

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

LEANDRO REIS COSTA SANTOS

**VARIAÇÕES NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO E NAS COMUNIDADES
DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM GENÓTIPOS DE MILHO
RECOMENDADOS PARA CULTIVO EM PERNAMBUCO**

RECIFE, PE

2022

Leandro Reis Costa Santos
Engenheiro agrônomo e Mestre em Ciência do solo

**Variações na fixação de nitrogênio e nas comunidades de bactérias endofíticas em
genótipos de milho recomendados para cultivo em Pernambuco**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
em Ciência do Solo da Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como parte de Requisitos
para a obtenção do título de Doutor em Ciência
do Solo.

Orientadora:

Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas

Coorientadores:

Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra

Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior

Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos

RECIFE, PE

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237v

Santos, Leandro Reis Costa

VARIAÇÕES NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO E NAS COMUNIDADES DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM GENÓTIPOS DE MILHO RECOMENDADOS PARA CULTIVO EM PERNAMBUCO / Leandro Reis Costa Santos. - 2022.

107 f. : il.

Orientadora: Ana Dolores Santiago de Freitas.

Coorientadora: Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra.

Inclui referências e apêndice(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Recife, 2022.

1. Zea mays L. 2. Sistema fotossintético C4. 3. Sequenciamento de nova geração. 4. Diversidade genética. I. Freitas, Ana Dolores Santiago de, orient. II. Lyra, Maria do Carmo Catanho Pereira de, coorient. III. Título

CDD 631.4

LEANDRO REIS COSTA SANTOS

Variações na fixação de nitrogênio e nas comunidades de bactérias endofíticas em genótipos de milho recomendados para cultivo em Pernambuco

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência do Solo.

Aprovada em 30 de março de 2022

Prof(a). Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas
Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco

BANCA EXAMINADORA

Dra. Carolina Etienne de Rosália e Silva Santos
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Everardo Valadares de Sá Barreto Sampaio
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. German Andes Estrada Bonilla
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria

Dr, Caio Augusto Yoshiura
Instituto Tecnológico Vale

Aos meus pais, Maria José e Reizinho, por sempre acreditarem e me apoiarem em todas as minhas decisões, e também pelo amor, carinho e preocupação em mim depositados.

Às minhas irmãs, Lays e Lanna, pelo apoio e cumplicidade.

Aos meus amados sobrinhos Mariana e Calebe, que com sua inocência de criança me proporcionaram tranquilidade em dias difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que em sua plena bondade sempre me guardou e me proporcionou oportunidades de evoluir em diversos aspectos.

À minha orientadora, Dra. Ana Dolores Santiago de Freitas, pelos conhecimentos transmitidos, pelas conversas, risadas e conselhos, e principalmente pela paciência comigo. E também à minha coorientadora e amiga, Dra. Carolina Etienne Santos, e ao meu coorientador, Dr. Paulo Ivan Fernandes Júnior.

A minha amiga e colaboradora Aline Fernandes, que muito me ajudou.

Aos meus amigos do grupo de pesquisa de Fixação Biológica de Nitrogênio (GFBN), em especial a Jéssica Oliveira. Aos meus amigos Adriana, Petrônio, Emmanuelle e Sueide. Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia da Embrapa Semiárido.

Ao grupo do Laboratório de Biotecnologia e Ecologia Microbiana da UFRJ, em especial a Caio Rachid, Douglas Monteiro e a Pedro Sodré, pelo apoio nas análises de bioinformática.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela disponibilização da bolsa de estudo.

Aos professores da pós-graduação, que investiram tempo e paciência para me transmitir seus conhecimentos. Aos técnicos dos laboratórios e aos alunos de iniciação científica.

À secretária do PPG Solos, Sra. Socorro Santana, por sempre estar disposta a ajudar na parte burocrática ou simplesmente pelas conversas e conselhos.

Aos pesquisadores do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), em especial à Dra. Maria do Carmo Lyra e ao Dr. José Nildo Tabosa.

A todos, meu MUITO OBRIGADO!

Ele respondeu: "Porque a fé que vocês têm é pequena. Eu asseguro que, se vocês tiverem fé do tamanho de um grão de mostarda, poderão dizer a este monte: 'Vá daqui para lá', e ele irá.

