M.; NEVES, M.C.P. **Micorbiologia do solo**, Campinas-SP. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, cap. 4, p. 41-57, 1992.

CARNEIRO, M. A. C. **Características bioquímicas do solo em duas cronosseqüências de reabilitação em áreas de mineração de bauxita**. 2000. 166 p. Tese (Doutorado) - Departamento Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas na análises de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**. V.31. n. 3. P. 623-636, 2008.

COELHO, A.M. et al. **Nutrição e adubação do milho**. In: CRUZ, J.C. (eds.) Sistema de Produção. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2010.

COLLI, W. Organismos transgênicos no Brasil: regular ou desregular?. Revista Universidade de São Paulo, n.89, p.148- 173, 2011. Disponível em: . Acesso em: 21 set. 2015.

COMPANT, S.; CLEMENT, C.; SESSITSCH, A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 42, n. 5, p. 669-678, May 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_01_09_17_44_20_boletim_graos_setembro_2015.pdf>. Acesso em: 19 de out. 2015.

CORREA, O.S.; ROMERO, A.M.; SORIA, M.A.; DE ESTRADA, M. *Azospirillum brasilense*-plant genotype interactions modify tomato response to bacterial diseases, and root and foliar microbial communities. In: CASSÁN, F.D.; GARCIA DE SALAMONE, I. (Ed.) ***Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina***. Argentina: Asociación Argentina de Microbiología, 2008. p.87-95.

CURL, E. A.; TRUELOVE, B. **The rhizosphere**. New York: Springer-Verlag, 1986. 288p.

CRUZ, J.C. et al., Manejo da cultura do Milho. In: EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo. Sete Lagoas, 2006. (EMBRAPA/NPMS/Circular técnica, 87).

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

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com *Azospirillum brasilense*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.16, n.9, p.645-651, 1996.

DOBBELARE, S.; VANDERLEYDERN, J.; OKON, Y. Plant-growth promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 22:107-149, 2003.

DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbiosis in tropical grasses: Characterization of microorganism and nitrogen- fixing sites. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION, Washington, 1976. Proceedings... Washington: **Washington State University**, 1976. p. 518-538.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V.D.L.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosa. Brasília: **EMBRAPA-SPI**: Itaguaí, RJ: EMBRAPA-CNPAB, 1995. 60p

DOBBELAERE, S. & OKON, Y. The plant growth-promoting effect and plant responses. In: Associative and Endophytic Nitrogen-Fixing Bacteria and Cyanobacterial Associations (Elmerich, C.; Newton, W.E. eds.), p. 145-170. **Springer**, Dordrecht, The Netherlands. 2007.

EMPRAPA MILHO E SORGO. Cultivo do Milho, 6. ed., 2010. Disponível em:

<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/index.htm>Acesso em: 20 out. 2011.

FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. **Produção de milho**. Guaíba, Agropecuária, 2000. 360p.

FALLIK, E.; OKON, Y. The response of maize (*Zea mays*) to *Azospirillum* inoculation in various types of soils in the field. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, n. 5, p. 511–515, set. 1996b.

FANCELLI, A.L. Milho: ambiente e produtividade. In: FANCELLI, A.L. & DOURADO-NETO, D., eds. Milho: **Estratégias de manejo para alta produtividade**. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2003. p.174-197.

FAO. **FAO**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>.

FERNANDES, S.A.P. **Avaliação de parâmetros químicos e biológicos em diferentes sistemas de manejo do solo**. Piracicaba, 1995, 98p. (Mestrado – Esalq/Universidade de São Paulo).

FERREIRA, C. R.; SOUZA, G. H.; RICCIO, M. F.; CATHARINO, R. R.; PONTES, J.H.; BASSO, A. C.; JÚNIOR, J. C.; PERECIN, F.; EBERLIN, M. N. Mass spectrometry fingerprinting of media used for in vitro production of bovine embryos. **Rapid Communications of Mass Spectrometry**, v. 23, n. 9, p. 1313-1320, 2009.

GONZALEZ, A.; KING, A.; ROBESON II, M. S.; SONG, S.; SHADE, A.; METCALF, J. L.; KNIGHT, R. Characterizing microbial communities through space and time. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p.431-436, 2012.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. Heidelberg, Germany: Springer Verlag, 2004. 518 p.

HARBONE, J. B. **Comparative biochemistry of the flavonoids**. New York 1967.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; VAN ELSAS, J. D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HARTMANN, A.; BALDANI, J. I. The Genus *Azospirillum*. In: DWORKIN, M. et al. (Eds.). **The Prokaryotes**. 5. ed. New York: Springer New York, 2006. p. 919.

HECK, A. J. R.; Van den Heuvel, R. H. H. **Mass Spectrom**. n. 23, p.368-389, 2004.

HERRMANN, L.; LESUEUR, D. Challenges of formulation and quality of biofertilizers for successful inoculation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 8859-8873, 2013.

HAICHAR, Z. F.; SANTANELA, C.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Root exudates mediated interactions below ground. **Soil biology e Biochemistry**. v.77, p. 69-80, 2014.

HUERGO, L.F.; MONTEIRO, R.A.; BONATTO, A.C.; RIGO, L.U.; STEFFENS, M.B.R.; CRUZ, L.M.; CHUBATSU, L.S.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Regulation of nitrogen

fixation in *Azospirillum brasilense*. In: CASSÁN, F.D.; HUNGRIA, M.; JOHNSTON, A. W. B.; PHILIPS, D. A. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 5, p. 199-203, 1992.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A. **Importância do sistema de semeadura na população microbiana do solo**. Comunicado Técnico/Embrapa-Soja, Londrina, Paraná, no 56, 1997, p.1-9.

HUNGRIA, M. CAMPO, R. J. & MENDES, I. C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja**. Londrina: Embrapa soja, 2001. (Embrapa Soja. Circular Técnica 35/Embrapa Cerrados. Circular técnica 13). 48p.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J.; MENDES, I. C.; GRAHAM, P. H. Contribution of biological nitrogen fixation to the N nutrition of grain crops in the tropics: the success of soybean (*Glycine max* L. Merr.) in South America. In: SINGH, R. P.; SHANKAR, N.; JAIWAL, P. K., eds. **Nitrogen nutrition and sustainable plant productivity**. Houston: Studium Press, LLC, 2005.

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

JAMES, E. K.; BALDANI, J. I. The role of biological nitrogen fixation by non-legumes in the sustainable production of food and biofuels. **Plant and Soil**, v. 356, p. 1-3, 2012.

JUGE, C. et al. Growth and biochemical responses of soybean to double and triple microbial associations with Bradyrhizobium, Azospirillum and arbuscular mycorrhizae. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 147–157, out. 2012.

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 & Biochemistry**, v.42, n.1, p.1-13, 2010.

KUKLINSKY-SOBRAL, J.; ARAÚJO, W. L.; MENDES, R.; GERALDI, I. O., PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; AZEVEDO, J. L. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, 6 (12): 1244–1251, 2004.

KUJUR, M.; GARTIA, S.K.; PATEL, A.K. Quantifying the contribution of different soil properties on enzyme activities in dry tropical ecosystems. **ARPN Journal of Agricultural and Biological Science**, v.7, p. 763-772, 2012.

KURTBÖKE, D.I.; SWINGS, J.; STORMS, V. 2004. MICROBIAL GENETIC RESOURCES AND BIODISCOVERY. In: Microbial Genetic Resources and Biodiscovery WFC Publications, UK.LUGTENBERG, B. E KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, p. 541-556, 2009.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e espectrometria de massas: finalmente compatíveis. **Scientia Chromatographica**. V.1. n.2. p. 35-61, 2009.

- LI, H.; SMITH, M. L.; CHIESA, O. A.; KIJAK, P. J. Determination of sulfadimethoxine and 4N-acetylsulfadimethoxine in bovine plasma, urine, oral fluid, and kidney and liver biopsy samples obtained surgically from standing animals by LC/MS/MS. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 3, p. 237-246, 2009.
- LISBOA, B.B.; VARGAS, L.K.; SILVEIRA, A.O.; MARTINS, A.F. & SELBACH, A. Indicadores microbianos de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo. *R. Bras. Ci. Solo*, 36:45-55, 2012.
- LIMA, L. S.; OLIVARES, F. L.; OLIVEIRA, R. R.; VEJA, R. G.; AGUIAR, N. O.; CANELLAS, L. P. Root exsudate profiling of maize seedlings inoculated with *Herbaspirillum seropedicae* and humic acids. **Chemical and biological technologies in agriculture**. 1:23, 2014.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- Loo, J. A. *Int. J. Mass Spectrom.*, n. 200, p. 175-186, 2000.
- MAIER, R. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. **Environmental Microbiology**, 1a. edição. San Diego: Academic Press, 2000.
- MAGALHÃES, P.C.; DURÃES, F.O.M.; OLIVEIRA, A. C.; GAMA, E. E. G. Efeitos de diferentes técnicas de despendoamento na produção de milho. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 56, n. 1, p. 77-82 jan/mar.1999.
- MAHAFFEE, W.F.; KLOEPPER, J.W. Applications of plant growth-promoting rhizobacteria in sustainable agriculture. *In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (eds) Soil biota: management in sustainable farming systems*. CSIRO, Melbourne, Australia, p. 23–31. 1994.
- MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal Experimental Botany**, 55: 27-34, 2004.
- MARTINOIA, E., KLEIN, M., GEISLER, M., BOVET, L., FORESTIER, C., KOLULISAOGLU, U., MULLER-ROBER, B., SCHLUZ, B. **Multifunctionality of plant ABC transporters: more than just detoxifiers**. *Planta*, 214:345–355, 2002.
- MAZZOLA, A.A. Protocolo de Testes de Aceitação em Equipamentos de Imagem por Ressonância Magnética. **Radiol Bras**;38(3): 195-204. 2005.
- Mikhalkin, A. P.; *Colloid J.* 1994, 56, 336.
- MIYAUCHI, M. Y. H.; LIMA, D. S.; NOGUEIRA, M. A.; LOVATO, G. M.; MURATE, L. S.; CRUZ, M. F.; FERREIRA, J. M.; ZANAGRO, W.; ANDRADE, G. Interactions between

diazotrophic bacteria and mycorrhizal fungus in maize genotypes. **Scientia Agricola**, v.65, n. 5, p. 525-531, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; DA SILVA, K.; NÓBREGA, R. S. A.; DE CARVALHO, F. Bactérias diazotróficas associativas: diversidade, ecologia e potencial de aplicações. **Comunicata Scientiae**, v.1, n.2, p.74-99, 2010.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2002. 625p.

NAIMAN, A. D.; LATRÓNICO, A.; SALAMONE, I. E. G. DE. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: Impact on the production and culturable rhizosphere microflora. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 1, p. 44–51, jan. 2009.

Nardi, S., Concheri, G., Sturaro, A., Rella, R., Parvoli, G. (2000) Soil organic matter mobilization by root exudates. *Chemosphere*, 41:653–658.

NCBI. **Taxonomy Browser**. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=191>>.

NIELSEN, K.M.; VAN ELSAS, J.D. Stimulatory effects of compounds present in the rhizosphere on natural transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 in soil. **Soil Biol. Biochem.** 33:345–357. 2001.

NOVAKOWSKI, J.H. et al. **Efeito residual da adubação nitrogenada e inoculação de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho**. Semina: Ciências Agrárias, v.32, p.1687-1698, 2011. Disponível em: . Acesso em 11 ago. 2013

OBURGER, E., DELL'MAOUR, M., HANN, S., WIESHAMMER, G., PUSCHENREITER, M., WENZEL, W.W. (Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. **Environmental and Experimental Botany**, 87:235-247, 2012.

OLIVEIRA, A.A.R. & SANDERS, F.E. **Effect of management practices on mycorrhizal infection, growth and matter partitioning in field-grown bean**. Pesquisa agropecuária brasileira, v.34, n.7, p.1247-1254, 1999.

OKON, Y.; LABANDERA-GONZALEZ, C.A. Agronomic applications of *Azospirillum*: an evaluation of 20 years worldwide field inoculation **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, p.1591-1601, 1994

OKON, Y. & VANDERLEYDEN, J. Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News*, 63:364-370, 1997.

PEACOCK, A.D.; MULLEN, M.D.; RINGELBERG, D.B.; TYLER, D.D.; HEDRICK, D.B.; GALE, P.M. & WHITE, D.C. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate. **Soil Biology and Biochemistry**, v.33, p.1011-1019. 2001.

PECHANOVA, O. et al. Maize proteomics: An insight into the biology of an important cereal crop. **Proteomics**, v. 13, n. 3-4, p. 637-662, 2013.

PEREYRA, M. A. et al. A better water status in wheat seedlings induced by *Azospirillum* under osmotic stress is related to morphological changes in xylem vessels of the coleoptile. **Applied Soil Ecology**, v. 53, p. 94–97, fev. 2012.

PERRIG, D.; BOIERO, L.; MASCIARELLI, O.; PENNA, C.; CASSÁN, F.; LUNA, V. Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and their implications for inoculant formulation **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, p.1143-1150, 2007.

PRUKODINA, E. A.; HAVLICEK, L.; AL-MAHARIK, N.; LAPCIK, O.; STRAND, M.; GRUZ, J. Rapid UPLC-ESI-MS/MS method for the analysis of isoflavonoids and other phenylpropanoids. **Journal of food and analysis**. V. 26, p. 36-42, 2012.

PUGLISI, E., FRAGOULIS, G., RICCIUTI, P., CAPPA, F., SPACCINI, R., PICCOLO, A., TREVISAN, M., CRECCHIO, C. Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zea mays* L.). *Chemosphere*, 77:829–837, 2009.

RAAIJMAKERS, J.M.; WELLER, D.M; THOMASHOW, L.S. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. **Applied Environmental Microbiology**, 63: 881-887. 1997.

RIBAUDO, C. M. et al. *Azospirillum* sp. Promotes Root Hair Development in Tomato Plants through a Mechanism that Involves Ethylene. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 25, n. 2, p. 175–185, 16 jun. 2006.

REIS JUNIOR, F.B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1139-1146, 2008.

REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. Fixação Biológica de Nitrogênio: uma revolução na agricultura. Em: Fábio Galape e Solange Rocha. **Biociência: estado de arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados: 1ª edição, 2011. p. 247.

RESSONICO, F. BINDER, C. DEFAGO, G.; MOENNE-LOCCOZ, Y. The type III secretion system of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* KD targets the phytopathogenic Chromista *Pythium ultimum* and promotes cucumber protection. **Mol. Plant Microbe Interact.** v.18, p. 991-1001, 2005.

RODRIGUEZ, H.; GONZALEZ, T.; GOIRE, I.; BASHAN, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Aturwissenschaften**, v.91, p.552-555, 2004.

RODRIGUES, T. C.; TAVARES, M. I. B.; PRETO, M.; SOARES, I. L. & MOREIRA, A. C. F. ROVIRA, A. D. Plant root excretions in relation to the rhizosphere effect. *Plant and Soil*, VII, – Inter. J. Polym. Mater., n. 57, p.1119 (2008).

- ROBERTSON, G.; VITOUSEK, P. Nitrogen in Agriculture: Balancing the Cost of an Essential Resource. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 34, p. 97-125, 2009.
- SALAMONE, I. G. *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología, Argentina, 2008. p.17-35.
- SHAW, L. J.; MORRIS, P.; HOOKER, J. E. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1867-1880, Nov 2006.
- SAIKIA, S. P. et al. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non leguminous crops. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 6, p. 1085–1102, 2012.
- SCHNABLE, P. S. The B73 maize genome: Complexity, diversity, and dynamics (November, pg 1112, 2009). **Science**, v. 337, n. 6098, p. 1040-1040, 2012.
- SINGH, P.; KUMAR, V.; AGRAWAL, S. Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, Article ID 426483, 2014. doi:10.1155/2014/426483.
- SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. **Biotecnologia do Solo**. MEC/ESAL/FAEPE/ABEAS, Brasília, p. 125-177, 1988.
- SHAHZAD, S. et al. PGPR with varied ACC-deaminase activity induced different growth and yield response in maize (*Zea mays* L.) under fertilized conditions. **European Journal of Soil Biology**, v. 57, p. 27-34, 2013.
- 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, p.487-506, 2000.
- STOLLER. Guia de fases de desenvolvimento do milho. Fevereiro, 2012.
- STRZELCZYK, E.; KAMPER, M.; LI, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. **Microbiological Research**, v.149, p.55-60, 1994.
- TADRA-SFEIR, M. Z. et al. Naringenin Regulates Expression of Genes Involved in Cell wall Synthesis in *Herbaspirillum seropedicae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 2180-2183, Mar 2011.
- 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* (Reijerinkia) comb., nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 24, p. 967–980, 1978.
- TIEN, T.M.; GASKINS, M.H.; HUBBELL, D.H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.1016-1024, 1979.

TILMAN, D. et al. Agricultural sustainability and intensive production practices. **Nature**, v. 418, n. 6898, p. 671-677, 2002.

VARGAS, L. et al. Early responses of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings to inoculation with beneficial diazotrophic bacteria are dependent on plant and bacterial genotypes. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 127-137, Jul 2012.

VIANA, T. O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista - BA**. Vitória da Conquista - BA: UESB, (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) p. 97; 2012.

WHITE-JR, J. F. et al. A proposed mechanism for nitrogen acquisition by grass seedlings through oxidation of symbiotic bacteria. **Symbiosis**, p. 1–11, 2012.

YAN, J.; WARBURTON, M.; CROUCH, J. Association Mapping for Enhancing Maize (*Zea mays* L.) Genetic Improvement. **Crop Science**, v. 51, n. 2, p. 433-449, 2011.

YAN, Z.; CHEN, Y.; LI, T.; ZHANG, J.; YANG, X. Identification of metabolites of Si-Ni-San, a traditional chinese medicine formula, detection/triple-quadrupole spectrometry. **Journal of chromatography B**. v.885, p. 73-82, 2012.

YAN, J.; WARBURTON, M.; CROUCH, J. Association Mapping for Enhancing Maize (*Zea mays* L.) Genetic Improvement. **Crop Science**, v. 51, n. 2, p. 433-449, 2011.

YANG, J.; KLOEPPER, J.W.; RYU, C. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, 14 (1): 1-4. 2009.

ZHANG, N.; WANG, D.; LIU, Y.; LI, S.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Effects of different root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. **Plant soil**. v.374. p. 689-700, 2014.

Zhao, H. & Li, R. K. Y. - *Polymer*, 47, p.3207 (2006).

6. Capítulo 1: Caracterização Química e Avaliação dos Efeitos dos Exsudatos Radiculares de Genótipos de Milho (*Zea Mays* L.) sobre a Quimiotaxia de *Azospirillum brasilense*

6.1 RESUMO

Exsudatos radiculares produzidos por diferentes espécies vegetais são capazes de induzir respostas quimiotáticas aos microrganismos e mediam interações planta-bactéria. Este trabalho teve como objetivo caracterizar os metabólitos presentes em exsudatos radiculares de dois genótipos híbridos comerciais de milho (DKB 390 e DKB 240), e avaliar o efeito destes exsudatos como indutores na quimiotaxia de *Azospirillum brasilense*. Para caracterização os exsudatos foram obtidos e submetidos a extração em fase sólida, para então serem inseridos no LC-MS em coluna C18 a fim de determinar os metabólitos presentes na composição dos exsudatos. Alguns glicosídeos podem ter sido perdidos durante o processo de extração ou terem ficado retidos na coluna, através da RMN tentamos comprovar a presença deles e confirmar posteriormente com a injeção direta no massas. A análise quimiotática das BPCV aos exsudatos radiculares foi realizada pela metodologia de capilres em câmara quimiotática e através da contagem de UFC do biofilme das sementes. Neste trabalho identificamos 18 compostos no exsudato do híbrido DKB 390 e 13 no DKB 240. Dentre os compostos identificados estão ácidos graxos, ácidos orgânicos, aminoácidos, enzimas, auxinas, citocininas e flavonoides. Observamos diferenças na resposta quimiotática da bactéria para os exsudatos estudados, entretanto o exsudato radicular do genótipo DKB 390 proporcionou contagens de UFC levemente maiores ($7,9 \times 10^3$ UFC/mL) do que o genótipo DKB 240 ($4,9 \times 10^3$ UFC/mL). Isso também pode ser confirmado pela quantificação do biofilme formado pela Ab-V5 nas sementes de milho, onde as sementes embebidas pelos exsudatos apresentaram maiores contagens em relação ao controle e o exsudato DKB 390 os melhores resultados. Concluímos que há diferença na composição química dos exsudatos isso pode estar ligada a ação diferencial nas repostas quimiotáticas dos exsudatos radiculares de genótipos diferentes.

Palavras chave: Exsudatos, UPLC-MS, RMN, Bactérias promotoras de crescimento vegetal (BPCV).

6.2 ABSTRACT

Exudates produced by different plant species are able to induce chemotactic responses to microorganisms and bacteria-plant interactions measured. This study aimed to characterize the metabolites present in root exudates of two commercial hybrid maize genotypes (DKB 390 and DKB 240), and evaluate the effect of these exudates to induce the chemotaxis of *Azospirillum brasilense*. To characterize the exudates were obtained and subjected to solid phase extraction, then to be inserted into the LC-MS C18 column to determine the metabolites present in the composition of exudates. Some glycosides may have been lost during the extraction processor or have fied retained on the column by NMR try to prove their presence and then confirm with the direct injection into the masses. The chemotactic analysis of exudates to BPCV was performed by Methodology of capilres in chemotaxis chamber and through the CFU count of the biofilm of the seeds. In this study we identified 18 compounds in the hybrid exudate DKB 390 and the DKB 13 240. Among the identified compounds are fatty acids, organic acids, amino acids, enzymes, auxins, cytokinins and flavonoids. Differences observed in the chemotactic response of bacteria to the studied exudates, however root exudate genotype DKB 390 provided slightly higher CFU counts ($7,9 \times 10^3$ CFU / mL) than the 240 DKB genotype (4.9×10^3 CFU / ml). This can also be confirmed by quantification of biofilm formed by Ab-V5 in corn seeds, where the seeds soaked by exudates showed higher scores in the control and DKB 390 exudate the best results conclude that there is a difference in the chemical composition of exudates that may be linked to action differentiates the chemotactic responses of root exudates of different genotypes.

Keywords: Exudates, UPLC-MS, NMR, Bacteria promoting plant growth (BPGV)

6.3 INTRODUÇÃO

Azospirillum é um gênero versátil de BPVC, atuando principalmente na colonização de gramíneas, realizando também interações com outras famílias de plantas. Vários autores tem demonstrado a interação positiva entre bactérias e o milho, levantamentos de diversos experimentos realizados em vários países mostram que a inoculação com *Azospirillum* resultou, na maioria dos casos, em um aumento de matéria seca, de produção de grãos e de acúmulo de N nas plantas inoculadas, com baixa disponibilidade de N (SAIKIA et al., 2012).

Está comprovada que BPVC produzem substâncias promotoras de crescimento, e assim estimulam o crescimento das plantas por meio de vários processos, incluindo: fixação biológica de nitrogênio; síntese de hormônios como as auxinas, citocininas e giberelinas além de serem excelentes solubilizados de fosfatos (BABALOLA, 2010).

A eficiência na promoção de crescimento vegetal por microrganismos, depende basicamente da sua resposta oportuna a química estímulos liberados pelas plantas, a sua concorrência ou interação com outros microrganismos e persistência ao longo do período de crescimento.

As substâncias químicas secretadas pelas raízes no solo são conhecidas como exsudados; a exsudação de compostos orgânicos e inorgânicos é um dos principais mecanismos de adaptação das plantas ao ambiente. Compostos exsudados na rizosfera podem regular a atividade da comunidade microbiana, induzir resistência a herbívoros, estimular simbioses, modificar propriedades químicas e físicas do solo, e inibir o crescimento de espécies de plantas concorrentes. A exsudação radicular é um passo essencial para a adaptação das plantas a diferentes ambientes e inclui a regulação da interação entre plantas e bactérias na rizosfera (OBURGER et al., 2012).

Assim, as raízes das plantas liberam vários compostos como açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, flavonoides, entre outros, tanto este conteúdo como a quantidade em que são liberados são influenciados por diversos fatores, como espécie da planta e estágio de desenvolvimento da planta e também influenciam diferentemente a microbiota do solo, podendo levar a diferentes resultados quanto à colonização radicular (BADRI & VIVANCO, 2009).