Nada será impossível para vocês.

Mateus, 17:20.

Variações na fixação de nitrogênio e nas comunidades de bactérias endofíticas em genótipos de milho recomendados para cultivo em Pernambuco

RESUMO

O milho é o principal cereal produzido no Brasil e no mundo, sendo largamente utilizado na alimentação humana e animal e na produção de biocombustíveis. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) e a utilização de processos mediados pelas comunidades endofíticas dessa gramínea são alternativas para maior disponibilização de nutrientes e desenvolvimento de mecanismos de promoção de crescimento da planta, maiores produtividades e economia de insumos dependentes de energia fóssil. Por sua importância social e econômica, existe grande disponibilidade de genótipos de milho, recomendados para as diversas regiões de cultivo. O objetivo desse trabalho foi estimar a FBN e a composição qualitativa das comunidades de bactérias endofíticas de genótipos de milho, identificados como os mais produtivos para as condições do Nordeste brasileiro, cultivados em diferentes condições edafoclimáticas. Foram conduzidos três experimentos em campo, sem utilização de inoculantes bacterianos, em Araripina, Serra Talhada e Vitória de Santo Antão, Pernambuco. Em Araripina e Serra Talhada foram cultivados os genótipos BRS 4107, BRS 5026, BRS 4105, POTIGUAR, COPACABANA, BR 5036, BR 5037, MUCURIBE, IPR 164 e BR 2121 QPM. Em Vitória, os genótipos foram 1L1411, 1P2224, DKB 390 PRO 2, 1F640, DKB 310 PRO 2, CMS 36, SÃO JOÃO, BRS 3042, 1P2227 e 1M1804. Foram observadas diferenças significativas entre as composições isotópicas de N das folhas do milho e as do N do solo disponível para a cultura (estimada por meio de duas abordagens diferentes) em duas áreas experimentais. Esse resultado demonstra que a técnica da abundância natural do ^{15}N pode indicar genótipos de milho com maior potencial para se beneficiar da FBN, informação útil em programas de melhoramento vegetal da cultura. Portanto, diferentes genótipos de milho recomendados para maior produtividade para a região Nordeste do Brasil absorvem N fixado por diazotróficos naturalmente estabelecidos na rizosfera ou endofiticamente. Os genótipos BR 5036 e BRS 4105, em Araripina, e DKB 310 PRO2 e 1F640, em Vitória, apresentaram a maior proporção de N fixado. Entretanto, a capacidade de acumular N fixado dos genótipos testados em Serra Talhada foi fortemente restringida pelas condições edafoclimáticas e estresse hídrico. As comunidades de bactérias endofíticas de plantas de milho não inoculadas abrigam gêneros com relatos de apresentarem mecanismos de promoção de crescimento de plantas, como FBN, produção de fitohormônios, supressão de fitopatógenos, tolerância a fatores abióticos e solubilização de nutrientes. O genótipo do milho não teve influência significativa sobre a composição do microbioma endofítico, porém o local de cultivo sim. As raízes apresentam maior diversidade de bactérias endofíticas que os colmos, provavelmente devido aos compostos excretados por ela. Os gêneros de bactérias endofíticas de maior ocorrência em raízes e colmos de milho foram *Leifsonia*, *Bacillus*, *Klebsiella* e *Streptomyces*, seguidos por *Bradyrhizobium*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Sphingomonas*, independentemente do genótipo da planta ou das condições edafoclimáticas do local de cultivo. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Geobacillus*, *Enterococcus* e *Mycobacterium* ocorreram em menores quantidades, sempre com maior abundância relativa nas raízes.

Palavras-chave: *Zea mays* L. Sistema fotossintético C4. Sequenciamento de nova geração. Diversidade genética.