Os exsudatos radiculares produzidos por diferentes espécies vegetais são capazes de induzir respostas quimiotáticas sobre a microbiota do solo, mediando interações planta-bactéria. Diferentes grupos de microrganismos (benéficos e patogênicos) são atraídos pelos exsudatos de raiz, um efeito denominado quimiotaxia.

Em sentido geral, quimiotaxia é o movimento quimicamente dirigido desenvolvidos por alguns seres vivos. Esse movimento e as substâncias químicas envolvidas nele, podem ser utilizados por microrganismos com diversas finalidades, como por exemplo a busca por nutrientes para gerar comunicação entre indivíduos na formação de colônias (CARREÑO-LÓPEZ et al, 2009).

A interação de planta/bactéria tem sido tema de pesquisas no mundo todo, independente da cultura, devido ao potencial biotecnológico estimulando o aumento da produtividade das culturas, possibilidade de redução dos custos de produção ao diminuir o volume de adubos nitrogenados, e conseqüentemente, melhor conservação dos recursos ambientais (CESCO et al., 2012).

O uso de exsudatos radiculares como indutores da quimiotaxia de BPCV pode levar a criação de um aditivo para formulações de biofertilizantes. A busca por metodologias capazes de identificar as substâncias envolvidas nessa interação e atração, ajudará a caracterizar os exsudatos radiculares; com a identificação dessas biomoléculas exsudadas por raízes de milho que atuem positivamente sobre essas bactérias podem levar ao desenvolvimento de novos produtos biotecnológicos, para compor formulações biofertilizantes de alta eficiência.

A utilização da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas é um método de alta seletividade e eficiência de separação, resulta em um sistema determinado LC-MS que então torna-se uma ferramenta poderosa nas análises de misturas complexas, para determinação de compostos ao nível de traços, é um valiosa ferramenta para a detecção de analitos presentes em baixas concentrações e triagem um grande número de amostras. Esta técnica, que tem uma maior sensibilidade, maior resolução e um tempo de execução mais curto do que HPLC, recentemente tem sido utilizado para estudar os flavonóides em materiais vegetais. Uma vantagem da utilização desta técnica é a quantificação dos analitos com base na área gerada por EIC, essa ferramenta permite que os íons de interesse sejam isolados tornando-se possível calcular as porcentagens dos compostos presentes na amostra.

Uma outra técnica vem sendo utilizada para detecção rápida de metabólitos e confirmação da presença de determinadas substâncias a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), recebendo destaque no campo de análises qualitativa e quantitativa de componentes em produtos alimentares, de fluidos biológicos e de metabolitos em tecidos e órgãos de seres vivos intactos, uma vez que é uma técnica não invasiva e não destrutiva. Portanto a RMN é uma das mais importantes técnicas para a obtenção de informação física, química, eletrônica e

estrutural das moléculas, de um modo não destrutivo, podendo fornecer informação sobre da estrutura tridimensional e da dinâmica das moléculas no estado líquido ou sólido.

Com isso, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar e quantificar os metabólitos presentes em exsudatos radiculares de milho e avaliar o efeito de exsudatos radiculares e diferentes ácidos orgânicos e flavonoides, como indutor da quimiotaxia entre BPCV *A. brasilense*.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório Multiusuário de Análises de Materiais e Moléculas da Universidade Estadual de Londrina (LAMM-UEL); Laboratório Multiusuário de Espectroscopia da Universidade Estadual de Londrina (ESPEC-UEL) e também no Laboratório de Bioquímica Molecular do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina.

6.4.1 Material vegetal e obtenção de exsudatos radiculares

Foram utilizadas sementes de milho de dois genótipos híbridos comerciais, ambos comercializados pela empresa Dekalb (Monsanto) e gentilmente cedidos pelo Laboratório de Melhoramento Genético de Plantas do Departamento de Biologia Geral – UEL. As características agronômicas dos genótipos de milho utilizados estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Características agronômicas dos genótipos híbridos comerciais utilizados neste estudo.

Genótipo	Tipo	Ciclo	Tipo grão	Porte planta	Cor grão	Transgenia ¹
DKB 240	Híbrido simples	Precoce	Semidentado	2,25 m	Amarelo-alaranjado	Herbicida e insetos
DKB 390	Híbrido simples	Precoce	Duro	2,20 m	Amarelo-alaranjado	Herbicida e insetos

¹Tolerância ao herbicida glifosato pela introdução do gene *cp4 epsps*; tolerância a insetos-praga pela introdução dos genes *cryIab* e *cryIc*.

Para a obtenção dos exsudatos, sementes de ambos genótipos foram superficialmente desinfestadas por imersão em solução de etanol 95% (v/v) por 30 segundos, seguida de imersão em solução de H₂O₂ 5% (v/v) por 10 minutos, e finalmente lavadas por 6 vezes com água deionizada esterilizada (Marsudi et al., 1999). Em seguida, as sementes foram germinadas conforme metodologia adaptada de Neal et al. (2012). As sementes de cada

genótipo, acondicionadas 50 sementes em papel absovente (germitest) dobrado e umedecido com água destilada esterilizada, mantidos em câmara de germinação por 7 a 37 °C. Após o período de germinação, 50 plântulas de cada genótipo foram transferidas para Erlenmeyers e contendo 150 mL de H₂O destilada e esterilizada, mantidas sob agitação orbital de 180 rpm a 27 °C por 24 horas. Ao final deste período, as plântulas foram removidas e a solução obtida seguiu uma filtração em poro de 0,22 µm e liofilização para obtenção do extrato seco. Quando de seu uso, os exsudatos foram utilizados como solução em água destilada esterilizada na concentração de 1g/L.

6.4.2 Determinação da composição química dos exsudatos radiculares de milho por UPLC-MS

Para determinação da composição química dos exsudatos radiculares, utilizou-se 5 mL da solução dos exsudatos de cada genótipo de milho, preparada na concentração de 1g/L. Estas soluções foram submetidas a extração em fase sólida empregando o cartucho de extração Strata-X® (200 mg/3 mL; Phenomemex), conforme o seguinte procedimento: o cartucho foi ativado com 5 mL de metanol e equilibrado com 5 mL de H₂O destilada e esterilizada. Após o carregamento com 5 mL do Exsudato, o cartucho foi lavado com 5 mL de H₂O e, em seguida, os metabólitos foram eluídos com 5 mL de metanol.

Para análise por UPLC-MS foi utilizado um sistema LC20AD UPLC (Shimadzu, Japão) acoplado com um espectrometro de massa do tipo triplo quadruplo (Bruker, Alemanha), equipado com uma fonte de ionização tipo ESI, operando no modo de ionização negativa a uma voltagem de spray de 4500V. Os extratos resultantes da extração em fase sólida foram filtrados em uma membrana de nylon 0,45 µM, e alíquotas de 10 µL foram injetadas em uma coluna KINETEX 5 µm EVO C18 (100Å, 100 × 2,1 mm, Phenomenex). A separação cromatográfica foi realizada a 40 °C, com um fluxo de 0.2 mL/min e uma fase móvel composta do solvente A (0.1% ácido acético em água) e solvente B (metanol), utilizando o seguinte programa: gradiente de 0.01-10 min de 20% a 95% B; 10.0 – 14.0 min de 95% de B, 14.0– 15.0 min de 95% a 20% B e 15.0-20.0 min com 20% B. Para as análises dos espectros de massa obtidos, foi utilizado o software Compass Data Analysis (Bruker) onde buscou-se detectar a presença dos metabólitos pelos valores de relação massa/carga (m/z) utilizando o modo negativo. Os cromatogramas dos íons foram extraídos e a partir das massas detectadas,

foram realizadas buscas nos bancos de dados HMDB e Mass Bank a fim de caracterizar os metabólitos presentes na solução, a busca foi realizada com uma tolerância de 0.03 Da. As análises comparativas entre os dois exsudatos diferentes foram feitas com base na área total de cada cromatograma isolado.

6.4.3 Ressonância Magnética Nuclear

Uma massa de 10 mg dos exsudatos radiculares foi dissolvida em 500 μL de óxido de deutério 99,99% (D_2O), liofilizada duas vezes antes de dissolução em 500 μL de D_2O . Os espectros foram obtidos em temperatura ambiente em um espectrômetro Bruker DRX400 (Bruker GmbH, Rheinstetten, Alemanha) operando a 400 MHz para o hidrogênio ^1H e equipado com uma sonda de detecção inversa de 5 milímetros. Para cada amostra, foram utilizados 32 scans com pulso de 30° e pulso de 90° com presaturação do solvente. Os espectros foram referenciados ao ácido trimetilsilil propanóico (TMSP) como padrão interno a 0,0 ppm.

6.4.4 Injeção direta no espectrômetro de massas

Utilizou-se a solução de exsudatos na concentração de 1 g/L sem passar por extração em fase sólida, diluídos mil vezes em metanos grau HPLC e foi realizada a injeção direta de 500 μL da solução diluída no equipamento do tipo triplo quadruplo (Bruker, Alemanha). Para as análises dos espectros de massa obtidos, foi utilizado o software Compass Data Analysis (Bruker). Os cromatogramas dos íons foram extraídos e a partir das massas detectadas, foram realizadas buscas nos bancos de dados HMDB a fim de caracterizar os metabólitos presentes na solução, a busca foi realizada com uma tolerância de 0.03 Da.

6.4.5 Avaliação da atividade quimiotática de *A. brasilense* Ab-V5 aos exsudatos radiculares de milho, ácidos orgânicos e flavonoides

A bactéria *Azospirillum brasilense* estirpe Ab-V5, considerada promotora do crescimento vegetal e registrada no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para uso em formulações inoculantes para as culturas de milho, trigo e arroz, foi utilizada nos ensaios de quimiotaxia. Esta estirpe encontra-se armazenada sob criopreservação no Laboratório de Bioquímica Molecular da Universidade Estadual de Londrina, a reativação foi realizada sendo a AbV-5 cultivada em meio cultura Dygs líquido (Rodrigues Neto et al, 1986; Anexo I), sob agitação orbital de 180 rpm a 28°C por 24 horas.

Para os ensaios de quimiotaxia, os cultivos de *A. brasilense* foram normalizados para uma população de 1×10^6 células/mL após contagem em câmara de Neubauer e diluição em solução salina esterilizada. Foram preparadas câmaras de quimiotaxia seguindo a metodologia de MANDINBA (1986) adaptada, como descrito na figura 4.

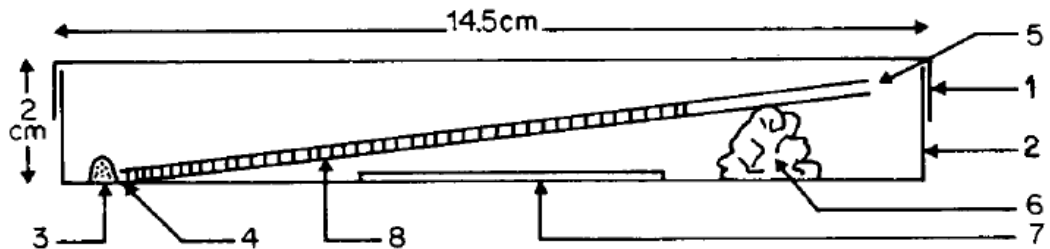


Figura 4. Vista lateral da câmara de quimiotaxia. 1 e 2 placa de Petri; 3 Gotas de suspensão bacteriana ($50\mu\text{L}$ de suspensão com 1×10^6 células/mL); 4 Extremidade de tubo capilar em contato com a suspensão bacteriana; 5 Extremidade de tubo capilar em contato com a atmosfera; 6 Chumaço de algodão; 7 Papel absorvente saturado com água destilada esterilizada; 8 Solução de exsudato radicular na concentração de 1 mg/L .

A câmara quimiotática foi montada a partir de uma placa de Petri esterilizada (2 cm de altura com um diâmetro de 14,5 cm), onde foi disposta uma folha de papel absorvente saturada com água destilada esterilizada, um tubo capilar com volume total de $5 \mu\text{L}$ contendo a solução teste com uma das extremidades em contato com a suspensão de células bacterianas ($50\mu\text{L}$ na concentração de 1×10^6 células/mL) e com a outra extremidade sobre um suporte de algodão, formando um ângulo de aproximadamente 30° com a superfície da placa. Além dos exsudatos radiculares obtidos a partir dos genótipos DKB 240 e DKB 390, foram testadas as seguintes soluções como indutoras de quimiotaxia sobre *A. brasilense*: ácido málico, o flavonóide rutina, frutose, além de água ultrapura utilizada como controle absoluto. Todas as soluções foram testadas na concentração de 1 g/L . Após a montagem das câmaras quimiotáticas para os diferentes compostos testados, estes sistemas foram incubados no escuro a 28°C nos tempos de 30 minutos, 1 hora, 2 horas e 24 horas sendo realizada a determinação da população de *A. brasilense* presente nas soluções de preenchimento dos capilares pela técnica de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Foi utilizada câmaras diferentes para cada composto avaliado sendo realizado em triplicata

Essa contagem foi realizada através do plaqueamento por semeadura em superfície do conteúdo dos capilares em meio de cultura dygs sólido. As avaliações de contagem por UFC foram realizadas em triplicata para cada solução testada. Todos os parâmetros foram submetidas a análise de variância (ANOVA) utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2011),

e na ocorrência de diferenças significativas ($p < 0,5$) foi aplicado o teste de Tukey para separação das médias.

6.4.6 Avaliação da quimiotaxia de sementes de milho tratadas com exsudatos radiculares sobre *Azospirillum brasilense* Ab-V5

A atividade quimiotática de sementes de milho tratadas com exsudatos radiculares de milho foi avaliada em placas quimiotáticas, montadas a partir de placas de Petri (150 x 15mm) contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1951) modificada pela ausência de nitrogênio e pela adição de ágar (6 g/L). Em cada placa de Petri foram dispostas duas sementes do híbrido P30F53H, mediadas por 5 μ L de uma suspensão de células de *A. brasilense* Ab-V5 na concentração de 1×10^8 células mL⁻¹. Os tratamentos consistiram da embebição das sementes por 30 minutos em solução de exsudatos radiculares obtidos dos genótipos DKB 240 e DKB 390 separadamente, preparados em uma concentração de 1 g/L⁻¹. Sementes embebidas por 30 minutos em água destilada esterilizada foram utilizadas como controle do ensaio de quimiotaxia. As placas quimiotáticas foram incubadas sob temperatura de 28 °C por 24 horas, sendo em seguida determinado o número de UFC por semente. A determinação do número de UFC foi realizada após a transferência de cada semente para tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina esterilizada, seguida de agitação vigorosa por 3 min e diluição seriada desta suspensão até a diluição até 10^{-7} . As suspensões assim obtidas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultivo Dygs sólido, e as contagens foram realizadas após a incubação das placas por 24 horas a 28 °C, em triplicata para cada condição testada. Todos os parâmetros foram submetidas a análise de variância (ANOVA) utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2011), e na ocorrência de diferenças significativas ($p < 0,5$) foi aplicado o teste de Tukey para separação das médias.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.5.1 Caracterização química de metabólitos presentes nos exsudatos

A caracterização química dos exsudatos radiculares de milho permite uma visão da influência do metabolismo vegetal sobre a composição nutricional do ambiente rizosférico. É

sabido que as plantas influenciam este ambiente pela rizodeposição, atuando seletivamente sobre determinados grupos taxonômicos pertencentes ao microbioma do solo (ANDREWS et al., 2010). Estes exsudatos atuam como quimioatraentes, fornecendo suporte energético aos grupos microbianos compatíveis às substâncias exsudadas, resultando no aumento das populações bacterianas (Gray e Smith, 2005).

Uma vez identificado o efeito quimiotático dos exsudatos radiculares de milho sobre a BPCV *A. brasilense* Ab-V5, foi realizada a caracterização da composição química dos exsudatos de milho estudados (genótipos DKB240 e DKB 390) utilizando as técnicas de UPLC-MS e RMN. Identificada a composição molecular dos exsudatos, são obtidos subsídios para o desenvolvimento de aditivos para melhoria de formulações inoculantes contendo BPCV, que possam favorecer o processo de colonização das plantas inoculadas e consequentemente aumentar a eficiência da tecnologia de inoculação. A variabilidade na resposta agrônômica ao uso de inoculantes contendo BPCV, entre outros fatores, está relacionada à colonização ineficiente da planta-alvo pelos microrganismos inoculantes (MARTHA JR et al. 2014). Superada esta limitação, espera-se que a substituição de insumos industriais por outros naturais de baixo custo possa levar a diminuição dos custos de produção, menor poluição e menor degradação ambiental (GHOLAMI, A. et al., 2012).

No sentido geral exsudatos radiculares são compostos em sua maioria por flavonoides, aminoácidos, ácidos orgânicos, ácidos graxos entre outros, e a mistura desses metabólitos (exsudatos brutos) estimula a quimiotaxia dos microrganismos e estimula a interação planta/bactéria fazendo com que haja uma maior colonização.

Os exsudatos radiculares influenciam o crescimento quimiotático de bactérias que colonizam a rizosfera pela alteração do ambiente do solo circundante, servindo como substrato para crescimento seletivo de microrganismos do solo, capazes de utilizar eficientemente determinado substrato (PARADA e FREITAS, 2007).

Dentre os compostos exsudados pelas raízes, os flavonoides possuem grande importância como quimioatraente de microrganismos (BERTIN, et al. 2003), atuando diretamente sobre a expressão de genes bacterianos (SHAW, MORRIS & HOOKER, 2006). Em plantas, os flavonóides estão envolvidos no stress proteção (por exemplo, contra a radiação UV, oxidativa e temperatura stress), desenvolvimento, sinalização (trocas de sinais moleculares, induzindo a quimiotaxia), e proteção contra insetos herbívoros e de mamíferos (Gould e Lister, 2006).

A complexidade na composição dos exsudatos radiculares está demonstrada nos cromatogramas de referência dos exsudatos de milho obtidos por UPLC-MS a partir dos íons

isolados EIC (ferramenta permite que os íons de interesse sejam isolados tornando-se possível calcular as porcentagens dos compostos presentes na amostra), as figuras 5 e 6 mostram os picos cromatográficos mais abundantes na composição dos exsudatos através da busca nos bancos de dados Mass bank e HMDB pudemos identificar os compostos encontrados.

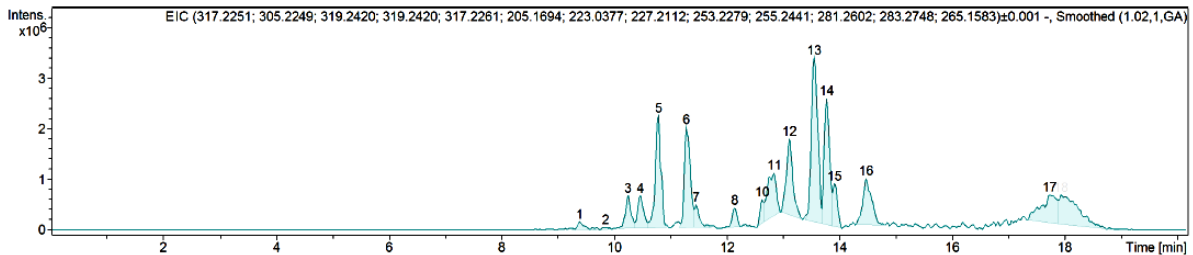


Figura 5: Cromatograma de referência do exsudato radicular do genótipo híbrido de milho DKB 240, obtido por UPLC-MS. Os números acima dos picos representam os picos de interesse isolados por EIC a partir do cromatograma total.

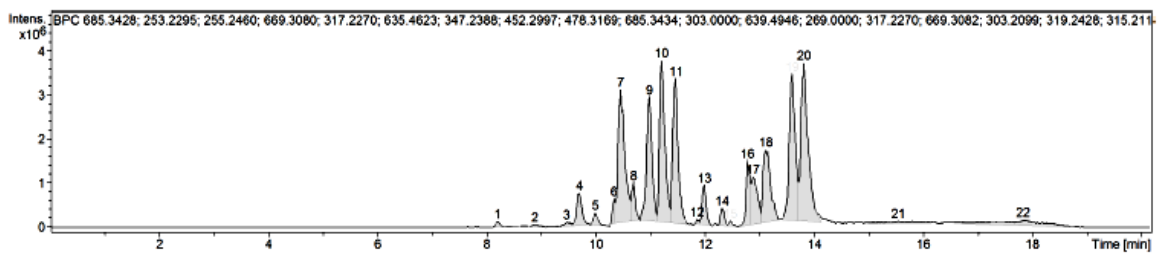


Figura 6: Cromatograma de referência do exsudato radicular do genótipo híbrido de milho DKB 390, obtido por UPLC-MS. Os números acima dos picos representam os picos de interesse isolados por EIC a partir do cromatograma total.

Identificamos 18 compostos presentes no exsudato DKB 390 e 13 no DKB 240, dentre os compostos estão açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos, aminoácidos, enzimas, auxinas, citocininas e os flavonóides; os compostos identificados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Composição química dos exsudatos radiculares de dois genótipos híbridos comerciais de milho (DKB 240 e DKB 390), identificados a partir de UPLC-MS

DKB 390

Composto	Tempo de retenção(min)	Formula	Massa (m/z)	massas observadas (m/z)	Classificação
Ácido fenil acético	10.2	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	318.2351	317.2251	Auxina
Sorgittariol	10.5	C ₂₀ H ₄₂ O ₂	306.2249	305.2249	diterpenos
Rutina	10.5	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	612.4571	611.4571	Flavonóide
Ácido epoxylicosatrienoico	10.8		320.2420	319.2420	precursor de β naftoflavona
Petunidina	11.3	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁺	318.2261	317.2261	antocianina caracterizado como flavonóide
Oxoasmicinona	11.3	C ₃₇ H ₅₀ O ₁₃	636.4586	635.4586	Ácido graxo
Steviobiose	11.4	C ₃₂ H ₅₀ O ₁₃	642.3295	641.4295	Açúcar
Cisteína	12.8	C ₆ H ₁₃ NO ₂	224.0377	223.0377	aminoácido
L-isoleucina	13.1	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	228.2112	227.2112	aminoácido
Crisina	13.3	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	254.2279	253.2279	Flavonóide
ácido octadecynoic	13.3	C ₂₂ H ₂₂ O ₉	280.2440	279.2440	Ácido graxo
Hidroxyfomononetina b-d glucosidase	13.5	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	447.4925	894.9844	enzima catalizadora de reações químicas
Crisina	13.8	C ₁₆ H ₁₂ O ₂	256.2441	255.2241	Flavonóide
Acacetin	14.5	C ₁₆ H ₁₂ O ₂	282.2682	281.2682	Flavonóide
Metil daidzeina	14.5	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	284.2748	283.2748	isoflavona
1,26hexacosanediol	14.5	C ₂₆ H ₅₄ O ₂	397.4926	794.9853	Revestimento de raiz
Tetrametil 6-2 metilbutanol ciclhexano	18.0	C ₁₅ H ₂₂ O ₄	266.1583	265.1583	Precursor de isoflavonas
Adenosina fosfato	18.0	C ₂₀ H ₃₀ N ₁₀ O ₂₅ P ₆	497.492	994.9480	sinese proteica

DKB 240

isopentinil adenosina	8.2	C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₄	336.2363	335.2363	citocinina
Sacarina	10.5	C ₇ H ₅ NO ₃	182.7303		Açúcar
Petunidina	10.5	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁺	319.2261	317.2261	antocianina caracterizado como flavonóide
Eicosatrenoic acid	11.0	C ₂₀ H ₃₄ O ₂	320.2428	319.2428	Acido graxo
Ácido fenil acético	11.4	C ₈ H ₈ O ₂	318.2272	317.2272	Auxina
Adefenina	12.8	C ₂₀ H ₂₅ NO ₂	312.1828	311.1828	anticolinérgico, inibe a ação da acetilcolina
Raminetina	11.2	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	316.2118	315.2118	Flavonóide
Oxoproline	13.6	C ₅ H ₇ NO ₃	127.623	255.2640	ácido orgânico
Isoliquirtigenina	13.6	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.2460	255.2460	Chalcona
Ácido fumarico	13.8	C ₄ H ₄ O ₄	282.2626	281.2626	ácido orgânico
Crisina	13.1	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.229	253.2299	Flavonóide
Glutamato	17.9	C ₅ H ₉ NO ₄	594.9942	1188.9902	Aminoacido

O cromatograma total dos exsudatos dos dois genótipos (Anexo 1), apresentou, vários picos irrelevantes, por esse motivo também fizemos a separação dos íons isolados pela técnica de EIC, lembrando que a maior vantagem de se utilizar esta técnica é poder calcular em porcentagem a quantidade de cada metabólito presente na amostra através das áreas dos picos.

O intuito dessa caracterização foi de desvendar a composição química dos exsudatos radiculares, pois esses afetam a concentração de nutrientes na rizosfera de plantas e indiretamente melhoram atividade da microbiota do solo promovendo a quimiotaxia desses microrganismos, por fornecerem uma rica fonte de energia e nutrientes, resultando no aumento das populações bacterianas em determinada área (Gray e Smith, 2005). Também buscamos identificar os flavonoides presentes nesses compostos; flavonóides são conhecidos por desempenhar um papel na multifuncional rizosfera. (Aoki et al., 2000).

Os flavonoides encontrados nos exsudatos radiculares do genótipo DKB 240 foram: crisina, daidzeína e também petunidina que é uma antocianina caracterizado como flavonóide. A crisina representa 15,33 % da composição total da solução de exsudatos avaliada (pico cromatográfico 1 na Fig. 7a, com tempo de retenção de 13.8 min) seguido raminetina com 11,74%(pico cromatográfico 1 na Fig. 7b, com tempo de retenção de 13.2 min) e Petunidina 11,5 % (pico cromatográfico 1 na Fig. 7c, com tempo de retenção de 10.5 min).

No exsudato radicular do genótipo DKB 390 foram encontrados um número maior de favonóides, além, de uma isoflavona e um precursor de isoflavonas; são esses crisina apresentou maior concentração correspondendo a 16,86% da composição total solução de exsudatos avaliada (pico cromatográfico 1 na Fig. 8a, com tempo de retenção de 13.8 min); petunidina 9,46%(pico cromatográfico 1 na Fig.8b, com tempo de retenção de 11.3 min); rutina 3,07% (pico cromatográfico 2 na Fig. 8c, com tempo de retenção de 10.5 min); apresentando também a isoflavona metildaidzeína 6,4%(pico cromatográfico 1 na Fig. 8d), com tempo de retenção de 14,5 min).

Como dito anteriormente esses compostos tem ação diferenciada, com base nos experimentos realizados no presente trabalho o DKB 390 promoveu uma maior quimiotaxia de *Azospirillum brasilense* em relação ao DKB 240 isso possivelmente pode ser explicado pelo fato de que este composto apresenta um maior número de diferentes flavonoides além da presença de isoflavonas; outra suposta explicação é que também detectamos a presença de uma substância chamada Sagittariol (Fig. 9), é encontrada nas raízes de alguns vegetais. Este composto pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como colensane e

clerodânicos diterpenóides. Estes são diterpenos, envolvidos na sinalização celular e armazenamento de energia, produzem sinais que controlam a expressão de genes, estimulam o crescimento microbiano através da quimiotaxia e também pode sintetizar moléculas de defesa para a rizosfera (Yannai, Shmuel, 2004.).

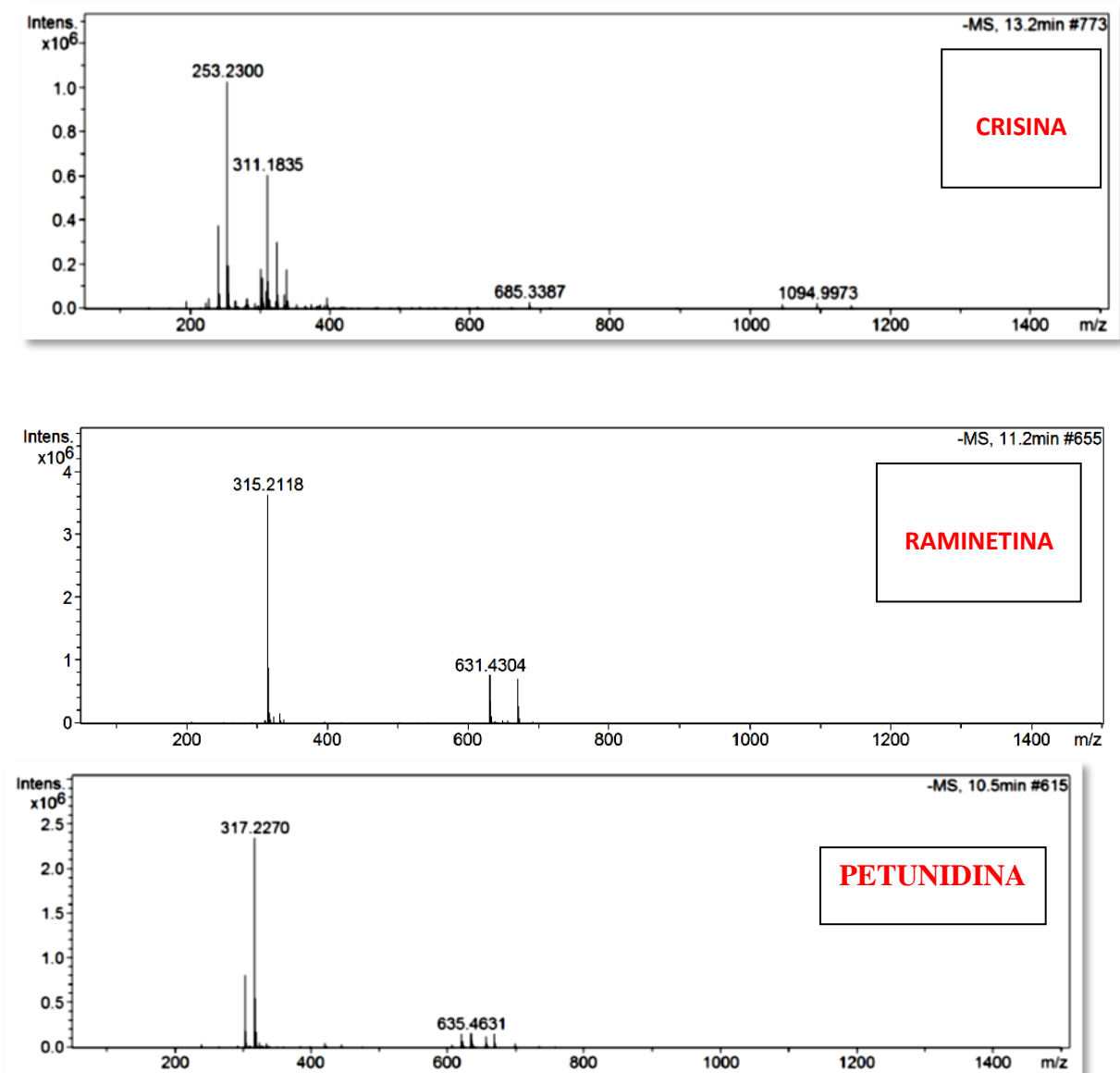


Figura 7: Espectro de massas dos flavonóides encontrados no exsudato radicular do genótipo de milho DKB 240 de forma separada. A- Crisina, b- Raminetina, c- Petunidina.

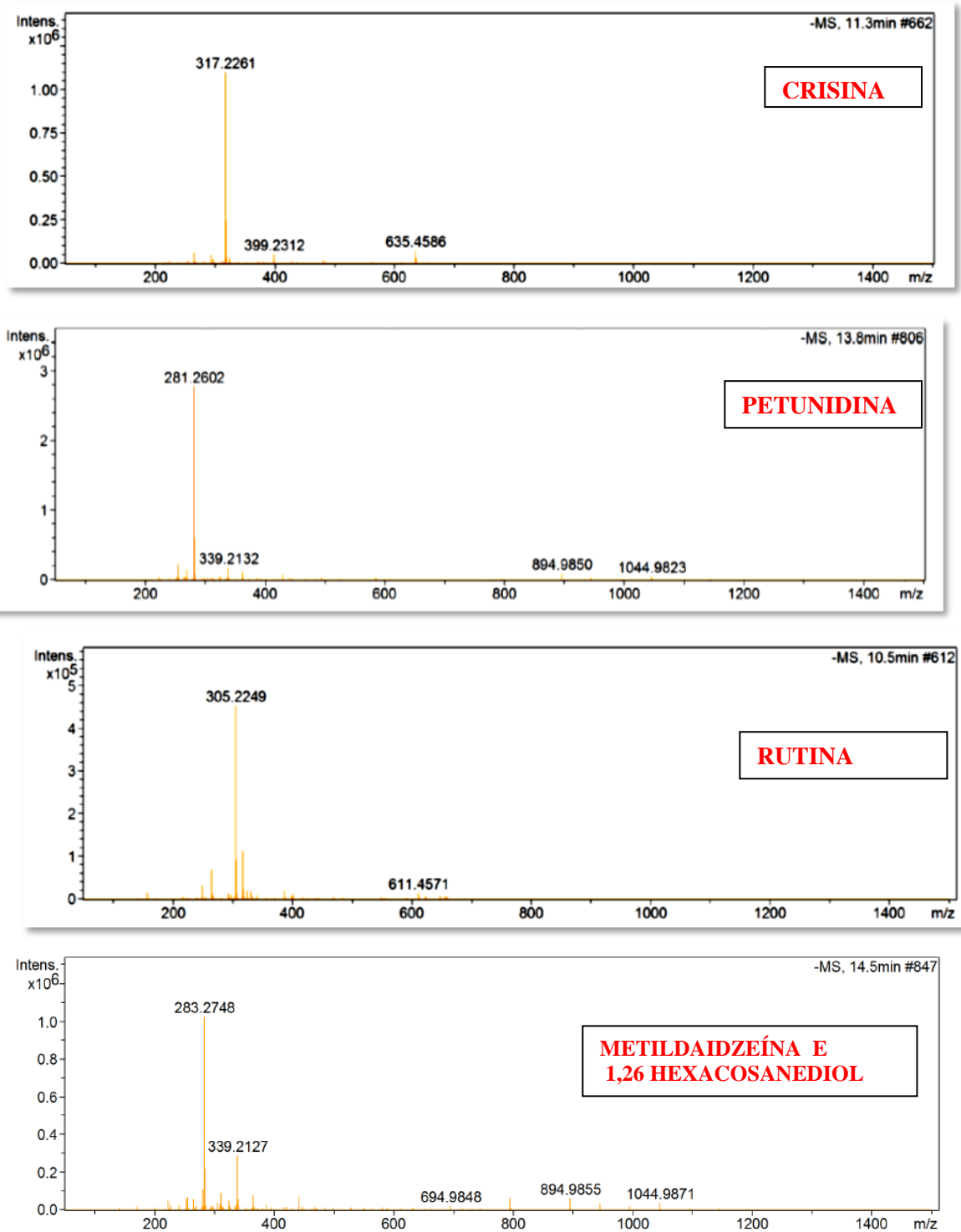


Figura 8: Espectro de massas dos flavonóides e isoflavonas encontrados no exsudato radicular do genótipo de milho DKB 390. a- Crisina, b- Petunidina, c- Rutina, d- Metilaidzeína e 1,26 hexacosanediol.

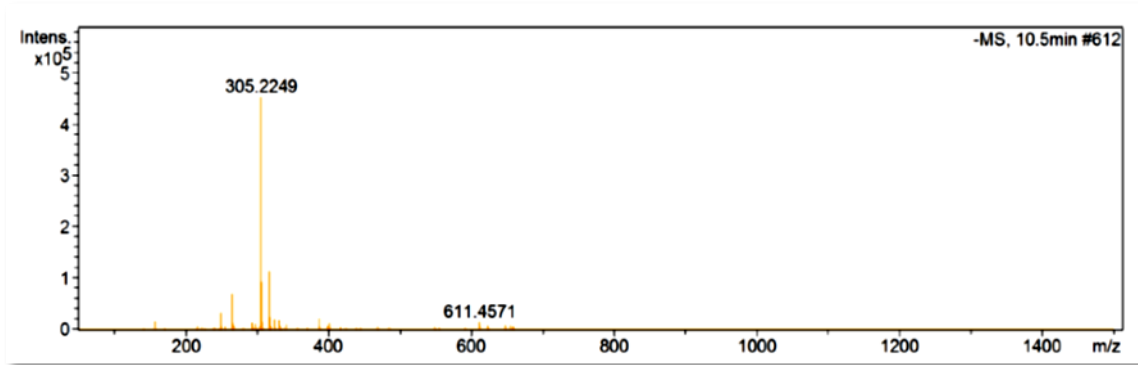


Figura 9: Espectro de massas identificando a presença do precursor de opinas **sagittariol**, no exsudato radicular do genótipo de milho dkb 390.

Os Flavonóides, por apresentarem uma grande diversidade de atividades biológicas benéficas, têm sido extensamente pesquisados (PONGSUWAN et al. 2008). Dentre eles os que mais se destacaram na nossa pesquisa foram rutina, e crisina. A Rutina, um flavonóide com ampla distribuição no reino vegetal por apresentar atividade quimiotática (DENG et al., 2008), tem sido objeto de muito estudo em diversas áreas, dentre elas agrônomicas, nutrição animal e na indústria farmacêuticas (PEDRIALI, 2005). Este flavonóide é encontrado em várias fontes alimentares como cebola, uva, trigo serraceno, feijão vermelho, milho, maçãs, tomates e bebidas como vinho tinto e chá preto (Thomson et al., 1999).

Crisina (5,7 diidroxiflavona) é um potente flavonóide, já tem sido apresentada como tendo efeitos antioxidantes (Pushpavalli et al., 2010), anti-inflamatórios (Bae et al., 2011) e ansiolítica. É utilizada juntamente com os seus precursores ou os estimuladores, na ativação de genes promotores da quimiotaxia (GOULD, 2006).

Com o objetivo de determinar a presença de glicosídeos e aromáticos que são compostos presentes na estrutura que compõe os flavonóides glicosilados, esses podem ter de alguma maneira ficado retido na coluna, foi realizado a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das amostras. Em geral, as separações desses tipos de compostos são obtidas em colunas de fase reversa C18, e as diferenças nas características dos métodos de identificação e quantificação estão associadas com o sistema de detecção ou mesmo com a própria coluna dependendo do material a ser utilizado (MERKEN e BEECHER, 2000), por esse fato ou mesmo pela escolha do solvente os flavonoides glicosilados não foram eluídos durante o processo.

Analisando os espectros de RMN⁻¹ foi possível observar, que nos exsudatos dos dois genótipos DKB 240 e DKB 390 (Fig. 10), apresentaram sinais entre as regiões δ 3- 4, a presença de glicosídeos e também sinais nas regiões entre δ 6 - 8 representando aromáticos,

revelando a possível presença de flavonóides glicosilados, sendo possível visualizar a maior intensidade do sinal no exsudato 390.

Devido à grande diversidade estrutural que estes glicosídeos podem apresentar, diversos pesquisadores têm voltado sua pesquisa ao desenvolvimento de técnicas analíticas que proporcionem uma análise mais detalhada à cerca destes constituintes vegetais, principalmente no que diz respeito à identificação dos isômeros (CUYCKENS e CLAEYS, 2005). Assim o RMN (H^1) permite um estudo adicional e uma análise rápida para confirmação da presença desses compostos.

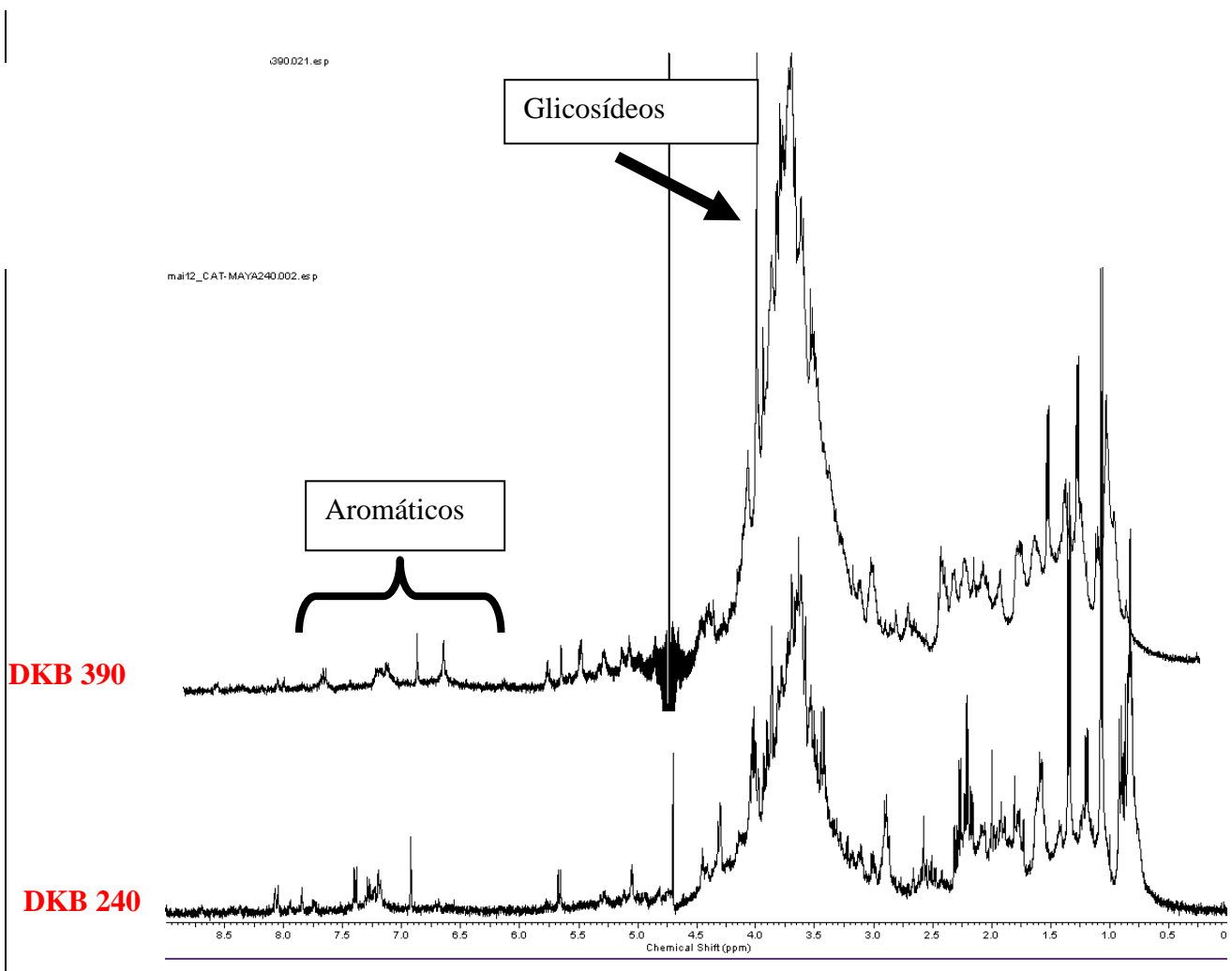


Figura 10: Espectro de RMN H^1 em D_2O comparando os exsudatos DKB 390 a cima e DKB 240 em baixo.

Buscando identificar esses glicosídeos retidos realizamos a injeção direta da solução dos exsudatos no espectrometro de massas, com o espectro gerado retiramos as massas

encontradas na análise onde utilizamos coluna, deixando somente as desconhecidas, assim tivemos a comprovação da presença de flavonóide glicosilados cyanidin (massa-683.4495) e da isflavona glycyhiza A (massa-453.1653) no exsudato radicular DKB 390 além de outras substâncias(hydroxy pyrene, ácido hepta decanóico, 6 metil hepta cadene e fosfatidilcolina) como mostrado na figura 11.

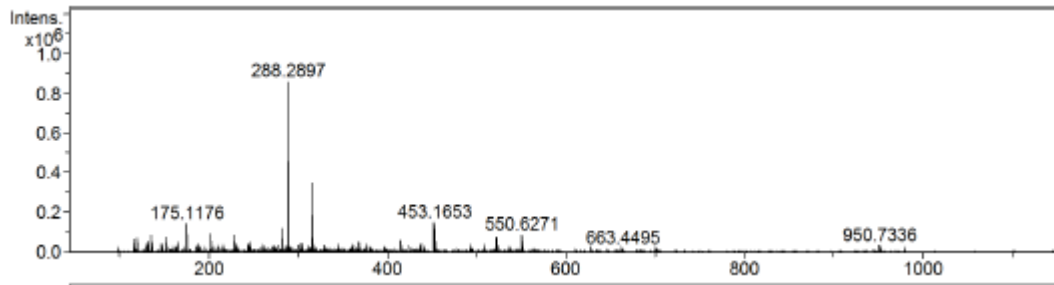


Figura 11: Espectro de massas obtidos pela injeção direto do exsudato radicular DKB 390

Já o exsudato radicular DKB 240 apresentou um glicosídeo fenólico derivado da frutose chamado trihidroxyfenil-gama-valerolactona O metil 5' O glucoronídeo (massa-161.0286) e um glicosídeo de raiz o metil heliantonato F glicosídeos (massa-437.1916); além dos compostos ácido heptanóico, 6 metil hepta cadene, glicosfingolipídeos, fosfatidiletanolamido e ácido aminoindicanoico (Fig 12).

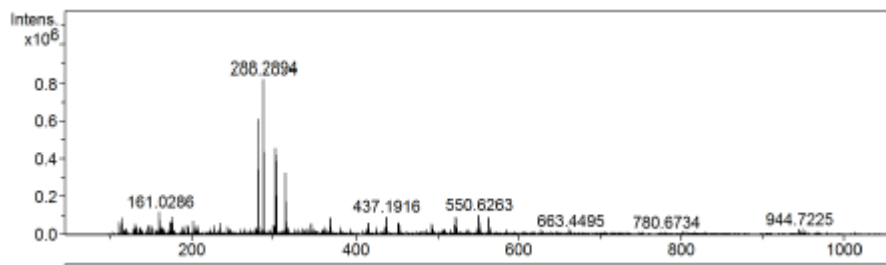


Figura 12: Espectro de massas obtidos pela injeção direto do exsudato radicular DKB 240

O que leva a confirmar um maior número de flavonóides presentes na solução de exsudatos DKB 390 mostrando que são quimicamente diferentes pois apresenta flavonóides diferentes do outro exsudato. Quando se trata da atração quimiotática exercida pelos flavonóides presentes nos exsudatos, o genótipo DKB 390 pode ser considerado mais forte pois apresenta no total 5 flavonóides e 2 isoflavonas enquanto o DKB 240 apresenta 3 flavonóides.

Segundo Mulder et al. (2005), a interação planta e bactéria começa quando a necessidade nutricional da planta é sinalizada por meio dos flavonóides exsudados pelas raízes induzindo a quimiotaxia de BPCV.

6.5.2 Avaliação da atividade quimiotática de *A. brasilense* Ab-V5 por capilaridade

Ao longo do ciclo de desenvolvimento da planta, a exsudação de uma ampla gama de compostos químicos pelas raízes modifica as propriedades químicas e físicas do solo, regulando, dessa forma, a estrutura da comunidade microbiana localizada em torno do sistema radicular (SUN et al.2012). Em adição, os exsudatos radiculares constituem a fonte mais significativa de nutrientes na rizosfera, e parecem participar do início da colonização da planta pelos microrganismos do solo ao induzir uma resposta quimiotática distinta sobre diferentes grupos taxonômicos (BADRI et al. 2009). Os microrganismos são atraídos por quimiotaxia em direção aos exsudatos liberados pelas raízes vegetais, que servirão como substrato metabólico, juntamente com os produtos da decomposição das células mortas das raízes (rizodeposição), e fornecerão suporte energético para o estabelecimento dos grupos microbianos compatíveis (BULGARELLI et al., 2013).