Variations in nitrogen fixation and endophytic bacterial communities in maize genotypes recommended for cultivation in Pernambuco

ABSTRACT

Maize is the main cereal produced in Brazil and in the world, being widely used in human and animal food and in the production of biofuels. Biological nitrogen fixation (BNF) and the use of processes mediated by the endophytic communities of this grass are alternatives to increase the availability of nutrients and to provide mechanisms to promote plant growth, higher yields and economy of inputs dependent on fossil energy. Due to its social and economic importance, there is a wide availability of maize genotypes, recommended for the different growing regions. The objective of this work was to estimate the BNF and the qualitative composition of endophytic bacteria communities of maize genotypes, identified as the most productive in the Brazilian Northeast. Three field experiments were carried out without bacterial inoculation, in Araripina, Serra Talhada and Vitória de Santo Antão municipalities, Pernambuco state. In Araripina and Serra Talhada, the genotypes BRS 4107, BRS 5026, BRS 4105, POTIGUAR, COPACABANA, BR 5036, BR 5037, MUCURIPE, IPR 164 and BR 2121 QPM were cultivated. In Vitória, the genotypes were 1L1411, 1P2224, DKB 390 PRO 2, 1F640, DKB 310 PRO 2, CMS 36, SÃO JOÃO, BRS 3042, 1P2227 and 1M1804. Significant differences were observed between the isotopic compositions of N in the maize leaves and soil available N (estimated using two different approaches) in two experimental areas. The technique of natural abundance of ^{15}N can indicate maize genotypes with the greatest potential to benefit from BNF, useful information in plant breeding programs for the crop. Different corn genotypes recommended for higher productivity for the Northeast region of Brazil absorb N fixed by diazotrophs naturally established in the rhizosphere or endophytically. The genotypes BR 5036 and BRS 4105, in Araripina, and DKB 310 PRO2 and 1F640, in Vitória, had the highest proportion of fixed N. The ability to accumulate fixed N in Serra Talhada was restricted by soil and climate conditions and water stress. The communities of endophytic bacteria of uninoculated corn plants harbor genera which are reported to have mechanisms that promote plant growth, such as FBN, production of phytohormones, suppression of phytopathogens, tolerance to abiotic factors and solubilization of nutrients. The maize genotype had no significant influence on the composition of the endophytic microbiome, but the place of cultivation did. The roots have a greater diversity of endophytic bacteria than the stalks, probably due to the compounds excreted by it. The genera of endophytic bacteria with the highest occurrence in corn roots and stalks were *Leifsonia*, *Bacillus*, *Klebsiella* and *Streptomyces*, followed by *Bradyrhizobium*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* and *Sphingomonas*, regardless of the plant genotype or the soil and climate conditions. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Geobacillus*, *Enterococcus* and *Mycobacterium* occurred in smaller amounts, always with greater relative abundance in the roots.

Keywords: *Zea mays* L. C4 photosynthetic system. Next-generation sequencing. Genetical diversity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Alfa diversidade de bactérias endofíticas em diferentes genótipos e compartimentos de plantas milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO I)..... 72
- Figura 2: Alfa diversidade de bactérias endofíticas em diferentes genótipos e compartimentos de plantas milho cultivados em Araripina e Serra Talhas de Pernambuco, Brazil (MODELO II).
..... 73
- Figura 3: Beta diversidade de bactérias endofíticas em diferentes genótipos e compartimentos de plantas milho cultivados em Araripina e Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELOS I e II)..... 75
- Figura 4: Abundância relativa dos 15 gêneros bactérias endofíticas de maior presença em diferentes genótipos e compartimentos de plantas milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO I)..... 77
- Figura 5: Abundância relativa dos 15 gêneros bactérias endofíticas de maior presença em raiz de dois genótipos milho cultivados em Araripina e Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO II). 79
- Figura 6: Ocorrências de gêneros de bactérias endofíticas em genótipos milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO I). Anel interior referente aos filios. Anel exterior referente a maiois unidade taxonômica obtida. Letras: (c) – Classe; (o) – Ordem; (f) – Família; (g) – Gênero. Números :1; 2; 3 e 4 se refere ao número de ocorrências nas OTUs diferentes. A cor se refere ao filo específico..... 81
- Figura 7: Rede de coocorrência/interação de bactérias endofíticas em raiz de genótipos milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO I). Tamanho do balão se refere a abundância da unidade taxonômica em relação aos demais. A cor do balão se refere ao agrupamento. Espessura da borda significa uma maior interação com outros indivíduos. Linha verde se refere a relação positiva e a vermelha relação negativa. A espessura da linha se refere a intensidade da interação. Letras: (k) – Reino; (p) – filo; (c) – Classe; (o) – Ordem; (f) – Família; (g) – Gênero..... 83
- Figura 8: Rede de coocorrência/interação de bactérias endofíticas em colmo de genótipos milho cultivados Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO I). Tamanho do balão se refere a abundância da unidade taxonômica em relação aos demais. A cor do balão se refere ao agrupamento. Espessura da borda significa uma maior interação com outros indivíduos. Linha verde se refere a relação positiva e a vermelha relação negativa. A espessura da linha se refere a intensidade da interação. Letras: (k) – Reino; (p) – filo; (c) – Classe; (o) – Ordem; (f) – Família; (g) – Gênero..... 84
- Figura 9: Rede de coocorrência/interação de bactérias endofíticas em raiz de dois genótipos milho cultivados em Araripina, Pernambuco, Brazil (MODELO II). Tamanho do balão se refere a abundância da unidade taxonômica em relação aos demais. A cor do balão se refere ao agrupamento. Espessura da borda significa uma maior interação com outros indivíduos. Linha