Dentre os microrganismos do solo, bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* são caracterizadas como promotoras de crescimento vegetal, capazes de influenciar positivamente o desenvolvimento e a produtividade de numerosas espécies de plantas, muitas de grande interesse agrônomo. De modo geral, a expressão dos mecanismos de promoção do crescimento por *Azospirillum* ocorre após uma colonização eficiente do ambiente da rizosfera, onde a quimiotaxia dirigida a compostos exsudados pelas raízes exerce grande influência (PEDRAZA et al. 2009). STEENHOUDT e VANDERLEYDEN (2000), verificaram in vitro que *Azospirillum lipoferum* e *A. brasilense* possuem grande atividade quimiotática para açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos e compostos aromáticos, quando utilizados de forma combinada, como também observaram respostas quimiotáticas positivas a exsudatos radiculares. Observam-se também respostas a diferentes fontes de carbono e concentração de oxigênio, que variam conforme as espécies de *Azospirillum*.

A agricultura moderna não pode excluir as interações naturais e positivas existentes entre a microbiota do solo e as plantas cultivadas, crescentemente exploradas em produtos biotecnológicos disponibilizados como alternativas aos fertilizantes e outros agroquímicos. Por outro lado, o estabelecimento de interações benéficas associativas, como a maioria das

interações mediadas por BPCV, demandam o entendimento profundo dos eventos moleculares que dirigem interações compatíveis (Cao et al 2011). De modo geral, as interações associativas entre planta e bactérias se iniciam nos eventos de quimiotaxia, que precedem a colonização dos tecidos vegetais (Kamilova, et al., 2006). Diferentemente das associações mutualísticas exibidas na interação entre rizóbios e leguminosas, muito bem compreendidas em nível molecular (REIS E AZEVEDO, 2008), as associações não-mutualísticas entre BPCV e gramíneas carecem de maior compreensão sobre os fatores moleculares de importância na interação e na expressão de genes relacionados à promoção do crescimento vegetal (SHIMEHATORI et al. 2011).

Com objetivo de identificar o papel de algumas moléculas descritas como componentes de exsudatos radiculares de plantas de milho ou de importância na indução de quimiotaxia em BPCV, foi determinada a capacidade atraente do ácido málico, flavonóide rutina, frutose, além de água ultrapura utilizada como controle absoluto em comparação à capacidade quimiotática de exsudatos de dois genótipos de milho.

As determinações de UFC (Fig. 13) indicam que os exsudatos radiculares possuem maior capacidade quimiotática sobre *A. brasilense* Ab-V5 e tendem a aumentar a colonização com o passar das horas, os exsudatos mostram que a quimiotaxia começa logo nos primeiros minutos de contato com o indutor.

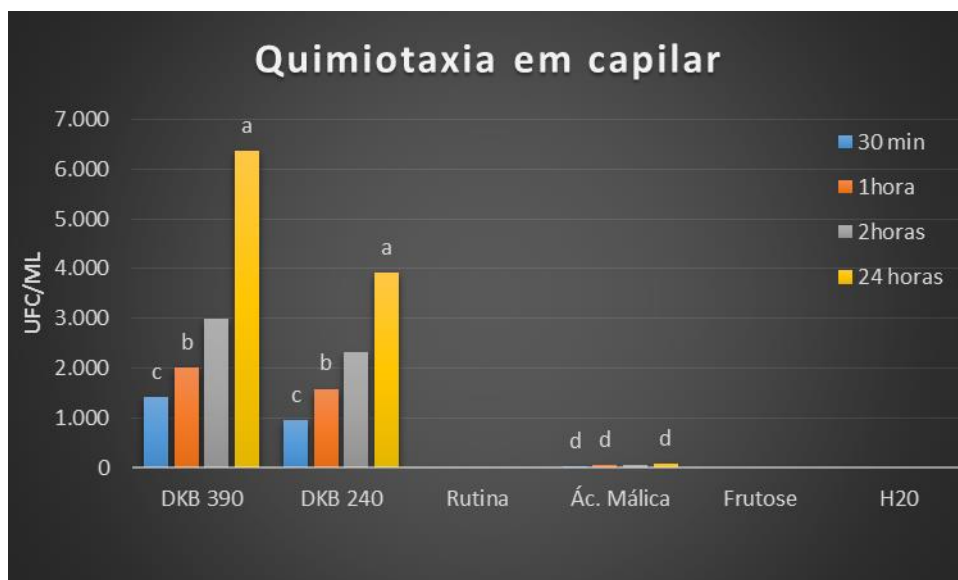


Figura 13: Número de UFC de *A. brasilense* Ab-V5 em capilares preenchidos com diferentes substâncias e exsudatos radiculares de dois genótipos híbridos de milho (DKB 390 e DKB 240). As contagens são apresentadas como Log_{10} de UFC.

Aos 30 minutos de incubação o exsudato DKB 390 promoveu a quimiotaxia de Ab-V5 de 1,408 UFC/ mL, após uma hora já foram quantificados 2.000 UFC/mL, em 2 horas 2.992 e em 24 horas de incubação a contagem chegou a 6.386 UFC/mL.

Já o exsudato DKB 240 nos dois primeiros tempos de avaliação mostrou que estatisticamente eles não diferem, já no tempo de 2 e 24 horas de incubação mostrou um número de células por mL menor do que o exsudato 390, mostrando que esse exsudato tem um menor potencial quimioatraente para Ab-V5.

Os outros compostos avaliados não apresentaram contagens significativas.

O comportamento diferenciado na atração de *A. brasilense* Ab-V5 pelos exsudatos dos genótipos de milho avaliados, sugerem heterogeneidade na composição quali-quantitativa destes exsudatos. Estudos de Carvalhais et al. (2011) revelou uma variação da composição exsudato de raiz, na presença de compostos orgânicos.

Uma possível explicação para os resultados obtidos neste estudo é o fato de os exsudatos de milho apresentarem ácidos orgânicos e flavonoides e antocianinas e muitas outras como foi caracterizado neste trabalho em sua composição (Yoneyama et al, 2007), esses compostos não apresentam efeito quimiotático quando avaliados separadamente, somente a mistura dessas substâncias (exsudatos brutos) tem ação quimiotática.

Ainda não se tem muitos estudos sobre a quimiotaxia provocada por ácidos orgânicos e flavonoides de forma separada, somente há relatos da quimiotaxia ativada por exsudatos radiculares.

Estudos de Lima (2014), mostraram que os exsudatos radiculares de milho, promoveram um aumento na colonização radicular crescente em vários estágios de crescimento, neste estudo ela avaliou 7,14 e 21 dias de crescimento das semente.

Finger (2002) revelou que exsudatos radiculares de feijão guandu propiciou a quimiotaxia de grande número de bactérias totais no rizoplano, que foram diminuindo nas frações de solo mais distantes das raízes, possivelmente em decorrência da diminuição gradativa das quantidades de exsudato.

Bacilio-Jimenez et al. (2003) indicou que os exsudatos de arroz podem induzir uma resposta quimiotática para maior bactérias endofíticas do que para outras estirpes presentes na rizosfera. Já os dados apresentados por Yaryura et al. (2008) sugeriu que a colonização de sementes de soja por *Bacillus amyloliquefaciens* (BNM339) foi influenciada pela estimulação da quimiotaxia, o crescimento e a formação de biofilme causado pelos exsudados.

6.5.3 Avaliação da quimiotaxia de sementes de milho tratadas com exsudatos radiculares sobre *Azospirillum brasilense* Ab-V5

Para avaliar o efeito quimiotático sobre *A. brasilense* Ab-V5, a partir do biofilme formado nas raízes de milho, foi realizada a contagem de UFC pela diluição a 10^6 (Fig. 14). A semente embebida com a solução de exsudatos apresentou uma contagem de células bacterianas significativamente maior que o controle, por serem considerados indutores de quimiotaxia. O exsudato 240 apresentou $9,77 \times 10^8$ UFC/mL e seu controle $3,56 \times 10^7$, tendo um aumento na população de células bacterianas obtidos pela contagem de 27 vezes; já o exsudato 390 apresentou $2,54 \times 10^9$ UFC/mL e seu controle $8,22 \times 10^6$; o aumento foi maior que 100 vezes. Mostrando o aumento que o aumento da quimiotaxia de Ab-V5 no exsudato DKB390 foi 2,59 vezes maior que o DKB 240. A figura 15 mostra a motilidade das células bacterianas em direção às sementes tratadas com exsudatos radiculares, ilustrando o incremento na quimiotaxia das sementes tratadas sobre a bactéria *A. brasilense* Ab-V5. O aumento da colonização beneficia a interação planta/bactéria, pois com o aumento da população aumenta a interação facilitando as respostas (KAMAL 2011).

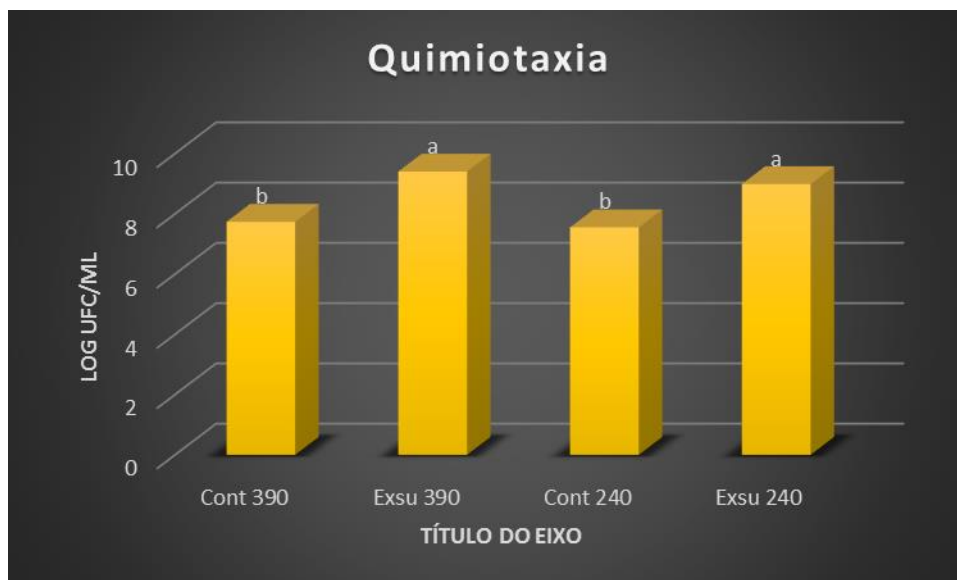


Figura 14: Contagem de UFC/mL em log/UFC do biofilme de AbV-5 nas sementes de milho com e sem exsudatos.

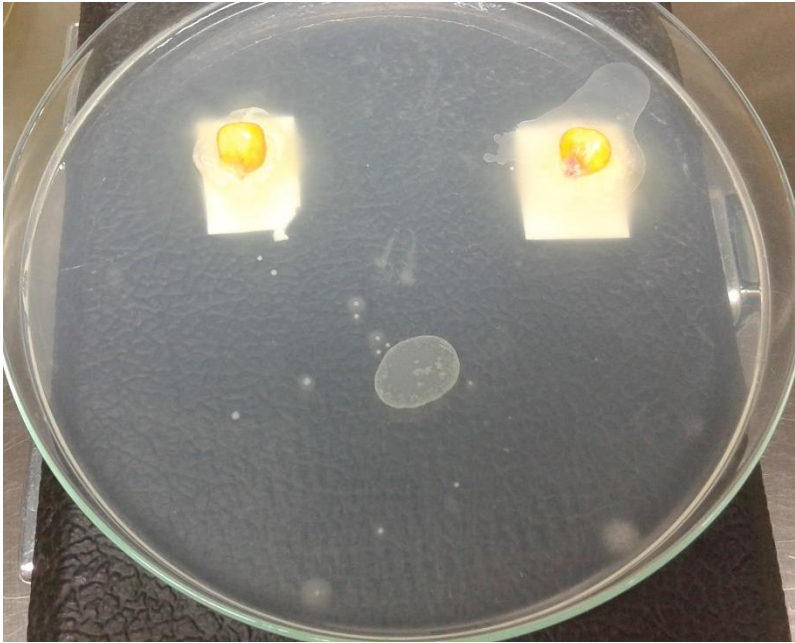


Figura 15: Quimiotaxia do *Azospirillum brasilense* (AbV-5) aos exsudatos radiculares. A semente do lado direito mostra a colonização e a quimiotaxia da BPCV na semente de milho, a do lado esquerdo representa o controle onde não houve a quimiotaxia.

6.6 CONCLUSÃO

Com as análises de LC-MS, RMN (H^{-1}) e injeção direta no massas, foi possível determinar a composição química dos exsudatos radiculares DKB 390 e DKB 240.

Exsudatos de plântulas de milho são compostos principalmente por flavonoides, ácidos graxos e compostos nitrogenados.

O exsudato DKB 390 se mostra mais complexo quimicamente do que o DKB 240, sendo assim possui um potencial quimioatraente superior ao 240.

Somente no exsudato 390 caracterizamos o composto sagittariol, que produzem sinais que controlam a expressão de genes e estimulam a quimiotaxia.

6.7 AGRADECIMENTOS

Capex, pelo apoio financeiro. Ao Laboratório multiusuário de Ressonância Magnética Nuclear - RMNUEL, e para o Lab. Multiusuário de Espectrometria de Massas em LAMM-UEL pela realização das análises.

6.8 REFERÊNCIAS

- ARRUDA, L. et al. Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 15-22, 2013.
- BADRI, D. V.; CHAPARRO, J. M.; ZHANG, R.; SHEN, Q.; VIVANCO, J. M. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of *Arabidopsis* to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome. **J Biol Chem** 288: 4502–4512, 2013.
- BADRI, D.V.; VIVANCO J.M. Regulation and function of root exudates. **Plant Cell Environ.** v. 32, p. 666-681, 2009.
- BACILIO-JIMÉNEZ M.; AGUILAR, S. F.; VENTURA, E. Z, PEREZ, E. C.; BOUQUELET S.; ZENTENO E. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. **Plant Soil.** v. 249. p. 271–277, 2003.
- BERTIN, C.; YANG, X. H.; WESTON, L.A. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* 256:67–83, 2003.
- BULGARELLI D.; SCHLAEPPI K.; SPAEPEN S.; THEMAAT E. V. L.; SCHULZE-LEFERT P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* v. 64, p. 807–838, 2013.
- CAO, Y.; ZHANG, Z.; LING, N.; YUAN, Y.; ZHENG, X.; SHEN, B.; SHENQ. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control Fusarium wilt in cucumber by colonizing plant roots. *Biol Fertil Soils* 47:495–50, 2011.
- CESCO, S., MIMMO, T., TONON, G., TOMASI, N., PINTON, R., TERZANO, R., NEUMANN, G., WEISSKOPF, L., RENELLA, G., LANDI, L., NANNIPIERI, P. Plant-borne 61 flavonoids released into the rhizosphere: impact on soil bio-activities related to plant nutrition. A review. *Biol Fertil Soils*, 48:123–149, 2012.
- CHEN, X.J.; JI, H., ZHANG; Q.W.; TU, P.F.; WANG, Y.T; GUO, B.L.; LI, S.P. A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in *Epimedium* using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 46 (2), 226–235, 2008.
- CROES, C.; MOENS, S.; VAN BASTELAERE, E.; VANDERLEYDEN, J; MICHIELS, K. M.; The polar flagellum mediates the adsorption to wheat roots. **J. Gen. Microbiol.**, 139, 2261-2269, 1993.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Determination of the glycosylation site in flavonoid mono-Oglycosides by collision-induced dissociation of electrospray-generated deprotonated and sodiated molecules. **J. Mass Spectrom.**, v. 40, p. 364-372, 2005.

COUILLEROT, O. et al. Comparison of prominent Azospirillum strains in Azospirillum-Pseudomonas-Glomus consortia for promotion of maize growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 10, p. 4639-4649, 2013.

DAKORA, F. D. PHILLIPS, D. A. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. **Plant Soil**. v. 245. p. 35–47, 2002.

DENG, X.; GAO, G.; ZHENG, S.; LI, F. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in the leaves of *Isatis indigatica* Fort by ultra-performance liquid chromatography with PDA and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** 48 (3), 562– 567, 2008.

GOULD, K.S., LISTER, C. Flavonoid functions in plants. In: Andersen, O.M., Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 397–442, 2006.

GROS, A. **Chemosensory behaviour in Azospirillum brasilense. Azospirillum VII and related PGPR. Genomics, molecular ecology, plant responses and agronomic significance.** Rhizosphere II satellite international workshop. Montpellier, France, 2007.

GHOLAMI, A. et al. Growth Promotion of Maize (*Zea mays* L.) by Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria under Field Conditions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 43, n. 9, p. 1263–1272, 2012.

GOULD, K.S.; LISTER, C. **Flavonoid functions in plants.** In: Andersen, O.M.; Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Taylor & Francis, Boca Raton, pp. 397–442, 2006.

GRAY, E.J., SMITH, D.L. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. **Soil Biol. Biochem.** 37, 395–412, 2005.

KAMILOVA, F.; KRAVCHENKO, L.V.; SHAPOSHNIKOV, A.I.; AZAROVA, T.; MAKAROVA, N.; LUGTENBERG, B. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, p. 250-256, 2006.

LIMA, L. S. Alterações no perfil de exsudação em plântulas de milho tratadas com ácido húmicos e bactérias promotoras de crescimento vegetal. Campo de Goyatazes – UENF, 93f. Dissertação no programa de produção vegetal do centro de ciências e tecnologias agropecuárias, Rio de Janeiro, Campos de Goyatazes, 2014.

MANDIMBA, ; HEULIN, T.; BALLY, R.; GUCKERT, A.; BALANDREAU, J. chemotaxis of free-living nitrogen-fixing bacteria towards maize mucilage. **Plant and soil** vol. 90, no. 1/3, nitrogen fixation with non-legumes pp. 129-139. 1986.

MARTHA JR. G. B.; EUCLIDES FILHO, K.; GAZZONI, D. L.; PENA JUNIOR, M. A. G.; CAMPOS, F.; BELTRÃO, S. L. L.; TORRES, L. A.; VALETIM, J. F.; MIRANDA, E.; PEREIRA, R. M.; DANTAS, J. O.; ARRUDA, R. G.; SILVA, A. R.; BERTIN, P. R. B.; BALSADI, O. V.; ARAÚJO, S. C. B. GUIDUCCI FILHO, E.; PEREIRA, V. F. (2014). Visão 2014-2034. O futuro do desenvolvimento tecnológico da agricultura brasileira. 54p. MERKEN, H. M.; BEECHER, G.R.; Measurement of food flavonoids by highperformance liquid Chromatography: a review. **J. Agric. Food Chem.**; 48:577-599, 2000.

MULDER, L et al. Integration of signaling pathways in the instabishment of the legume-symbiosis. **Physiologia plantarum**, Lund, v. 123, p. 27-218, 2005.

OBURGER, E., DELL' MAOUR, M., HANN, S., WIESHAMMER, G., PUSCHENREITER, M., WENZEL, W.W. Evaluation of a novel tool for sampling root exudates from soil-grown plants compared to conventional techniques. *Environmental and Experimental Botany*, 87:235-247; 2012.

OOGER, P.; MANSOURI, H.; DESSAUX, Y. Effect of crop rotation and soil cover onalreration of tha soil microfolora generated by the culture of trangenics plants producing opines. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, p. 881 -890, 2000.

PONGSUWAN, W.; BAMBATA, T.; HARADA, K.; YONETANI, T.; KOBAYASHI, A.; FUKUSAKI, E. High-Throughput Technique for Comprehensive Analysis of Japanese Green Tea Quality Assessment Using Ultra-performance Liquid Chromatography with Time-of-Flight Mass Spectrometry (UHPLC/TOF MS). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 56, p. 10705–10708, 2008.

PEDRIALI, C. A., Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

PEDRAZA R. O.; MOTOK, J.; SALAZAR, S. M.; RAGOUT, A. L.; MENTEL, M. I.; TORTORA, M. L.; GUERRERO-MOLINA, M. F.; WINIK, B. C.; DÍAZ-RICCI, J. C. Growth-promotion of strawberry plants inoculated with *Azospirillum brasilense*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 26, 265-272, 2009.

PEDRAZA, R. O.; MOTOK, J.; TORTORA, M. L.; SALAZAR, S. L.; DÍAZ RICCI, J. C. Natural occurrence of *Azospirillum brasilense* in strawberry plants. **Plant soil**, v. 295, p. 169-178, 2007.

- PEDRAZA, O. R.; MENDEL, I. M.; RAGOUT, L. A.; XIQUI, M. L.; SEGUNDO, D. M.; BACA, B. E. Plant Growth-Promoting Bacteria: The Role of Chemotaxis in the Association *Azospirillum Brasilense* Plant. **Nova Science Publishers**. cap 2, p. 2-30, México, 2009.
- PERIN, L.; SILVA, M. F.; FERREIRA, J. S.; CANUTO, E. L.; MEDEIROS, A. F. A.; OLIVARES, F. L.; REIS, V. M. Avaliação da capacidade de estabelecimento endofítico de estirpes de *Azospirillum* e *Herbaspirillum* em milho e arroz. **Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 47-53, 2003.
- REIS JUNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; REIS, V. M.; HUNGRIA, M. Plantas transgênicas e a microbiota do solo. Em: Fábio Galape e Solange Rocha. **Documentos Embrapa Cerrados (141)**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados: 1º edição, 36 p. 2005.
- REIS-JUNIOR, F. B.; MACHADO, C.T.T.; MACHADO, A.T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, p. 1139-1146, 2008.
- RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JR., V.A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* tipo B. *Summa Phytopathologica*, v. 12, n. 1-2. p. 16, 1986.
- SHAW, L.J., MORRIS, P., HOOKER, J.E. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. **Environ. Microbiol.** 8,1867–1880, 2006.
- SHIME-HATTORI, A. et al. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. *J Appl Microbiol*, v. 111, n. 4, p. 915-24, Oct 2011.
- STEENHOUDT, O.; VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 42, p.487 - 506, 2000.
- SOOD, S.G. Chemotactic response of plant-growth-promoting bacteria towards roots of vesicular-arbuscular mycorrhizal tomato plants. **Microbiology Ecology**, v. 45, p. 219-227, 2003.
- TARRANT, J. J., KRIEG, N. R., DÖBEREINER, 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**, n. 24, p. 967-980, 1978.
- THOMSON, C.; BLOCH, A.; HASLER, C. M., Position of the American Dietetic Association, Orlando, v. 99, n. 10, p. 1280- 1281, 1999.
- WEERT, S.; VERMEIREN, H.; MULDER, I. H. M.; KUIPER, I.; HENDRICKX, N.; BLOEMBERG, G.N.; VANDERLEYDEN, J.; MOT, R.; LUGTENBERG, B.J.J. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. **Molecular plant**, 11:1173-1180, 2002.

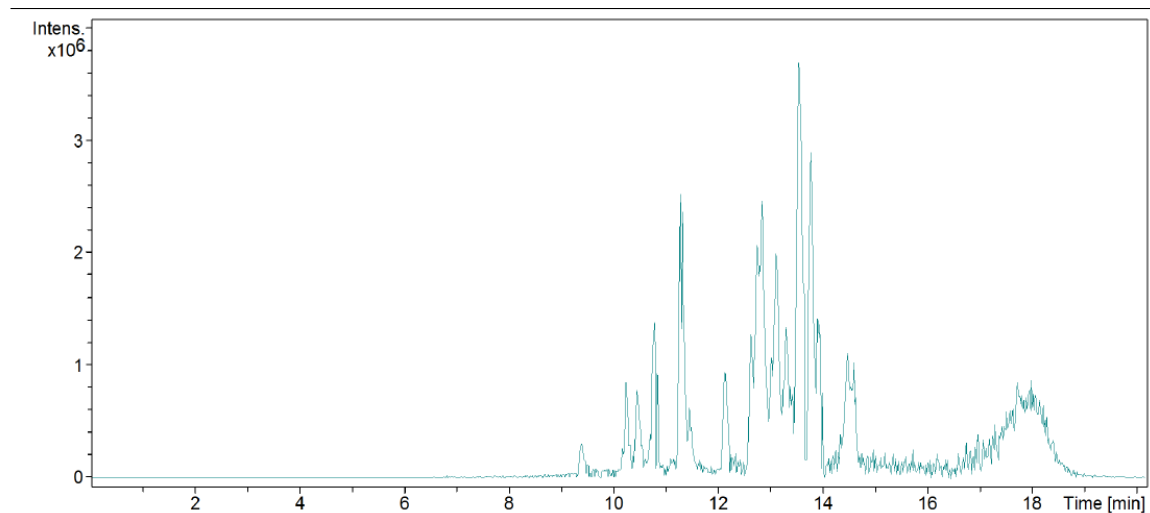
XU, Z.; SHAO, J.; LI, B.; YAN, X.; SHEN, Q.; ZHANG, R. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 79:808–815, 2013.

YARYURA, P.M.; LEON, M.; CORREA, O.S; KERBER, N.L.; PUCHEU, N.L.; GARCIA, A.F. Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. *Curr Microbiol* 56:625–632, 2008.

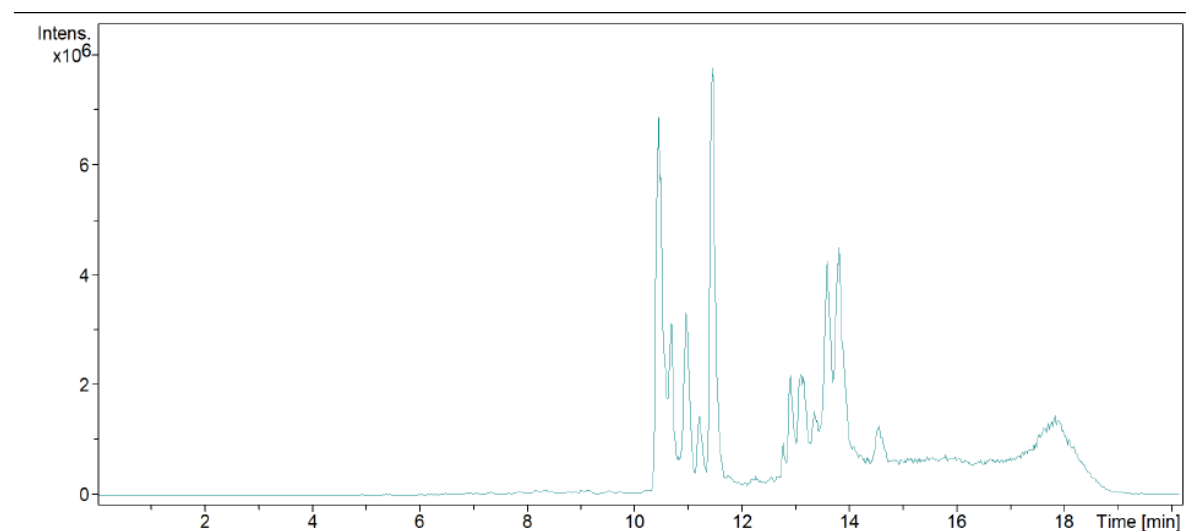
YANNAI, SHMUEL. Dictionary of food compounds with CD-ROM: Additives, flavors, and ingredients. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC. 2004

6.9 ANEXOS

Anexo II. Cromatograma total do exsudato DKB 390



Anexo I. Cromatograma total do exsudato DKB 240



Anexo III. Composição do meio de cultura dygs

2 g de glicose; 1,5 g de peptona; 2 g extrato de levedura; 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,5 de $MgSO_4$;

Água destilada q.s.p. 1 L; pH 6,0

Anexo IV. Normas para publicação da revista PLANT AND SOIL

Plant and soil

Normas para submissão

Apresentação de um manuscrito implica: que o trabalho descrito não tenha sido publicado antes; que não está sob consideração para publicação em nenhum outro lugar; que sua publicação tenha sido aprovado por todos os co-autores, se houver, bem como pelas autoridades responsáveis - tácito ou explícito - no instituto, onde o trabalho foi realizado. O editor não será considerado legalmente responsável deve haver nenhum pedido de indenização.

Permissões

Autores que desejam incluir figuras, tabelas, ou passagens de texto que já tenham sido publicados em outros lugares são necessários para obter a permissão do proprietário dos direitos de autor (s), tanto para o formato impresso e on-line e para incluir provas de que tal permissão foi concedida ao apresentarem os seus trabalhos. Qualquer material recebido sem essa prova será assumido se originar de seus autores.

Submissão Online

Por favor, siga o link "Submeter online" à direita e fazer upload de todos os seus arquivos manuscrito seguindo as instruções dadas na tela.

FOLHA DE ROSTO

Folha de rosto

A página de título deve incluir:

O nome (s) do (s) autor

Um título conciso e informativo

A afiliação (s) e endereço (s) do (s) autor

Os números de endereços de e-mail, telefone e fax do autor correspondente

Resumo

O resumo não deve exceder 200 palavras e deverá ser dividido nas seguintes seções:

O Aims (indicando os principais propósitos e pergunta de pesquisa)

Métodos o

• Os resultados (indicando os principais resultados)

O Conclusões

Para revisões e comentários, as seções de resumo pode ser alterado para: Fundo, Escopo e Conclusões.

Palavras-chave

Por favor proporcionar 4 a 6 palavras-chave que podem ser utilizados para fins de indexação.

TEXTO

Formatação de Texto

Os trabalhos devem ser apresentados em Word.

Use uma fonte normal, simples (por exemplo, 10 pontos Times Roman) para o texto.

Use itálico para dar ênfase.

Use a função de numeração de página automática para numerar as páginas.

Não use funções de campo.

Use tabulações ou outros comandos para travessões, não a barra de espaço.

Use a função de tabela, não planilhas, fazer tabelas.

Use o editor de equações ou MathType para equações.

Salve o arquivo no formato docx (Word 2007 ou superior) ou no formato doc (versões mais antigas do Word).

Manuscritos com conteúdo matemático também pode ser apresentada em LaTeX.

LaTeX pacote macro (zip, 182 kB)

Cabeçalhos

Por favor, use no máximo três níveis de títulos exibidos.

Abreviações

As abreviações devem ser definidas na primeira menção e usado de forma consistente depois.

Notas de Rodapé

Notas de rodapé pode ser usado para fornecer informações adicionais, que podem incluir a citação de referência incluída na lista de referência. Eles não devem consistir apenas de uma citação de referência, e eles nunca devem incluir os detalhes bibliográficos de uma referência. Eles também não devem conter quaisquer figuras ou tabelas.

Notas de rodapé no texto estão numeradas consecutivamente; aqueles para tabelas deverão ser indicados por sobrescrito letras minúsculas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos). Notas de rodapé para o título ou os autores do artigo não são dadas símbolos de referência.

Sempre use notas de rodapé em vez de notas.

Agradecimentos

Reconhecimentos de pessoas, subvenções, fundos, etc. deve ser colocado em uma seção separada na página de título. Os nomes de organizações de financiamento devem ser escritos por extenso.

Citação

Cite as referências no texto por nome e ano entre parênteses. Alguns exemplos:

Lista de referência

A lista de referências deve incluir apenas obras que são citadas no texto e que tenham sido publicados ou aceites para publicação. As comunicações pessoais e obras inéditas só devem ser mencionadas no texto. Não use notas de rodapé ou notas de fim como um substituto para uma lista de referência.

As entradas da lista de referência deve estar em ordem alfabética pelos sobrenomes do primeiro autor de cada trabalho. Solicitar publicações multi-autor do mesmo primeiro autor em ordem alfabética com relação ao segundo, terceiro, etc. autor. Publicações de exatamente o mesmo autor (es) devem ser ordenadas cronologicamente.

QUADROS

Todas as tabelas devem ser numerados em algarismos arábicos.

As tabelas devem ser sempre citadas no texto em ordem numérica consecutiva.

Para cada tabela, por favor fornecer uma legenda da tabela (título) explicando os componentes da mesa.

Identificar qualquer material publicado anteriormente, dando a fonte original, sob a forma de uma referência no final da legenda da tabela.

Notas de rodapé de tabelas devem ser indicadas por letras minúsculas sobrescrito (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos) e incluídos sob o corpo da tabela.

TRABALHOS DE ARTE e ilustrações DIRETRIZES

Submissão Figura eletrônico

Fornecer todos os dados eletronicamente.

Indique o que programa gráfico foi usada para criar a obra de arte.

Para gráficos vetoriais, o formato preferido é o EPS; para os meios-tons, utilize o formato TIFF. MSOffice arquivos também são aceitáveis.

Gráficos vetoriais que contêm fontes devem ter as fontes incorporadas nos arquivos.

Nomeie seus arquivos de figura com "Fig" eo número da figura, por exemplo, fig1.eps.

Figura Lettering

Para adicionar lettering, é melhor usar Helvetica ou Arial (sem serifa).

Mantenha lettering tamanho consistente em toda a sua arte final porte, geralmente cerca de 2-3 mm (8-12 pt).

Variação de tamanho do tipo dentro de uma ilustração deve ser mínima, por exemplo, não use o tipo 8-pt em um eixo e tipo pt-20 para o rótulo do eixo.

Evitar efeitos como sombreamento, letras esboço, etc.

Não inclua títulos ou legendas dentro de suas ilustrações.

Figura Numeração

Todos os valores devem ser numerados em algarismos arábicos.

As figuras devem ser sempre citadas no texto em ordem numérica consecutiva.

Figura partes devem ser denotados por letras minúsculas (a, b, c, etc.).

Se um apêndice aparece em seu artigo e que contém uma ou mais figuras, continuar a numeração consecutiva do texto principal. Não numerar as figuras do apêndice, "A1, A2, A3, etc." Figuras em apêndices on-line (material suplementar Eletrônico) deve, no entanto, ser numeradas separadamente.

Figura Legendas

Cada figura deve ter uma legenda concisa descrevendo com precisão o que a figura mostra. Incluir as legendas no arquivo de texto do manuscrito, não no arquivo de figura.

As legendas das figuras começam com o termo Fig. em negrito, seguido pelo número da figura, também em negrito.

Nenhuma pontuação é para ser incluído a seguir ao número, nem é qualquer pontuação para ser colocada na extremidade do subtítulo.

Identificar todos os elementos encontrados na figura na legenda figura; e utilizar caixas, círculos, etc., como pontos de coordenada em gráficos.

Identificar material publicado anteriormente, dando a fonte original, sob a forma de uma citação de referência no final do subtítulo figura.

Figura Colocação e Tamanho

As figuras devem ser apresentadas separadamente do texto, se possível.

Ao preparar suas figuras, figuras em tamanho para caber na largura da coluna.

Para a maioria das revistas as figuras deve ser 39 mm, 84 milímetros, 129 milímetros, ou 174 mm de largura e não superior a 234 mm.

Para livros e revistas livro porte, os números devem ser de 80 mm ou 122 mm de largura e não superior a 198 milímetros.

Permissões

Se você incluir figuras que já tenham sido publicados em outros lugares, você deve obter a permissão do proprietário dos direitos de autor (s), tanto para o formato impresso e online.

7 CAPÍTULO 2 – Efeitos Alelopáticos De Exsudatos Radiculares De Milho Na Fisiologia E Desenvolvimento Inicial De Genótipos Híbridos De Milho

7.1 RESUMO

Os exsudatos radiculares produzidos por diferentes espécies vegetais são capazes de induzir respostas quimiotáticas sobre a microbiota do solo, mediando interações planta-bactéria. Esta quimiotaxia depende em parte da composição quali-quantitativa dos metabólitos vegetais exsudados pelas raízes, que atuam seletivamente sobre grupos taxonômicos componentes do microbioma do solo e induzindo seu incremento populacional e favorecendo seu estabelecimento no ambiente rizosférico. Inoculantes comerciais contendo bactérias associativas consideradas promotoras do crescimento vegetal (BPCV), como por exemplo a bactéria *Azospirillum brasilense*, vem sendo comercializados no Brasil e a expectativa é de crescimento na demanda destes produtos. Assim, a identificação de compostos que possam ser utilizados como aditivos podem levar ao desenvolvimento de formulações inoculantes de alta eficiência. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito alelopático de exsudatos radiculares de genótipos híbridos comerciais de milho (DKB 240 e DKB 390) sobre parâmetros fisiológicos de plantas de milho durante seu estágio de desenvolvimento inicial, e identificar seu potencial de uso como aditivo em formulações inoculantes contendo a BPCV *A. brasilense* estirpe Ab-V5. Realizamos estudos sobre genótipos homólogo (DKB 240) e heterólogo (P30F53H) aos exsudatos obtidos, avaliando os efeitos da adição dos exsudatos tanto na presença como na ausência de *A. brasilense*. Foram determinados os efeitos dos tratamentos sobre parâmetros fisiológicos e biométricos obtidos durante o desenvolvimento inicial das plantas. Os resultados obtidos demonstram que os exsudatos radiculares atuam como quimioatratantes para BPCV e são responsáveis por aumentos na arquitetura radicular do milho, podendo ser utilizado como aditivos para compor formulações de biofertilizantes de alta eficiência.

Palavras chave: Inoculantes, *Azospirillum brasilense*, bactérias promotoras de crescimento vegetal.

7.2 ABSTRACT

The exudates produced by different plant species are able to induce chemotactic responses on soil microflora, mediating plant-bacteria interactions. This chemotaxis depends in part on qualitative and quantitative composition of plant metabolites exuded by the roots, which act selectively on groups taxonomic soil microbiome components and inducing its population growth and promoting its establishment in the rhizosphere environment. inoculants containing associative bacteria seen as promoting plant growth (BPCV), such as bacteria *Azospirillum brasilense*, has been marketed in Brazil and is expected growth in demand for these products. The identification of compounds which may be used as additives can lead to the development of high efficiency inoculant formulations. This study aimed to evaluate the allelopathic effect of root exudates of commercial hybrid maize genotypes (DKB 240 and DKB 390) on physiological parameters of corn plants during their initial stage of development, and to identify its potential use as an additive in inoculants containing formulations the BPCV *A. brasilense* Ab-V5 strain. We conducted studies on homologous genotypes (DKB 240) and heterologous (P30F53H) obtained exudates to evaluating the effects of the addition of exudates both in the presence and absence of *A. brasilense*. They determined the effects of treatments on physiological and biometric parameters obtained during the initial development of plants. The results show that the root exudates act as quimioatrentes to BPCV and are responsible for increases in root architecture of maize, can be used as additives for formulations composed biofertilizer high efficiency.

Keywords: Exudates, *A. brasilense*, chemotaxis and bacteria that promote plant growth

7.3 INTRODUÇÃO

Vários estudos tem mostrado a capacidade de promoção do crescimento de plantas de milho por BPCV do gênero *Azospirillum* (EGAMBERDIYEVA, 2007). Entre os efeitos de promoção do crescimento mediados por *Azospirillum*, estão incluídos aumentos na taxa de germinação de sementes, aumento de área foliar, incrementos na produtividade, aumento no teor de clorofila, maior absorção de nutrientes, aumento no teor de proteína dos grãos, tolerância a estresses bióticos e abióticos, incrementos na produção de matéria seca da parte aérea e raízes, atraso na senescência, e controle biológico de pragas e doenças (BARILLI, et al. 2011).

Entretanto, a utilização de inoculantes contendo cepas selecionadas de *Azospirillum* ainda não ocorre como prática agrícola regular. Apesar dos bons resultados encontrados devido à utilização dos inoculantes, diversos fatores influenciam a utilização eficiente da tecnologia, e estes vão desde a sua produção até sua utilização a campo. O maior problema está na sobrevivência dos micro-organismos durante todo o processo, durante o armazenamento e transporte do produto a mortalidade da bactéria pode ser maior que 90 % da população inicialmente incorporada no veículo (BASHAN et al., 2013). Pesquisas sobre incrementos que atuem como aditivos para compor formulações de biofertilizantes estão sendo realizadas, para suprir as deficiências e proporcionar uma excelente interação, modulando o metabolismo da planta e aumentando sua produtividade por efeitos diretos e indiretos (OLIVEIRA, et al., 2014).

A capacidade de estabelecimento de uma espécie bacteriana em associação com uma espécie vegetal é denominada rizocompetência, atua envolvendo fatores bioquímicos de compatibilidade entre os genótipos vegetal e bacteriano. Estes fatores são determinantes na eficiência da associação e a ausência de rizocompetência resulta em declínio progressivo na densidade populacional dos microrganismos introduzidos, levando ao insucesso na elicitação das respostas de promoção do crescimento (KRAVCHENKO, 2006).

Buscando entender melhor a influência do metabolismo vegetal sobre a eficiência associativa entre plantas de milho e *Azospirillum brasilense*, buscou-se a determinação do efeito alelopático de exsudatos radiculares de milho sobre a interação milho-*Azospirillum* e sobre o próprio desenvolvimento de plantas de milho.

As plantas exsudam através das raízes uma gama de compostos, e muitos destes atuar como quimioatraentes para bactérias e através da motilidade, bactérias são capazes de dirigir o seu movimento em resposta ao comportamento gradiente químico conhecido como

quimiotaxia (BAKKER et al. 2007). A resposta quimiotática de bactérias aos exsudatos desempenha um relevante papel ecológico em bactérias associadas a plantas e constituem o primeiro passo para iniciar a comunicação entre as raízes das plantas e microrganismos (BIBLE, et al. 2008).

A quimiotaxia é medida através do número de células bacterianas que responderam ao gradiente químico exposto, levando a modificações no desenvolvimento das plantas e de defesa (KATO, et al. 2008). Atualmente, o papel de moléculas sinalizadoras como os exsudatos surge como uma característica importante das interações entre plantas e de organismos presentes no solo (LIU et al.,2008).

De modo geral, as interações associativas entre planta e bactérias se iniciam nos eventos de quimiotaxia, que precedem a colonização dos tecidos vegetais (Kamilova, et al., 2006). Exsudatos radiculares são muito importantes no processo de sinalização e interação planta/bactéria.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito dos exsudatos radiculares de milho na fisiologia do milho durante seu estágio de desenvolvimento e confirmar seu potencial como quimioatraente para BPCV.

7.4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos seguintes laboratórios, todos instalados na Universidade Estadual de Londrina: laboratório de Bioquímica Molecular (Departamento de Bioquímica e Biotecnologia), laboratório de Sementes (Departamento de Agronomia), laboratório de Ecologia Vegetal (Departamento de Biologia Animal e Vegetal), e laboratório de Genética de microrganismos (Departamento de Biologia Geral).

7.4.1 Material vegetal e obtenção de exsudatos radiculares

Foram utilizadas sementes de milho de três genótipos híbridos comerciais, sendo dois comercializados pela empresa Dekalb/Monsanto (DKB 240 e DKB 390), e um comercializado pela empresa Pioneer (P30F53H). Estes materiais foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Melhoramento Genético de Plantas do Departamento de Biologia Geral – UEL. As características agrônômicas dos genótipos de milho utilizados estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 Características agronômicas dos genótipos híbridos comerciais utilizados neste estudo.

Genótipo	Tipo	Ciclo	Tipo grão	Porte planta	Cor grão	Transgenia
DKB 240	Híbrido simples	Precoce	Semidentado	2,25 m	Amarelo-alaranjado	VT PRO 2 ^{®1}
DKB 390	Híbrido simples	Precoce	Duro	2,20 m	Amarelo-alaranjado	VT PRO 2 ^{®1}
P30F53H	Híbrido simples	Precoce	Semidentado	2,10 m	Amarelo-alaranjado	Herculex ^{®2}

¹Tolerância ao herbicida glifosato pela introdução do gene *cp4 epsps*; tolerância a insetos-praga pela introdução dos genes *cry1A* e *cry2Ab2*. ²Tolerância ao herbicida glifosato pela introdução do gene *pat*; tolerância a insetos-praga pela introdução dos genes *cry1f*.

Previamente à montagem dos ensaios, as sementes foram superficialmente desinfestadas por imersão em solução de etanol 95% (v/v) por 30 segundos, seguida de imersão em solução de H₂O₂ 5% (v/v) por 10 minutos, e finalmente lavadas por 6 vezes com água deionizada estéril (MARSUDI et al., 1999). Em seguida, as sementes foram germinadas seguindo metodologia adaptada de Neal et al. (2012), utilizando 50 sementes de cada genótipo acondicionadas em papel absorvente (germitest) dobrado e umedecido com água destilada esterilizada, mantidos em câmara de germinação por 7 dias sob temperatura controlada de 25 °C e 70 % UR. Após o período de germinação, as plântulas de cada genótipo foram transferidas para Erlenmeyers com volume de 1 L e adicionadas de 150 mL de H₂O destilada e esterilizada, mantidas sob agitação orbital de 180 rpm a 27 °C por 24 horas. Ao final deste período, as plântulas foram removidas e a solução obtida seguiu uma filtração em poro de 0,22 µm e liofilização para obtenção do extrato seco. Quando de seu uso, os exsudatos foram utilizados como solução em água destilada esterilizada na concentração de 1g/L.

7.4.2 Avaliação do efeito alelopático dos exsudatos radiculares: desenvolvimento inicial do milho

Sementes do genótipo DKB 240 foram superficialmente desinfestadas por imersão em solução de etanol 95% (v/v) por 30 segundos, seguida de imersão em solução de H₂O₂ 5% (v/v) por 10 minutos e finalmente lavadas por seis vezes com água destilada e esterilizada (MARSUDI; GLENN; DILWORTH, 1999). A inoculação das sementes foi realizada

seguindo um padrão de concentração de 10^6 de bactérias por semente. Os exsudatos foram adicionados seguindo o mesmo volume de solução bacteriana sendo todos adicionados diretamente na semente.

Os tratamentos testados foram os seguintes: 1) tratamento controle, sem adição de inoculante e sem adição de exsudatos; 2) inoculação das sementes com *A. brasilense* Ab-V5; 3) inoculação das sementes com Ab-V5 e adição de exsudatos radiculares do genótipo DKB 240; e 4) inoculação das sementes com Ab-V5 e adição de exsudatos radiculares do genótipo DKB 390.

Após o tratamento das sementes com os exsudatos e inoculante, foram distribuídas 12 sementes de cada tratamento em três folhas de papel “germitest” para a confecção dos rolos de germinação, umedecidos com água destilada e esterilizada, equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco e conforme o tratamento de inoculação. A unidade experimental consistiu de rolos de germinação com 12 sementes, em quaduplicata para cada tratamento e mantidos em câmara de germinação, regulada para temperatura constante de 25 °C e 70 % UR.

Após 7 dias de incubação, as unidades experimentais foram coletadas, sendo usadas 1 grama de raiz para determinação do número de UFC/ g raízes, e o restante utilizado para as determinações biométricas. Para as determinações biométricas, as raízes das plântulas foram cuidadosamente separadas dos cotilédones e digitalizadas em resolução de 300 dpi. As imagens digitalizadas foram tratadas com filtros de imagem e analisadas por meio do software Gia Roots (GALKOVSKYI et al., 2012) para determinação dos seguintes parâmetros: profundidade e área convexa explorada pelas raízes; número de raízes; diâmetro, comprimento, perímetro, área superficial e volume das raízes.

Para a determinação do número de UFC, foi pesado 1g de raiz que foram maceradas em cadinho contendo 9 mL de solução salina. A contagem de UFC/mL foi realizada a partir da diluição seriada das solução contendo as raízes maceradas. Todos os parâmetros foram submetidas a análise de variância (ANOVA) utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2011) e na ocorrência de diferenças significativas, ($p < 0,5$) foi aplicado o teste de Tukey para separação das médias.

7.4.3 Avaliação do efeito alelopático dos exsudatos radiculares: ensaio em tubo de ensaio com solução nutritiva com o genótipo P30F52H

Os efeitos alelopáticos dos exsudatos radiculares de plantas de milho foram avaliados de modo a buscar o efeito heterólogo destes exsudatos, sobre um genótipo de milho

desenvolvido e comercializado pela empresa Pioneer – em contraste aos genótipos DKB utilizados para a obtenção dos exsudatos testados, produzidos e comercializados pela empresa Dekalb/Monsanto. Para esta finalidade, foram preparados tubos de ensaio com capacidade volumétrica de 120 mL, contendo 70 mL de solução nutritiva (anexo 1) de Hoagland e Arnon (1951) modificada pela ausência de nitrogênio e pela adição de ágar (3 g/L) para obtenção de um meio semi-sólido para crescimento das plantas. Foram utilizadas sementes do genótipo P30F53H (Pioneer) superficialmente desinfestadas por imersão em solução de etanol 95% (v/v) por 30 segundos, seguida de imersão em solução de H₂O₂ 5% (v/v) por 10 minutos, e finalmente lavadas por seis vezes com água destilada e esterilizada (MARSUDI; GLENN; DILWORTH, 1999). Tanto a inoculação das sementes com a BPCV *A. brasilense* (concentração de 10⁸ células mL⁻¹) quanto a embebição das sementes na solução de exsudatos (DKB 240 e DKB 390 na concentração de 1g L⁻¹) ocorreu por imersão das mesmas por 20 minutos, enquanto os controles foram imersos em água destilada esterilizada pelo mesmo tempo. Após os tratamentos de inoculação e/ou embebição em solução de exsudatos radiculares, as sementes foram pré-germinadas por 3 dias em câmara de germinação com temperatura (27 °C) e umidade (70% UR) controladas. Após a germinação, plântulas de milho com desenvolvimento uniforme e sem contaminação aparente por quaisquer microrganismos foram transferidas para os tubos de ensaio, utilizando-se uma plântula por tubo. Neste sistema, foram avaliados os seguintes tratamentos: 1) tratamento controle, sem adição de inoculante e sem adição de exsudatos; 2) inoculação das sementes com *A. brasilense* Ab-V5; 3) inoculação das sementes com Ab-V5 e adição de exsudatos radiculares do genótipo DKB 240; e 4) inoculação das sementes com Ab-V5 e adição de exsudatos radiculares do genótipo DKB 390. O experimento foi realizado em quintuplicata.