verde se refere a relação positiva e a vermelha relação negativa. A espessura da linha se refere a intensidade da interação. Letras: (k) – Reino; (p) – filo; (c) – Classe; (o) – Ordem; (f) – Família; (g) – Gênero. 85

Figura 10: Rede de coocorrência/interação de bactérias endofíticas em raiz de dois genótipos milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO II). Tamanho do balão se refere a abundância da unidade taxonômica em relação aos demais. A cor do balão se refere ao agrupamento. Espessura da borda significa uma maior interação com outros indivíduos. Linha verde se refere a relação positiva e a vermelha relação negativa. A espessura da linha se refere a intensidade da interação. Letras: (k) – Reino; (p) – filo; (c) – Classe; (o) – Ordem; (f) – Família; (g) – Gênero. 86

Figura 11: Cladograma por análise de LEfSE comparando as bactérias endofíticas de raiz e colmo de genótipos milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO I). 88

Figura 12: Cladograma por análise de LEfSE comparando as bactérias endofíticas de raiz e colmo em relação aos genótipos milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO I). 89

Figura 13: Cladograma por análise de LEfSE comparando as bactérias endofíticas em raiz de genótipos milho cultivados em Araripina e Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO II). 91

Figura 14: Cladograma por análise de LEfSE comparando as bactérias endofíticas de raiz de dois genótipos milho cultivados em Araripina e Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO II). 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização edafoclimática das áreas onde os experimentos foram conduzidos.	40
Tabela 2. Produtividade de genótipos cultivados em Araripina, Serra Talhada e Vitória de Santo Antão.....	40
Tabela 3: Caracterização das propriedades químicas, físicas e isotópicas em camadas dos solos das áreas experimentais.....	42
Tabela 4: Composição isotópica de C e N (‰), Nitrogênio total (%), relação C/N e percentual do N derivado da atmosfera (%) em diferentes genótipos de milho e plantas referências cultivadas em Araripina no estado de Pernambuco.	46
Tabela 5: Composição isotópica de C e N (‰), Nitrogênio total (%), relação C/N e percentual do N derivado da atmosfera (%) em diferentes genótipos de milho e plantas referências cultivadas em Serra Talhada no estado de Pernambuco.	47
Tabela 6: Composição isotópica de C e N (‰), Nitrogênio total (%), relação C/N e percentual do N derivado da atmosfera (%) em diferentes genótipos de milho e plantas referências cultivadas em Vitória de Santo Antão no estado de Pernambuco.....	48
Tabela 7: Estimativa do sinal isotópico do N do solo disponível em profundidade em plantas referência cultivadas em vaso em solo proveniente dos locais dos experimentos de campo ..	49
Tabela 8: Estimativas da proporção de N derivado da atmosfera (%N _{da} 2) estimada pela técnica de abundância natural de ¹⁵ N utilizando como valor de δ ¹⁵ N da planta referência o valor da média ponderada para as profundidades de 0-0,6 m.	50
Tabela 9: Caracterização edafoclimática das áreas experimentais	64
Tabela 10: Caracterização química e física dos solos das áreas experimentais.....	65
Tabela 11: Amostras dos genótipos/órgãos estudados em cada MODELO	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{13}C	Isótopo de carbono 13
^{15}N	Isótopo de nitrogênio 15
AIA	Ácido indol-3-acético
ATP	Adenosina trifosfato
BPCP	Bactéria promotora de crescimento de plantas
C	Carbono
C4	Produto da fotossíntese de 4 átomos de carbono
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
Gj	Gigajoule