Foram realizadas coletas após 7 e 14 dias de transplântio, removendo-se as plantas dos tubos de ensaio e separando-se cuidadosamente as 5 raízes do cotilédones de cada tratamento, seguindo a digitalização do sistema radicular em resolução de 300 dpi. As imagens digitalizadas foram então tratadas com filtros de imagem e analisadas por meio do software Gia Roots (GALKOVSKYI et al., 2012) para determinação dos seguintes parâmetros: diâmetro médio; número máximo de raiz; área superficial; comprimento médio; volume médio. Os valores obtidos para cada variável analisada foram submetidos a teste de tukey e feito a análise dos componentes principais (PCA) utilizando o pacote estatístico R (CHAMBERS, 2008), buscando a condensação dos efeitos sobre as variáveis referentes aos tratamentos das sementes.

7.4.4 Avaliação do efeito alelopático dos exsudatos radiculares: ensaio em casa de vegetação

A continuidade dos estudos sobre o efeito alelopático de exsudatos radiculares de milho sobre o desenvolvimento destas plantas prosseguiu em casa de vegetação, utilizando-se vasos de 700 mL contendo perlita como substrato, em delineamento inteiramente casualizado com dez repetições. Foram utilizadas duas linhagens comerciais de híbridos de milho (Dekalb 240 e Pioneer F30F53H), desinfestadas conforme descrito anteriormente (MARSUDI; GLENN; DILWORTH, 1999). As sementes foram pré-germinadas por 3 dias em câmara de germinação sob temperatura de 27°C e 70% de UR; após a germinação, foram selecionadas sementes com desenvolvimento homogêneo para seguir aos tratamentos de inoculação e/ou embebição em solução contendo os exsudatos radiculares, conforme a Tabela 5. A inoculação com *A. brasilense* Ab-V5 consistiu da aplicação de 1 mL da suspensão celular na concentração de células a 10^8 células/mL por semente pré-germinada. A aplicação dos exsudatos radiculares foi realizada adicionando-se 1mL dos exsudatos de raízes (genótipos DKB 390, ou DKB 240) na concentração de 1 g/L por semente pré-germinada. Após o tratamento das sementes com o inoculante e/ou solução de exsudato radicular, as sementes foram mantidas por 30 minutos dentro de placas de Petri esterilizadas até a completa secagem, o tempo de secagem foi o mesmo para o inoculante e para a solução de exsudatos. Foram a seguir transferidas 2 sementes para cada vasos, Os vasos contendo perlita foram embebidos com 100 mL de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1951) com baixa concentração de N, colocando-se duas sementes pré-germinadas em cada vaso. Os vasos foram regados com a mesma solução nutritiva a cada 4 dias.

Tabela 5: Descrição dos tratamentos utilizados para a determinação do efeito alelopático (homólogo e heterólogo) de exsudatos radiculares de plantas de milho sobre o desenvolvimento e fisiologia de milho, na presença e na ausência de inoculação com *Azospirillum brasilense* Ab-V5.

Tratamento	Genótipo de milho	Exsudato ¹	<i>A. brasilense</i> ²	N ³
Controle (C1)	DKB 240		Não	-N

Controle (C2)	DKB 240		Não	+N
Controle (C3)	P30F53H		Não	-N
Controle (C4)	P30F53H		Não	+N
Tratamento (T1)	DKB 240		Sim	-N
Tratamento (T2)	P30F53H		Sim	-N
Tratamento (T3)	DKB 240	DKB 240	Sim	-N
Tratamento (T4)	DKB 240	DKB 390	Sim	-N
Tratamento (T5)	P30F53H	DKB 240	Sim	-N
Tratamento (T6)	P30F53H	DKB 390	Sim	-N

¹Exsudatos radiculares aplicados como solução (1 g/L) sobre sementes pré-germinadas (1 mL/semente). ²Inoculante aplicado como suspensão de células na (1 x 10⁸ células/mL) sobre sementes pré-germinadas (1 mL/semente). ³ Adição de NH₄NO₃ (mL/semente).

Após a 15 dias de crescimento em vasos, foi realizado o desbaste deixando somente uma planta por vaso. No 30º dia pós plantio foram determinadas as taxas de fotossíntese líquida (*A*) e condutância estomática (*g_s*) utilizando um analisador portátil de gás infravermelho (IRGA) modelo LICOR 6400 XL conectado a uma câmara 6 cm², ajustada para concentração de CO₂ de 380 ± 5 μmol mol⁻¹, temperatura de 31 ± 1°C e vapor de H₂O de 21 ± 1 mmol mol⁻¹. As medidas foram realizadas em folhas totalmente expandidas e expostas à luz solar direta, submetidas a uma densidade de fluxo de fótons (PPFD) de 1.000 μmol m⁻²s⁻¹. Foram determinadas as seguintes variáveis: Fotossíntese (*A*), medida pela taxa de assimilação líquida de CO₂ (μmoles CO₂ m⁻² s⁻¹); *g_s*, condutância estomática (moles m⁻² s⁻¹).

Após as determinações fisiológicas, procedeu-se ao desmonte dos vasos e coleta das plantas para as determinações biométricas (arquitetura das raízes, peso seco da parte aérea seca e o peso seco das raízes) e contagem de UFC. As raízes foram cuidadosamente separadas dos cotilédones e fotodocumentadas digitalmente em resolução de 300 dpi. As imagens digitalizadas foram tratadas com filtros de imagem e analisadas por meio do software Gia Roots (GALKOVSKIYI et al., 2012) para determinação dos seguintes parâmetros: profundidade e área convexa explorada pelas raízes; número total; diâmetro, comprimento, perímetro, área superficial e volume. Foi realizada a pesagem da parte aérea seca e peso seco

de raiz após 2 dias em estufa a 60 °C, que foi quando atingiram peso constante. Para as determinações de colonização bacteriana, foi aplicada a técnica de contagem do número de unidades formadoras de colônia (UFC), a partir de 1 g de raízes, coletadas aleatoriamente em triplicata para cada tratamento. Todos os parâmetros foram submetidas a análise de variância (ANOVA) utilizando o software Sisvar (FERREIRA, 2011), e na ocorrência de diferenças significativas ($p < 0,5$) foi aplicado o teste de Tukey para separação das médias. Foi realizada a análise dos componentes principais (PCA) a partir dos dados estatísticos obtidos pelos testes de tukey.

7.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os exsudatos radiculares são compostos quimicamente complexos, com centenas de moléculas sendo exsudadas para a rizosfera, durante todo o período de desenvolvimento de qualquer vegetal (Lorenzo et al., 2011). Pesquisas recentes demonstram que os exsudatos radiculares representam uma importante fonte de nutrientes para os microrganismos da rizosfera, induzindo respostas quimiotáticas seletivas sobre a microbiota do solo e participando do processo de colonização vegetal (LIMA, 2014). Ampliar o conhecimento sobre a regulação química das interações existentes entre a microbiota do solo com as plantas cultivadas, identificando os compostos determinantes de compatibilidade associativa e respectivas influências sobre o metabolismo microbiano e vegetal, permitirá uma exploração mais racional dos mecanismos naturais de promoção do crescimento vegetal na direção de uma agricultura mais sustentável.

7.5.1 Teste de desenvolvimento inicial de raízes de milho

Os resultados obtidos pelo estudo de germinação de sementes de milho híbrido da Dekalb (DKB 240), embebidas com exsudatos homólogos (obtido do genótipo DKB 240) e heterólogo (obtido do genótipo DKB 390) indicam um efeito positivo sobre a maioria dos parâmetros biométricos observados, comparativamente ao desenvolvimento das plantas controle (tratamento 1) ou das plantas tratadas somente com *A. brasilense* (tratamento 2), tabela 6, mostra os parâmetros avaliados pelo software *giaRoots* no qual usa as seguintes medidas: **Diâmetro** - o valor médio da raiz estimativa largura calculado para todos os pixels do eixo mediano de todo o sistema radicular. **Número máximo de raízes** - Depois de classificar o número de raízes que atravessam uma linha horizontal do menor ao maior, o

número máximo é considerado como o valor 84th percentil (um desvio padrão). **Mediana de Raiz** - o resultado de um varrimento de linha vertical, em que o número de raízes, que atravessou uma linha horizontal foi estimada, e, em seguida, foi calculada a média de todos os valores para a extensão da rede. **Perímetro**- o número total de pixels de rede ligados a um pixel de fundo (usando um-8 mais próxima vizinhança vizinho). **Comprimento** - O número total de pixels no esqueleto de rede. **Área superficial**- A soma da área de superfície local em cada pixel do esqueleto de rede, como aproximada por uma forma tubular, cujo raio é estimado a partir da imagem. **Comprimento específico** - extensão da rede total dividido pelo volume de rede. **E o comprimento total** de raízes é o número de pixels no eixo mediano do sistema radicular. **O volume** é calculado como a soma das áreas das secções transversais de todos os pixels do eixo mediano do sistema radicular.

Foram observados incrementos da embebição das sementes com os exsudatos dos genótipos DKB 240 (tratamento 3) e DKB 390 (tratamento 4) em comparação ao tratamento 2, relacionados ao número de raízes por plântula (apresentando um aumento de 73% para o tratamento 3 e 86% para o tratamento 4); perímetro de raízes (48,7 e 86,5%); área superficial (66 e 97%); comprimento total (63 e 105%); e volume de raízes (63 e 85%, respectivamente, em comparação ao tratamento 2). Não foram observados efeitos significativos dos parâmetros observados entre os tratamentos controle (tratamento 1) e inoculação com *A. brasilense* (tratamento 2). Em adição, os resultados da avaliação biométrica obtidos para as sementes inoculadas com *A. brasilense* Ab-V5 sem adição de exsudatos radiculares indicam que esta bactéria promove um efeito negativo sobre o desenvolvimento inicial do genótipo de milho DKB 240, sugerindo um baixo potencial associativo deste genótipo com esta BPCV. De modo interessante, a adição do exsudato radicular obtido do genótipo DKB 240 associado à inoculação com *A. brasilense* resultou em incremento no desenvolvimento das plântulas, sendo este efeito mais pronunciado pela aplicação de exsudato heterólogo (obtido do genótipo DKB 390).

As respostas positivas a aplicação de BPCV depende do genótipo da planta, esse influencia na interação planta/bactéria, podendo causar respostas rápidas, tardias ou até mesmo negativas (HUNGRIA et al. 2010).

Exsudatos radiculares podem ter ação diferenciada dependendo da sua composição química, pois podem apresentar uma variedade de substâncias em proporções relevantes, que faz com que o compostos se torne um quimioatraente mais forte, em estudos realizados anteriormente neste trabalho identificamos 18 compostos presentes no exsudato DKB 390 e 13 no DKB 240, dentre os compostos estão açúcares, ácidos graxos, ácidos orgânicos,

aminoácidos, enzimas, auxinas, citocininas e os flavonóides, e o exsudato DKB 390 apresenta mais flavonoides e isoflavonas, além de uma substância chamada sagittariol em sua composição em relação ao exsudato 240; o que pode explicar sua ação diferenciada no desenvolvimento inicial das raízes de milho. Os flavonoides são responsáveis por ativarem os genes da nodulação nas leguminosas e por promoverem a quimiotaxia em gramíneas fornecendo assim benefícios como a fixação biológica de nitrogênio (FBN) (BADRI e VIVANCO, 2009).

Considerando os resultados das avaliações biométricas e a composição química dos exsudatos, é possível sugerir que existe um efeito alelopático dos exsudatos radiculares de milho, que agem como condicionadores da germinação e do desenvolvimento inicial de plantas de milho. Este condicionamento aparece suficientemente robusto para eliminar possíveis efeitos negativos resultantes da colonização bacteriana nos estádios iniciais de desenvolvimento. Adicionalmente, as diferenças químicas na composição dos exsudatos de diferentes genótipos de milho indicam sua relação com a intensidade dos efeitos de promoção do desenvolvimento inicial do milho. Neste sentido, a ocorrência diferenciada dos compostos químicos acacetina, rutina, e-metildaidzeína, 1,26 hexacosamedio e sagittariol observados no exsudato do genótipo DKB 390 e não identificados no exsudato do genótipo DKB 240 (capítulo 1 desta dissertação), podem exercer um papel relevante na promoção do crescimento inicial das plantas de milho.

O incremento no desenvolvimento inicial de plantas de milho quando embebidas em solução de exsudatos radiculares pode ser parcialmente explicado pelo efeito quimiotático exercido sobre a bactéria *A. brasilense* Ab-V5. Segundo Didonet et al. (2008), são muitas as evidências de que a inoculação das sementes de milho com *A. brasilense* seja responsável pelo aumento da taxa de acúmulo de matéria seca, o que parece estar relacionado com o aumento da atividade das enzimas fotossintéticas e de assimilação de nitrogênio. Além do efeito sobre a cultura, a bactéria possui ainda os seguintes benefícios como inoculante: a bactéria é endofítica, ou seja, penetra na raiz das plantas; apresenta antagonismo a agentes patogênicos; produz fitohormônios; não é muito sensível às variações de temperatura e ocorre em todos os tipos de solo e clima (ARAUJO et al. 2008)

Vários trabalhos com *Azopirillum* spp. têm demonstrado aumento no rendimento de massa seca e o acúmulo de nutrientes por plantas inoculadas (REIS JÚNIOR et al., 2008) e na produtividade de grãos de milho (CAVALLET et al., 2000; DOBBELAERE et al., 2002, HUNGRIA et al., 2010). Entretanto, resultados da interação bactérias diazotróficas e milho em termos de potencial agrônomico, fixação de nitrogênio ou promoção do crescimento,

depende de muitos fatores bióticos e ambientais, tais como genótipo da planta, comunidade microbiológica do solo e disponibilidade de nitrogênio (ROESCH et al., 2006).

Os resultados de colonização das plântulas por *A. brasilense* demonstram que o uso dos exsudatos na embebição das sementes promoveu aumento na concentração de bactérias associadas ao sistema radicular das plantas, um efeito que pode ser relacionado à quimiotaxia (Figura 15). A adição de exsudatos radiculares promoveram a quimiotaxia das BPCV, causando um aumento na população bacteriana da raiz, essa foi calculada pela contagem de UFC a partir do maceramento e diluição seriada das raízes, no tratamento com exsudato DKB 390 teve um aumento de mais de 100 vezes na contagem de UFC, já no exsudato DKB 240 houve um aumento de 75 vezes.

Estes resultados corroboram com os resultados de biometria, quando a aplicação dos exsudatos do genótipo DKB 390 resultaram em maiores incrementos nos parâmetros observados, em comparação ao uso do exsudato do genótipo DKB 240. Da mesma forma, a densidade de células bacterianas associadas ao sistema radicular das plantas inoculadas com *A. brasilense* foi maior quando houve embebição das sementes com o exsudato do genótipo DKB 390. Por outro lado, elevadas densidades de células também foram observadas nas plantas inoculadas com *A. brasilense* na ausência dos exsudatos radiculares, sem que fossem observados efeitos positivos da inoculação para os parâmetros biométricos; pelo contrário, a inoculação da BPCV sem adição dos exsudatos radiculares promoveu um efeito negativo sobre o desenvolvimento das plantas, na maioria dos parâmetros observados.

A agricultura moderna está cada vez mais focado no uso de produtos microbianos como alternativas para substituir os fertilizantes químicos. O uso de aditivos pode então promover a quimiotaxia aumentada das BPCV, podendo se tornar um excelente incremento na produção de biofertilizantes.

Tabela 6: Comparação dos parâmetros avaliados pelo software giaRoots no desenvolvimento inicial de sementes de milho em rolos de germinação.

Média dos valores obtidos pelo Gia roots sobre o teste de desenvolvimento inicial de raiz do genótipo DKB 240								
Tratamento	Diametro	Nº raiz	mediana	perimetro	comp. específico	area superficial	comp. total	volume
Bac	0,811 a	8,217c	4,633c	359,989c	106,970b	56,104c	201,251d	1,920b
Controle	0,085b	10,917d	5,917d	488,895d	116,905b	78,608d	294,564 c	2,633b
Exsu 240	0,091b	14,222b	7,444b	535,350b	106,407b	93,307b	328,608 b	3,130 a
Exsu390	0,086b	15,306a	9,333a	671,477a	116,908a	110,851a	413,198 a	3,547 a



Fig. 15: Contagem de UFC/mL das raízes em log/UFC

7.5.2 Teste em tubo de ensaio com solução nutritiva

A continuidade dos estudos sobre o efeito alelopático dos exsudatos radiculares no desenvolvimento inicial das plantas de milho inoculado com *A. brasilense* foi realizada especificamente para avaliar o efeito heterólogo dos exsudatos em um genótipo de milho híbrido comercial considerado responsivo à inoculação (P30F53H). Os resultados obtidos com auxílio do programa GiA Roots estão apresentados nos anexos 4 e 5 (ANOVA e Tukey 5%) e nas Figura 16 análise dos componentes principais (PCA). Os dados de biometria indicam que houve diferenças temporais relacionadas aos tratamentos estudados. As análises biométricas realizadas sete dias após a transferência das plântulas para os tubos de ensaio indicaram que os tratamentos de embebição de sementes com exsudatos radiculares não promoveram incremento no desenvolvimento das plântulas para os parâmetros: número médio de raiz (NMR), diâmetro médio de raiz (DMR), volume médio de raiz (VMR), área superficial de raiz (ASR), comprimento médio de raiz (CMR) e perímetro médio de raiz (PMR). A análise de componentes principais (PCA) apresentada na Figura 16 A demonstra mais claramente estes resultados, explicando até 98,62% da variação observada pelo efeito dos parâmetros selecionados; onde fica clara que a adição de exsudatos radiculares não

influenciaram na germinação inicial das sementes de milho em tubos de ensaio com solução nutritiva semi-sólida.

De modo interessante, as determinações biométricas realizadas 14 dias após a transferência das plântulas para os tubos de ensaio apresentaram um quadro distinto para o efeito dos tratamentos testados. Nesta segunda avaliação, as plântulas de milho que tiveram suas sementes embebidas em exsudatos radiculares de milho, em particular pelo exsudato obtido do genótipo DKB 390, apresentaram um desenvolvimento radicular superior ao tratamento controle, como observado no anexo 6. Enquanto as plântulas formadas por sementes tratadas com o exsudato DKB 390 apresentaram 23% do NMR após sete dias de transplântio, este mesmo parâmetro apresentou incremento de 33,49% quando avaliado 14 dias após o transplântio. Outros parâmetros avaliados também demonstraram viés positivo nos parâmetros biométricos avaliados após 14 dias de transplântio das sementes para os tubos de ensaio, comparativamente aos valores observados para as análises realizadas após sete dias de transplântio. Destacam-se os parâmetros CMR (incremento de 67,45% na avaliação realizada 14 dias após o transplântio, comparativamente à diminuição de 46,5% observado após sete dias de transplântio); VMR (incremento de 35,51% aos 14 dias, contra decréscimo de 8,15% aos sete dias); e ASR (incremento de 55,21% aos 14 dias, contra decréscimo de 17,77% aos sete dias). Este efeito também foi observado nas plantas cujas sementes foram tratadas com exsudato do genótipo DKB240: PMR (incremento de 31,93% aos 14 dias, contra decréscimo de 12,13% aos sete dias); ASR (incremento de 53,49% aos 14 dias, contra decréscimo de 15,4% aos sete dias); CMR (incremento de 62,43% aos 14 dias, contra decréscimo de 40,3% aos sete dias); e VMR (incremento de 40,8% aos 14 dias, contra decréscimo de 7,86% aos sete dias). A análise de componentes principais (PCA) apresentada na Figura 16 B explica até 89,47% da variação observada pelo efeito dos dois primeiros parâmetros selecionados, e corrobora com os vieses dos tratamentos de embebição de sementes com exsudatos radiculares, posicionando-os em proximidade aos parâmetros biométricos avaliados 14 dias após o transplântio em comparação ao posicionamento destes tratamentos observado na análise de PCA realizada com os resultados obtidos após sete dias de transplântio.

O benefício da inoculação do milho com bactérias diazotróficas depende de fatores como genótipo da planta, estirpes selecionadas, inter-relação entre ambos e o meio ambiente (Sala et al., 2007). As BPCV podem promover o crescimento de plantas através da produção de moléculas orgânicas que são necessárias em determinadas quantidades pelas plantas e que podem resultar no crescimento vegetal (BABALOLA, 2010). Estes resultados mostram a

importância da interação metabólito x bactéria x cultivar, assim como citado por Sala e outros (2007).

Do mesmo modo, Guimarães et al. (2003) também observaram efeitos positivos e negativos nas respostas primárias no desenvolvimento inicial do milho, devido à interação estirpe x cultivar. Fernandes et al. (2005), trabalhando diferente cultivares, também evidenciaram diferenças significativas na utilização de nitrogênio e outros nutrientes pelas plantas. Tais resultados demonstram que esta variação na eficiência dos genótipos em utilizar eficientemente os nutrientes fornecido está ligada às variações genéticas que ocorrem entre os genótipos de milho (CHAVAGAIA e MELO, 2013). E ainda, sendo confirmado por Reis et al. (2000), que a falta de sucesso com inoculação em gramíneas estão ligadas ao uso de linhagens inadequadas.

Como mostrado nos resultados, a resposta da planta ao tratamento com os exsudatos associados à inoculação com *A. brasilense* foi mais demora da em comparação ao tratamento de inoculação com *A. brasilense* isoladamente. Isso pode ser explicado pelo fato de que a bactéria tem uma rápida colonização na planta e sua interação com a planta ocorre nos primeiros dias de germinação, já os exsudatos podem demorar um pouco mais no processo de transcrição de genes para poder dar o 'start' na interação com a planta ativando a quimiotaxia das BPCV e também podem estar relacionada com o genótipo utilizado e na assimilação entre a planta e os metabólitos contido na composição desses exsudatos.

Estudos de SANTOS et al., 2013, mostram que os efeitos da inoculação com BPCVs são melhor observados nos primeiros dias do ciclo vegetativo. Da mesma forma, os efeitos de promoção de crescimento observados no início do desenvolvimento do milho posteriormente se traduzem em maior absorção de NO_3^- , K^+ , e P_2O_4 (HAYAT et al., 2010). BRUSAMARELLO e SANTOS (2012), fizeram uma avaliação de cultivares de arroz e observaram mudanças nos exsudatos radiculares, com maior liberação de carboidratos do que ácidos orgânicos conforme o crescimento da planta. Considerando que as comunidades microbianas heterotróficas são moduladas pelos exsudatos radiculares, e que a composição quali-quantitativa dos compostos exsudados pelas raízes vegetais varia conforme a influência de fatores ambientais (bióticos e abióticos), além da idade e fase de desenvolvimento da planta (BALSANELI, 2010), é possível supor que a diminuição do crescimento radicular das plantas tratadas com exsudatos pode estar relacionada com a presença de alguma molécula com ação hormonal. Neste sentido, é interessante notar que dentre os compostos identificados em ambos exsudatos, está o ácido fenilacético (PAA; *phenylacetic acid*), uma auxina de ocorrência natural em vegetais superiores (Valentovic, 2006). A auxina PAA também pode

ser produzida por *A. brasilense* (GALPERIN, 2005), e uma quantidade excessiva deste fitohormônio pode ter levado à diminuição do crescimento das plântulas de milho durante a primeira semana do experimento, sendo este efeito eliminado ao longo do tempo de ensaio. O confinamento das plantas no tubo de ensaio pode ter auxiliado a ocorrência deste efeito, que não foi observado quando as sementes germinaram em papel de filtro, suporte que pode ter possibilitado a difusão de moléculas inibitórias e consequentemente diminuiu sua concentração na proximidade das raízes das plântulas.

A interação molecular entre os genes iniciadores de plantas e as moléculas ativadoras existentes nos exsudatos, torna o processo de simbiose mais eficiente (Neumann, et al., 2014). No entanto, os mecanismos que envolvem as interações associativas entre plantas e BPCV ainda não estão claros, e estudos que tentam contribuir para a compreensão destes mecanismos são necessários. Ampliar o conhecimento sobre estas associações pode levar ao desenvolvimento de formulações inoculantes e/ou aditivos que proporcionem maior eficiência à tecnologia de inoculação vegetal com BPCV.

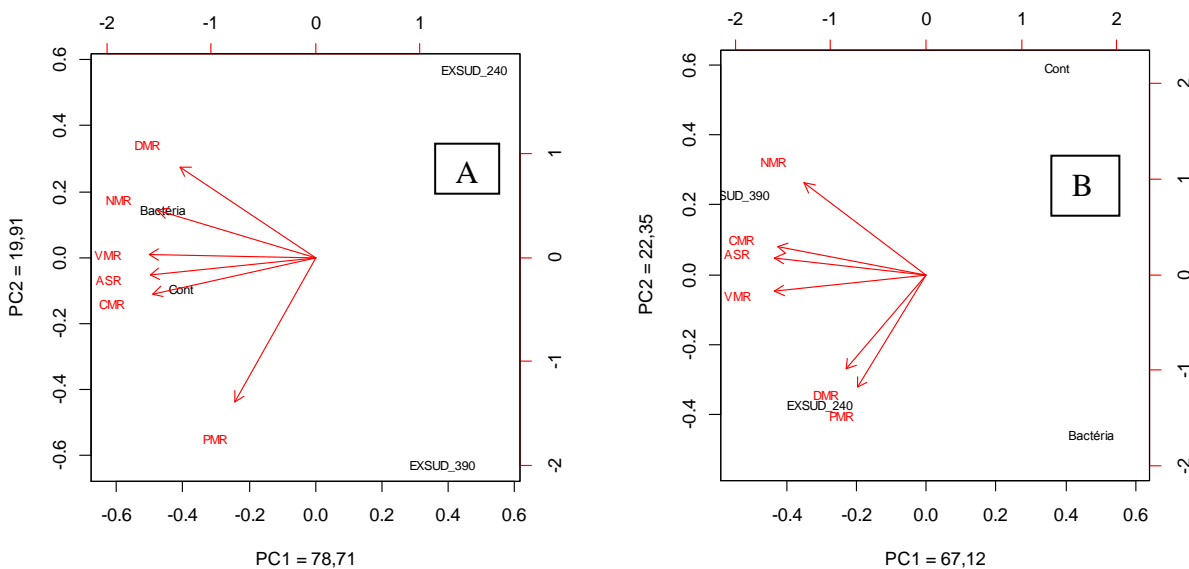


Figura 16: Análise dos componentes principais mostrando as variações dos parâmetros avaliados: número médio de raiz (NMR), diâmetro médio de raiz (DMR), volume médio de raiz (VMR), área superficial de raiz (ASR), comprimento médio de raiz (CMR) e perímetro médio de raiz (PMR). A figura **A** mostra a variação aos 7 dias de transplantio; a figura **B** mostra a variação aos 14 dias de transplantio.

7.5.3 Teste em casa de vegetação

Os efeitos da inoculação de BPCV sobre a arquitetura do sistema radicular e seu metabolismo podem proporcionar vantagens competitivas para as plantas inoculadas, facilitando a obtenção de nutrientes do solo e portanto seu estabelecimento no ambiente de produção, pela maior capacidade competitiva com plantas invasoras e maior resistência contra possíveis estresses ambientais (SANTOS, 2013). Os mecanismos bioquímicos que desencadeiam estas mudanças anatômicas certamente estão relacionados a moléculas de sinalização, como ocorre na simbiose entre rizóbios e leguminosas (VIANA, 2012). Por outro lado, em associações não simbióticas como as existentes entre BPCV e gramíneas, ainda não são conhecidas as moléculas determinantes de compatibilidade associativa e sua forma de atuar sobre os metabolismos vegetal e microbiano.

É importante destacar que o genótipo DKB 240 apresentou indicativos de baixo potencial associativo com a BPCV *A. brasilense*), enquanto o genótipo P30F53H vem demonstrando alta capacidade associativa em ensaios de inoculação a campo realizados pelo Grupo de Pesquisa em Desenvolvimento e Aplicação de Biofertilizantes da UEL, Grudabio (não publicados).

Neste trabalho buscamos quantificar os efeitos da embebição de sementes com exsudatos radiculares, com e sem adição da BPCV *A. brasilense*, sobre os parâmetros fotossintéticos de milho cultivado em condição de casa de vegetação. Fatores como a intensidade luminosa, a temperatura, a concentração de CO₂ e a umidade do solo são determinantes da atividade fotossintética dos vegetais (PEDRAZA, 2010). Da mesma forma, aleloquímicos presentes em exsudatos radiculares tem sido demonstrado por influenciar os parâmetros fotossintéticos em algumas espécies vegetais (LORENZO, et al. 2010), enquanto a taxa fotossintética possui influência sobre a quantidade e qualidade dos metabólitos liberados na rizosfera (Bakker et al. 2012). Cerca de 21% da quantidade total de carbono fixado fotossinteticamente é transferido para a rizosfera pelos exsudatos radiculares, que segregam uma grande quantidade de compostos químicos diferentes neste ambiente (Uribe et al., 2013). O grande investimento energético que a planta demanda para manter abastecido o ambiente rizosférico com moléculas energéticas e sinalizadoras, demonstra a importância evolutiva e ecológica deste processo para um bom desenvolvimento vegetal.

A determinação da taxa de assimilação líquida de CO₂ a fotossíntese (*A*) pelo equipamento IRGA é uma medida do potencial fotossintético das plantas, e compreende uma característica intrínseca de cada espécie vegetal (Wingate et al., 2010). A determinação de *A* aos 30 dias após o transplante das sementes submetidas aos diferentes tratamentos para os

vasos demonstrou um efeito diferenciado (anexo 3) conforme a origem dos exsudatos testados e o genótipo de milho testado. As plantas do genótipo DKB 240 apresentaram no geral uma diminuição nos valores de *A* em comparação às plantas controle, independente do tratamento aplicado; adição de nitrogênio, inoculação com *A. brasilense*, ou inoculação associada à embebição das sementes tratadas com exsudatos homólogos (provenientes do mesmo genótipo) ou heterólogos (provenientes do genótipo DKB 390; Figura 17). Por outro lado, as plantas do genótipo P30F53H apresentaram incrementos nos valores de *A* para todos os tratamentos testados, com destaque para o tratamento de embebição de sementes com exsudatos do genótipo DKB 390 que promoveram incremento de 38,7% na taxa de assimilação líquida de CO₂ em comparação ao tratamento controle. As plantas libertam quantidades significativas de carbono durante fotossíntese na rizosfera através da exsudação de raiz, tornando exsudatos radiculares um fator chave no aumento abundância e atividade microbiana na rizosfera comparação com grandes quantidades de solo (Lynch, 1990; Kapoor & Mukerji, 2006).

Assim como observado para a taxa de assimilação líquida de CO₂, as medições de condutância estomática também apresentaram resultados contrastantes, conforme o tratamento aplicado à semente e o genótipo vegetal estudado. A condutância estomática é uma medida de capacidade de troca de gases pelas folhas, sendo que uma elevada condutância estomática indica que os estômatos foliares estão abertos, enquanto a baixa condutância estomática pode ser interpretada como uma medida indireta da capacidade de absorção de água pelas raízes (SANCHEZ-MARTÍN et al, 2010). A figura 18 apresenta os valores de condutância estomática de plantas de milho com 30 dias de cultivo em vasos contendo perlita como substrato, em resposta a diferentes tratamentos realizados sobre as sementes, antes da germinação. Na avaliação da condutância estomática (gs), os resultados foram melhores para os tratamentos com sementes embebidas de exsudatos radiculares, sendo que o tratamento com exsudato DKB 390 apresentaram melhores resultados, supondo que ao utilizar esses aditivos propiciam a abertura dos estômatos. Estudos utilizando exsudatos radiculares artificiais têm demonstrado a importância de exsudato em diversos processos da rizosfera (Henry et al, 2008).

Embora seja necessário mais trabalho para elucidar os efeitos fisiológicos dos metabólitos e para melhorar o nosso conhecimento sobre a dinâmica nos solos, os resultados obtidos, em conjunto com os nossos resultados iniciais, indicam que os exsudatos radiculares estimulam a condutância estomática aumentando os níveis de fotossíntese.

A intensidade luminosa, a temperatura, a concentração de CO₂, o teor de nitrogênio da folha e a umidade do solo são fatores que afetam a atividade fotossintética dos vegetais (Marenco & Lopes, 2005). O processo de abertura e fechamento dos estômatos está relacionado principalmente com a intensidade de luz e o estado de hidratação da folha. Dessa forma, o funcionamento dos estômatos e a área foliar influenciam a produtividade do vegetal. O primeiro fator porque controla a absorção de CO₂ e o segundo porque determina a interceptação de luz.

Pela análise dos componentes principais (PCA) (Fig. 19 e 20), com relação aos componentes: Diâmetro médio de raiz – DMR; Número máximo de raiz – NMR; Área superficial de raiz – ASR; Comprimento médio de raiz – CMR; Volume médio de raiz – VMR; Massa seca da parte aérea- MSPA e Massa seca de raiz – MSR, os valores obtidos juntamente com tratamento estatístico estão no anexo 3.

Os dois genótipos avaliados DKB240 e P30F53H apresentou aumentos significativos em relação ao tratamento controle; para o parâmetro DMR para o tratamento que continha apenas bactéria (AbV-5 10⁸), comprovando em concordância com resultados prévios de inoculação de BPCV em milho, que demonstram incrementos no desenvolvimento do sistema radicular das plantas inoculadas; segundo Santos e colaboradores (2013) que concluiu que a tecnologia da inoculação de BPCV afeta o desenvolvimento das plantas, promovendo uma diferenciação na arquitetura da planta em sua fase inicial dependente de interações genótipo-genótipo (planta-bactéria). Com relação aos tratamentos realizados com o genótipo DKB 240, a análise de componentes principais explica até 93,95% da variação observada pelo efeito dos dois primeiros parâmetros selecionados, obtivemos os seguintes resultados dos parâmetros avaliados quando comparamos o tratamento com exsudato 390 com o tratamento somente com a bactéria (Ab-V5) apresentando um aumento de 25% no CMR; 18% na ASR ; 15% no NMR e 11% no VMR.

Já para os tratamentos realizados com o genótipo P30F53H, com exceção do DMR, todos os parâmetros apresentaram melhores resultados no tratamento com exsudato 390, a análise de componentes principais explica até 81,05% da variação observada pelo efeito dos dois primeiros parâmetros selecionados sendo que apresentou excelentes resultados quando comparados com o tratamento que continha somente bactéria. Resultando em uma aumento de 113% para CM ; 100% para VMR, ASR e MSPA ; 56% no NMR e 96% na MSR.

O uso de aditivos como os exsudatos radiculares pode modificar a arquitetura das raízes de milho, podendo aumentar a produtividade, além de serem indutores da quimiotaxia. A quimiotaxia e a colonização são os dois elementos primários de interações planta-bactéria.

Quimiotaxia no sentido de exsudatos radiculares é sugerido para ser o primeiro passo da colonização bacteriana (Sood 2003). Além disso, a formação de biofilme por bactérias em raízes de plantas é uma função do desempenho da colonização efetiva (Timmusk et al. 2005; Li et al. 2013). Podemos supor que esses aditivos são eficientes quando se pretende aumentar o rendimento da produção, além de contribuir com uma agricultura sustentável. Na contagem de UFC/mL (Fig. 21) feita pelo maceramento de 1g de raiz e diluído a 10^6 os controles e os controles nitrogenados não apresentaram contagem em nenhum dos genótipos avaliados. Quando avaliado o genótipo DKB 240 o tratamento que apresentou uma maior contagem foi o que continha o exsudato 390 (9,9 log/UFC), seguido do tratamento com exsudato 240 (8,7log/UFC) e por último o tratamento só com bactérias apresentando uma contagem de 8,3log/UFC. Nas avaliações feitas com o genótipo P30F53H, o melhor resultado também foi para o tratamento com exsudato 390(9,14 log/UFC), seguido do tratamento com exsudato 240 (9,04 log/UFC) e por último o com bactéria 8,45 log/UFC A rizosfera é um habitat microbiana muito ativo dirigido por os substratos orgânicos liberados pela planta como exsudatos radiculares (Bais et al., 2006). Estes sinais são importantes para o estabelecimento de interações mutualistas e associativas entre microrganismos e raízes de plantas (Cooper et al 2007; Pothier et al. 2007). Exsudatos radiculares não só atuam como fonte de carbono para os microrganismos do solo, mas também atuam como sinal para atrair ou repelir bactérias (al. Badri et 2009)

Conforme já mencionado anteriormente neste trabalho o exsudato 390 apresenta algumas substâncias na sua composição como flavonoides e isoflavonas, o que pode explicar o fato de esse exsudato apresentar melhores respostas promovendo uma maior quimiotaxia das BPCV.

Esta pesquisa destaca que aditivos como exsudatos radiculares devem estar envolvidos no comportamento dos microrganismos, apresentado na rizosfera da planta que são impulsionadas por esses indutores. Estes resultados dão direção para a produção de novas substâncias que possam compor formulações de biofertilizantes de alta eficiência. Biofertilizantes podem ajudar a atender às demandas de agricultura sustentável, produtiva de baixo custo.

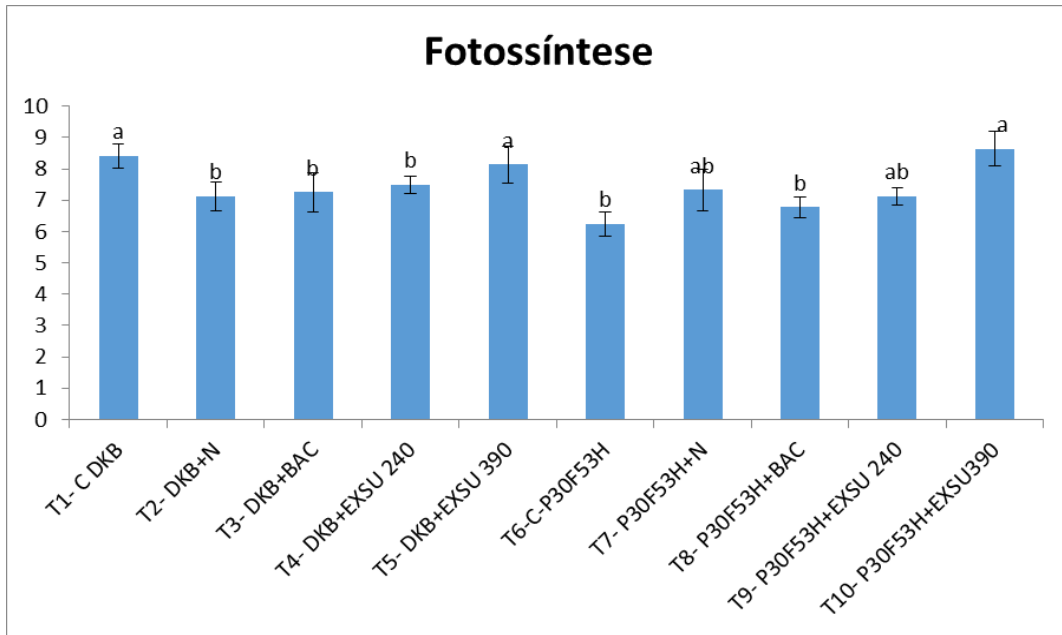


Figura 17: Análise das taxas fotossintéticas medidas pelo analisador de gás infravermelho IRGA após 30 dias de plantio.

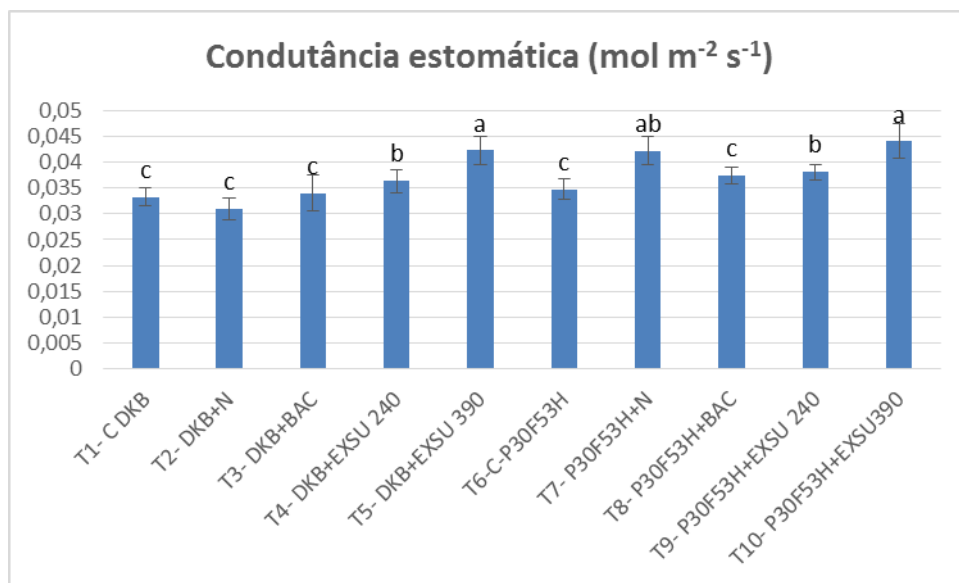


Figura 18: Avaliação da condutância estomática medidas pelo analisador de gás infravermelho IRGA após 30 dias de plantio.

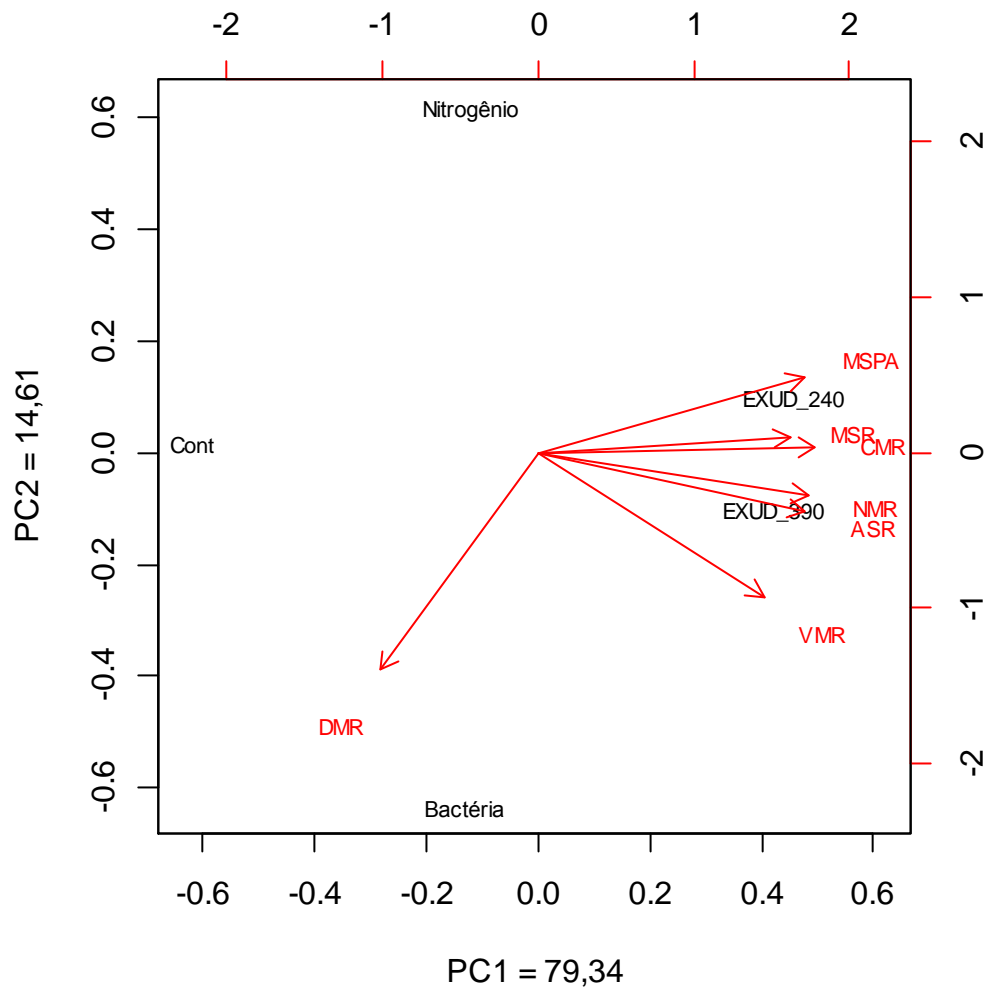


Figura 19: Análise dos componentes principais do genótipo DKB 240, mostrando as variações dos parâmetros avaliados: número médio de raiz (NMR), diâmetro médio de raiz (DMR), volume médio de raiz (VMR), área superficial de raiz (ASR), comprimento médio de raiz (CMR) e perímetro médio de raiz (PMR), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR).

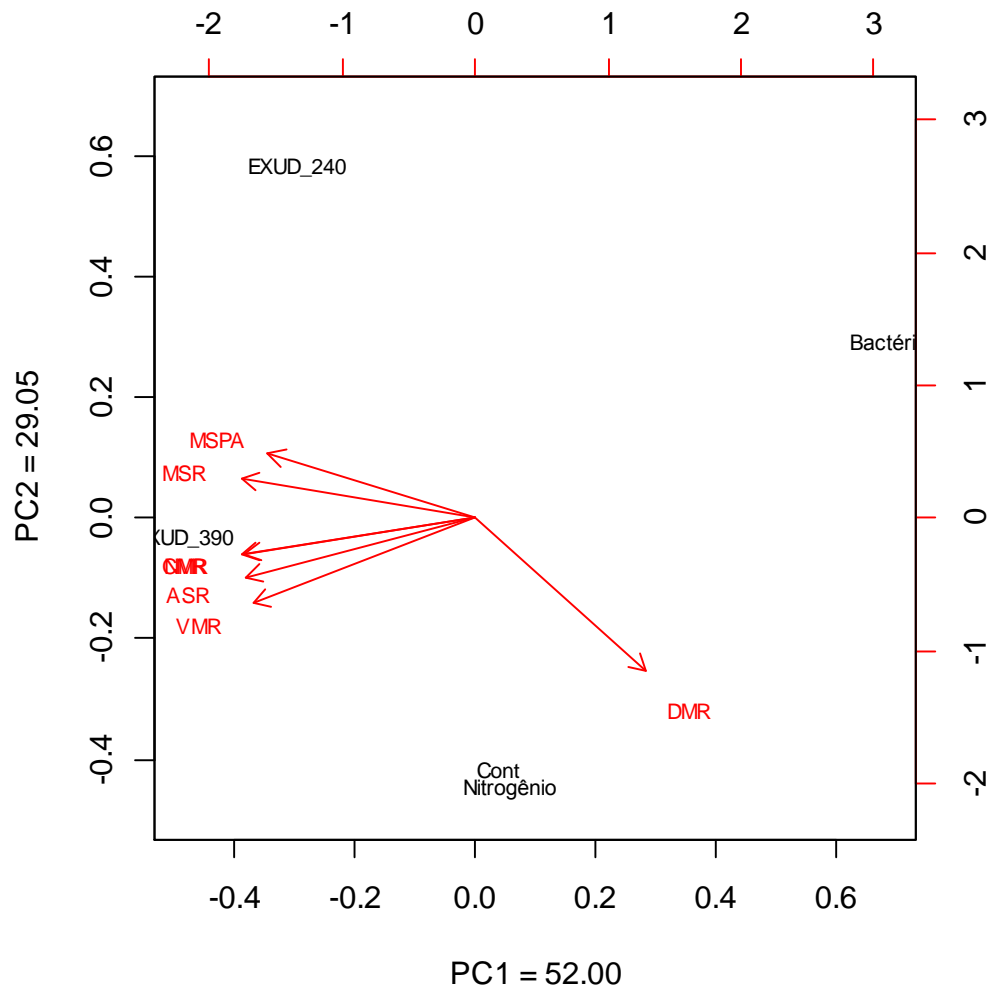


Figura 20: Análise dos componentes principais do genótipo P30F53H, mostrando as variações dos parâmetros avaliados: número médio de raiz (NMR), diâmetro médio de raiz (DMR), volume médio de raiz (VMR), área superficial de raiz (ASR), comprimento médio de raiz (CMR) e perímetro médio de raiz (PMR), massa seca de parte aérea (MSPA), massa seca de raiz (MSR).

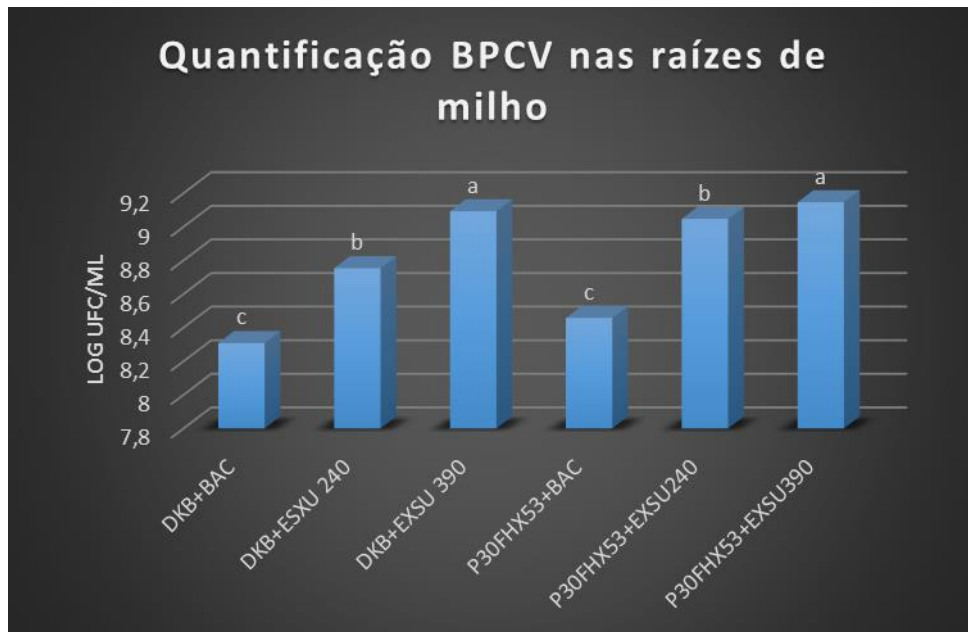


Figura 21: Contagem de UFC/mL das raízes em log/UFC

7.6 CONCLUSÃO

Em todos os experimentos realizados obtivemos os melhores resultados quando utilizamos como incremento o exsudato radicular DKB 390, ficando claro que a diferença da composição desse metabólito proporciona uma ação diferenciada.

A utilização desses compostos podem levar a produção de aditivos para compor novas formulações de biofertilizantes de alta eficiência.

7.7 REFERÊNCIAS

AGUILAR, J.M.M., ASHBY, A.M., RICHARDS, A.J.M., LOAKE, G.J., WATSON, M.D., SHAW, C.H., Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. **J. Gen. Microbiol.** v.134, p.2741-2746, 1998.

ARAUJO, S.A.C. & DEMINICIS, B.B. Fotoinibição da fotossíntese. **Revista Brasileira de Biociências**, v.7, n.4, p.463-472, 2009.

BIBLE, A. N.; STEPHENS, B. B.; ORTEGA, D. R.; XIE, Z.; ALEXANDRE, G. Function of a chemotaxis-like signal transduction pathway in modulating motility, cell clumping and cell length in the alpha-proteobacterium *Azospirillum brasilense* **J. Bacteriol**, v.190, p.6365-6367, 2008.

BAUDOIN, E.; BENIZRI, E.; GUCKERT, A. Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, p. 1183-1192, 2003.

BABALOLA, O. O. **Beneficial bacteria of agricultural importance**. *Biotechnol Lett*, v. 32, n. 11, p. 1559-70, 2010.

BALSANELLI, E. et al. Herbaspirillum seropedicae rfbB and rfbC genes are required for maize colonization. **Environ Microbiol**, v. 12, n. 8, p. 2233-44, 2010.

BARILLI, D. R.; TSUTSUMI, C. Y.; MAY, A.; MIRANDA, A. M.; HACHMANN, T. L.; MODOLON, T. A. **Eficiência na inoculação do milho com Azospirillum brasiliense em diferentes períodos antes da semeadura**. Resumos do VII Congresso Brasileiro de Agroecologia. Cadernos de Agroecologia. Vol 6, No 2 – Fortaleza, Dez 2011.

BRUSAMARELLO-SANTOS, L. C. C. et al. Differential gene expression of rice roots inoculated with the diazotroph Herbaspirillum seropedicae. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1-2, p. 113-125, 2012.

CHAMBERS, J.M. Software for data analysis: **Programming with R**. 2008.

CAVALLET, L. E.; PESSOA, A. C. dos S.; HELMICH, J. J.; HELMICH, P. R.; OST, C. F. Produtividade do milho em resposta à aplicação de nitrogênio e inoculação das sementes com Azospirillum spp. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 4, p. 129-132, 2000.

CHAVARRIA, G.; MELLO, N. Bactérias do gênero Azospirillum e sua relação com gramíneas. **Revista Plantio Direto**, v.125, 2011. Disponível em:<http://www.plantiodireto.com.br/?body=cont_int&id=1075>. Acesso em: 01 nov. 2015.

DERRIEN, D. ; MAROL, C. ; BALESSENT, J. The dynamics of neutral sugars in the rhizosphere of wheat: an approach by ¹³C pulse-labelling and GC/C/IRMS. **Plant Soil**, v.267, p.243-253 , 2004.

DIDONET, A.D.; RODRIGUES, O; KENNER, M.H. Acúmulo de nitrogênio e de massa seca em plantas de trigo inoculadas com Azospirillum brasiliense. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.16, n.9, p.645-651, 1996. (9) ARAUJO, S. C. Realidade e perspectivas para o uso de Azospirillum na cultura do milho. **Revista informações agronômicas**, Piracicaba, n.122, p.4-6, 2008.

EGAMBERDIYEVA, D. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and Nutrient uptake of maize in two different soils. **Appl. Soil**, 36, 184-189. 2007.

FAURE, D.; VEREECKE, D.; LEVEAU, J. H. J. Molecular communication in the rhizosphere. **Plant Soil**, v ; 321, 279-303, 2009.

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

- FERNANDES, F.C.S.; BUZETTI, S.; ARF, O. & ANDRADE, J.A.C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **R. Bras. Milho Sorgo**, 4:195-204, 2005.
- GALKOVSKIY, T. et al. GiA Roots: software for the high-throughput analysis of plant root system architecture. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 116, p. 1–12, 2012.
- GALPERIN, M. Y. A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. **BMC Microbiol.**, 5, 35-41. 2005.
- GUIMARÃES, S. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Efeito da inoculação de bactérias diazotróficas endofíticas em arroz de sequeiro. **Revista Agronomia**, v. 37, n. 2, p. 25-30, 2003.
- HAICHAR, F.Z. ; MAROL, C. ; BERGE, O. ; RANGEL-CASTRO, J. ; PROSSER, J.I. ; BALESSENT, J. ; HEULIN, T. ; ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **ISME J.**v. 2, p. 1221-1230, 2008.
- HAICHAR, F.Z. ; RONCATO, M.A.; ACHOUAK, W. Stable isotope probing of bacterial community structure and gene expression in the rhizosphere of *Arabidopsis thaliana*. **FEMS Microb. Ecol.** v.81, p.291-302, 2012.
- HAYAT, R. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 579–598, 28 ago. 2010.
- HUNGRIA, M.; CAMPO. R.J.; SOUZA, E.M.; PEDROSA, F.O. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, p. 413-425, 2010.
- JONES, D.L., HODGE, A., KUZYAKOV, Y. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. **New Phytol.** v.163, p.459-480, 2004.
- LIU, X.; PARALES, R. E. Chemotaxis of *Escherichia coli* to pyrimidines: a new role for the signal transducer tap. **J Bacteriol**, v.190, p.972–979, 2008.
- KATO, J., KIM, H. E., TAKIGUCHI, N., KURODA, A. & OHTAKE, H. *Pseudomonas aeruginosa* as a model microorganism for investigation of chemotactic behaviours in ecosystem. **J. Biosc and Bioeng.**, 106, 1-7. 2008.
- KAMAL, J. Impact of allelopathy of sunflower (*Helianthus annuus* L.) roots extract on physiology of wheat (*Triticum aestivum* L.). **African Journal of Biotechnology** 10 (65): 14465-14477. (2011).
- KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro,. 470p. 2004.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. Academic Press, London, UK. 1995.
- MARSUDI, N. D. S.; GLENN, A. R.; DILWORTH, M. J. Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, p. 1229.1238, 1999.

- MARENCO, R.A.; LOPES, N.F. **Fisiologia Vegetal: Fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral**, Editora UFV. Viçosa, MG. 451p. 2005
- NARULA, N.; KOTHE, E.; BEHL, R. K. Role of root exudates in plant-microbe interactions. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 130, n. 2, p. 122–130, 2009.
- NEAL, A.L. ; AHMAD, S. ; GORDON-WEEKS, R. ; TON, J. Benzoxazinoids in root exudates of maize attract *Pseudomonas putida* to the, rhizosphere, 2012.
- NEUMANN, G.; BOTT, S.; OHLER, M. A. ; MOCK, H. P. ; LIPPMANN, R. ; GROSCH, R. ; SMALLA, K. Root exudation and root development of lettuce (*Lactuca sativa* L. cv. Tizian) as affected by different soils. **Front. Microbiol.** <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00002> eCollection 2014.
- NGUYEN, C. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. **Agronomie** v.23, p.375-396. 2003.
- PHILLIPS, D. A. ; JOSEPH, C. M. ; MAXWELL, C. A. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2 protein in *Rhizobium meliloti*. **Plant Physiol.** v. 99, p.1526-1531, 1992.
- SANTOS, DA S.J.; **Isolamento e Inoculação de Bactérias Diazotróficas na cultura do milho em Vitória da Conquista – BA**. Vitória da Conquista - BA: UESB, (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) p. 97; 2013.
- SALA, V.M.R.; SILVEIRA, A.P.D. da; CARDOSO, E.J.B.N. **Bactérias diazotróficas associadas a plantas não-leguminosas**. In: SILVEIRA, A.P. da; FREITAS, S. dos S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Campinas: IAC, 2007. Cap. 6, p. 97-116
- REIS JUNIOR, F. B. dos; MACHADO, C. T. de T.; MACHADO, A. T.; SODEK, L. Inoculação de *Azospirillum amazonense* em dois genótipos de milho sob diferentes regimes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, n. 3, p. 1139- 1146, 2008.
- ROESCH, L. F. W.; OLIVARES, F. L.; PASSAGLIA, L. P. M.; SELBACH, P. A.; SÁ, E. L. S de; CAMARGO, F. A. O. Characterization of diazotrophic bacteria associated with maize: effect of plant genotype, ontogeny and nitrogen-supply. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, n. 9, p. 967-974, 2006.
- REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. **Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees**. CRC Critical Review in Microbiology, Boca Raton, v. 30, p. 205-240, 2000
- SINGH, P.; KUMAR, V.; AGRAWAL, S. Evaluation of phytase producing bacteria for their plant growth promoting activities. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, Article ID 426483, 2014. doi:10.1155/2014/426483.
- VALENTOVIC, P., LUXOVA, M., KOLAROVI, L., AND GASPARIKORA, O. Effect of osmotic stress on compatible solutes content, membranestability and water relation in two maize. **Plant Soil Environment** 52 (4): 186-191. 2006.

VIANA, T. O. **Isolamento e inoculação de bactérias diazotróficas em arroz (*Oryza sativa* L.) cultivado em Vitória da Conquista - BA.** Vitória da Conquista - BA: UESB, (Dissertação – Mestrado em Agronomia, Área de Concentração em Fitotecnia) p. 97; 2012.

WHIPPS, J.M., Carbon economy. In: Lynch, J.M. (Ed.), **The Rhizosphere.** JohnWiley & Sons Ltd, Essex, UK, p. 59-97, 1990.

7.8 Anexos

8 Anexo I

Meio Dyg's

- 2 g de glicose
- 1,5 g de peptona
- 2 g extrato de levedura
- 0,5 g de K_2HPO_4
- 0,5 de $MgSO_4$
- Água destilada q.s.p. 1 L
- pH 6,0

9 Anexo II

Composição das soluções nutritivas utilizadas nos ensaios de isolamento de BPCVs a partir de diferentes condições edáficas. Soluções A e B modificadas a partir da composição da solução nutritiva original de Hoagland e Arnon (1951)

Sais	Concentração da solução estoque (g L ⁻¹)	Solução A	Solução B	Solução C
Volume da solução estoque (mL) por litro de solução final				
KH ₂ PO ₄	136,09	1	0,1	1
KNO ₃	101,11	0,5	5	5
Ca(NO ₃) _{2.5}				
H ₂ O	236,16	0,5	5	5
MgSO _{4.7 H₂O}	247,47	2	2	2
KCl	74,56	4,5	-	-
CaCl _{2.2 H₂O}	147,02	4,5	-	-
Solução de micronutrientes*		1	1	1
Solução de FeEDTA**		1	1	1

*Solução estoque (1 L): 2,86 g H₃BO₃; 1,81 g MnCl_{2.4 H₂O}; 0,10 g ZnCl₂; 0,04 g CuCl₂; 0,02 g H₂MoO₄.

**Solução estoque (1 L): 24,25 g de FeCl_{2.6 H₂O}; 33,2g Na-EDTA; 89 mL NaOH 1N.

10 Anexo III

Valores obtidos pelo Gia roots sobre o teste de desenvolvimento inicial de raiz do genótipo DKB 240								
Tratamento	Diametro	Nº raiz	Mediana de raiz	Perímetro de raiz	Comprimento específico	Área superficial	Comprimento total	Volume
Bac	0,811408	8,216667	4,633333333	359,9888889	106,9697637	56,10407642	201,251282	1,91999
controle	0,084698	10,91667	5,916666667	488,8948243	116,9048686	78,60760301	294,5641026	2,633388
Exsu 240	0,09099	14,22222	7,444444444	535,3504273	106,40654	93,30673169	328,6077873	3,130489
Exsu390	0,085558	15,30556	9,333333333	671,477208	116,908455	110,851218	413,1982431	3,547344

11 Anexo IV

RESULTADOS EXPERIMENTO CASA DE VEGETAÇÃO ANALIZADOS ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE TUKEY

F.V.	Genótipo	Tratamento									
		Cont		Bactéria		EXSUD_240		EXSUD_390		Nitrogênio	
DMR	DKB240	0,0804	A a	0,0854	A a	0,078	A a	0,081	A A	0,0765	A a
	P30F53H	0,0867	A a	0,0855	A a	0,0809	A a	0,0817	A A	0,0852	A a
NMR	DKB240	16,6	C b	21	BC a	27,8333	A a	23,8333	AB B	20,1429	BC b
	P30F53H	27,8889	A a	19,5	B a	30,8889	A a	32,7778	A A	31	A a
ASR	DKB240	149,6217	A b	200,1807	A a	230,5292	A b	225,1093	A B	176,8935	A b
	P30F53H	284,3317	B a	167,4331	C a	316,0771	AB a	377,1446	A A	306,0029	AB a
CMR	DKB240	545,0239	B b	705,5778	AB a	905,3846	A b	893,3162	A B	740,3231	AB b
	P30F53H	1024,365	B a	622,7169	C a	1251,012	AB a	1475,126	A A	1205,878	AB a
VMR	DKB240	4,5154	B b	6,4699	AB a	6,7986	AB b	7,7284	A B	5,3063	AB b
	P30F53H	10,1009	A a	5,9657	B a	9,8885	A a	12,0437	A A	10,1258	A a
MSPA	DKB240	0,1617	CD a	0,16	D a	0,34	A a	0,2967	AB A	0,2383	BC a
	P30F53H	0,2044	AB a	0,09	C b	0,2586	A b	0,2322	A B	0,1257	C b
MSR	DKB240	0,142	C b	0,1543	BC a	0,23	AB a	0,2383	A A	0,1643	ABC a
	P30F53H	0,2338	A a	0,1313	B a	0,27	A a	0,2911	A A	0,215	A a
PHOT	DKB240	8,419	A a	7,2478	A a	7,485	A a	8,1359	A A	7,1149	A a
	P30F53H	6,2793	A b	6,5588	A a	6,9447	A a	7,8823	A A	7,5208	A a
COND	DKB240	0,0333	AB a	0,034	AB a	0,0364	AB a	0,0423	A A	0,0309	B b
	P30F53H	0,0342	A a	0,0368	A a	0,0385	A a	0,0419	A A	0,0426	A a

*as letras maiúsculas representam a diferença entre os genótipos testados e as minúsculas entre os tratamentos. Tukey 5%

12 Anexo V

Valores obtidos pelo Gia Roots no experimento no tubo aos 7 dias de cultivo						
Trat	DMR	PMR	NMR	ASR	CMR	VMR
Bactéria	0,124a	17,949b	33a	227,010a	579,762a	11,946a
Cont	0,125a	20,305a	29,5a	219,596a	572,2458a	11,817a
EXSUD_240	0,122a	12,131c	23b	154,774b	403,669b	7,863b
EXSUD_390	0,117a	10,351c	20,5b	171,438b	465,635b	8,156b

Anexo VI

Valores obtidos pelo Gia roots sobre o experimento Tubo aos 14 dias de cultivo						
Trat	DMR	PMR	NMR	ASR	CMR	VMR

Bactéria	0,1923a	29,277b	42b	257,01b	599,30b	15,134b
Cont	0,136a	21,876b	33,2b	233,331b	590,43b	14,555b
EXSUD_240	0,424a	37,982a	54,3 ^a	289,314a	645.65a	19,234
EXSUD_390	0,393a	33,307 ^a	61,2 ^a	310,498a	690,33a	21,723 ^a

Anexo VII

Normas para publicação da revista *Applied Microbiology and Biotechnology*

Submissão do Manuscrito

Apresentação de um manuscrito implica: que o trabalho descrito não tenha sido publicado antes; que não está sob consideração para publicação em nenhum outro lugar; que sua publicação tenha sido aprovado por todos os co-autores, se houver, bem como pelas autoridades responsáveis - tácita ou explicitamente - no instituto, onde o trabalho foi realizado. O editor não será considerado legalmente responsável deve haver nenhum pedido de indenização.

Permissões

Autores que desejam incluir figuras, tabelas, ou passagens de texto que já tenham sido publicados em outros lugares são necessários para obter a permissão do proprietário dos direitos de autor (s), tanto para o formato impresso e on-line e para incluir provas de que tal permissão foi concedida ao apresentarem os seus trabalhos . Qualquer material recebido sem essa prova será assumido se originar de seus autores.

Submissão Online

Por favor, siga o link "Submeter online" à direita e fazer upload de todos os seus arquivos manuscrito seguindo as instruções dadas na tela.

FOLHA DE ROSTO

Folha de rosto

A página de título deve incluir:

- O nome do (s) autor (s)
- Um título conciso e informativo
- A afiliação (s) e endereço (s) do (s) autor
- Os números do endereço de e-mail, telefone e fax do autor correspondente

Resumo

Por favor, forneça um resumo de 150 a 250 palavras. O resumo não deve conter abreviaturas ou referências indefinidas não especificados.

Palavras-chave

Por favor proporcionar 4 a 6 palavras-chave que podem ser utilizados para fins de indexação.

- Notas de Rodapé

Notas de rodapé essenciais ao texto devem ser numeradas consecutivamente e colocado na parte inferior da página a que se referem.

Notas de rodapé na página de título não são dadas símbolos de referência. Notas de rodapé no texto estão numeradas consecutivamente; aqueles para tabelas deverão ser indicados por sobrescrito letras minúsculas (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos).

- Introdução

A Introdução deve indicar a finalidade do inquérito e dar uma breve revisão da literatura pertinente (max. Uma página impressa).

- Materiais e métodos

A seção Materiais e Métodos deve seguir a Introdução e deve fornecer informações suficientes para permitir a repetição do trabalho experimental.

Os microrganismos utilizados no estudo e, nomeadamente novos isolados devem ser depositados em uma coleção cultura acessível ao público pertencente ao WDCM (por exemplo, a DSM, a ATCC, NCIMB; veja o link abaixo para uma lista completa das coleções de culturas WDCM que são todos adequado) . Os autores devem referir-se a coleta eo número de tensão no texto para garantir que as tensões estão disponíveis a outros cientistas. Se sequências de ácidos ou aminoácidos nucleicos são apresentados (Isto também inclui otimizado sequências de genes conhecidos), um número de acesso GenBank / EMBL para nucleótidos primário e / ou dados da sequência de aminoácidos deve ser incluído num ponto separado no final dos materiais e seção de métodos. Enormes conjuntos de dados de sequenciação ou dados em bruto deve também ser depositado, por exemplo, como um NCBI Bioproject (link abaixo).

Para os estudos em proteômica, as informações mínimas sobre um experimento proteômica (MIAPE) da proteômica Hupo iniciativa padrão (veja o link abaixo) e normas de publicação para a análise e documentação de peptídeos e proteínas identificações pela Sociedade Americana de Bioquímica e Biologia Molecular (no link abaixo) deve ser seguido. Uma réplica biológica não será aceitável.

Para as análises de cristalografia de raios-X de proteínas (enzimas), os autores deverão obter cada APO ID para uma estrutura de proteína a partir de PDB (The Worldwide

Protein Data Bank (wwPDB)) e adicioná-lo ao manuscrito apenas como números de acesso como de nucleotídeos.

Para fontes comerciais de materiais utilizados, deverá ser indicado o nome da empresa, cidade e país.

- Resultados

A seção de Resultados deve descrever o resultado do estudo. Os dados devem ser apresentados da forma mais concisa possível, se for caso disso, na forma de tabelas ou figuras, embora tabelas muito grandes devem ser evitados.

- Discussão

A discussão deve ser uma interpretação dos resultados e seu significado com referência a publicações de outros laboratórios.

ESTILO CIENTÍFICO

Todos os nomes de táxons (nomes de espécies, nomes do gênero, e os nomes das categorias mais elevadas) devem estar em *itálico*.

Referências

Citação

Cite as referências no texto por nome e ano entre parênteses.

Trabalhos de vários autores devem ser citadas no texto com "et al."; primeiro nome do autor não é suficiente; nomes dos autores e dois papéis deve ser dada tanto.

Lista de referência

A lista de referências deve incluir apenas obras que são citadas no texto e que tenham sido publicados ou aceites para publicação. As comunicações pessoais e obras inéditas só devem ser mencionadas no texto. Não use notas de rodapé ou notas de fim como um substituto para uma lista de referência.

As entradas da lista de referência deve estar em ordem alfabética pelos sobrenomes do primeiro autor de cada trabalho.

Sempre use a abreviatura padrão do nome de uma revista de acordo com o ISSN

Lista de título do Word abreviações, ver

Observe:

- Todos os nomes de autores deve ser fornecida nas referências da AMB-manuscritos!

- Por favor, não use um estilo EndNote abreviar listas autor longas com "et al.!"

QUADROS

- Todas as tabelas devem ser numerados em algarismos arábicos.

- As tabelas devem ser sempre citadas no texto em ordem numérica consecutiva.
- Para cada tabela, por favor fornecer uma legenda da tabela (título) explicando os componentes da mesa.
 - Identificar qualquer material publicado anteriormente, dando a fonte original na forma de uma referência no final da legenda da tabela.
 - notas de rodapé de tabelas devem ser indicadas por letras minúsculas sobrescrito (ou asteriscos para valores de significância e outros dados estatísticos) e incluídos sob o corpo da tabela.