H	Hidrogênio
ha	Hectares
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
Kg	Quilograma
kg/ha	Quilo por hectare
MO	Matéria orgânica
MOS	Matéria orgânica do solo
Mpa	Megapascal
N	Nitrogênio
N_2	Dinitrogênio
NH_3	Amônia
NH_4^+	Amônio
NO_3^-	Nitrato
O	Oxigênio
OTU	Unidade Taxonômica Operacional
t	Tonelada
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Hipóteses.....	17
1.2 Objetivos.....	18
1.2.1 Objetivo geral.....	18
1.2.2 Objetivos específicos	18
2 CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura	19
2.1 A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e a inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) em gramíneas	20
2.2 Produção de milho no Brasil e no Nordeste.....	23
2.3 Técnicas isotópicas para estudos do ciclo do N e da FBN.....	24
2.4 A análise metagenômica em estudos de comunidade microbianas.....	26
REFERÊNCIAS.....	28
3 Capítulo 2: Estimativa da contribuição do N atmosférico para a nutrição de diferentes genótipos de milho cultivados ao longo de um transecto edafoclimático em Pernambuco, Brasil	35
RESUMO.....	36
ABSTRACT.....	37
3.1 INTRODUÇÃO	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.3 RESULTADOS.....	45
3.5 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS.....	54
4.CAPÍTULO 3: Composição qualitativa das comunidades de bactérias endofíticas de raiz e colmo do milho cultivado em região semiárida: influências do genótipo e das condições edafoclimáticas.....	59
RESUMO.....	60
ABSTRACT.....	61
4.1 INTRODUÇÃO	62
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	64
4.2.1 Caracterização dos locais e desenho experimental	64
4.2.2 Amostragem do material vegetal e esterilização superficial.....	66
4.2.3 Extração do DNA total das amostras	66
4.2.4 Preparação da biblioteca, amplificação e sequenciamento do DNA no Illumina MiSeq.....	66
4.2.5 Análise de Bioinformática de Sequências Metabarcodificadoras.....	68

4.2.6 Análise de Bioinformática	68
4.2.7 Análises Estatísticas	69
4.3 RESULTADOS	70
4.3.1 Diversidade de bactérias endofíticas em raízes e colmo de quatro genótipos de milho cultivados em Serra Talhada.....	70
4.3.2 Diversidade de bactérias endofíticas em raízes de dois genótipos de milho cultivados em diferentes condições edafoclimáticas	72
4.3.3 Abundância relativa de gêneros de bactérias endofíticas de maior presença em raízes e colmo de diferentes genótipos de milho cultivados em Serra Talhada	76
4.3.4 Abundância relativa de gêneros de bactérias endofíticas de maior presença em raízes de genótipos de milho cultivados em Araripina e Serra Talhada.....	78
4.3.5 Core da microbiota presente em genótipos de milho	79
4.3.6 Coocorrência de bactérias endofíticas presentes em genótipos de milho.....	82
4.3.7 Comparação das bactérias endofíticas presentes em diferentes compartimentos, genótipos e locais de cultivo de milho	87
4.4 DISCUSSÃO	93
4.5 CONCLUSÃO.....	97
REFERENCIAS	98
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	106

1 INTRODUÇÃO

O nitrogênio (N) é um macronutriente que faz parte de várias estruturas das plantas e, por isso, é um dos elementos mais limitantes para expressão do potencial de produção das culturas em grande parte dos agroecossistemas. A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é a principal forma de disponibilização do N atmosférico para as plantas e, por isso, é considerada o segundo processo mais importante da natureza, estando atrás somente da fotossíntese. Esse processo é realizado por micro-organismos (bactérias e arqueias) que apresentam genes que codificam a enzima nitrogenase, capaz de promover a quebra da tríplice ligação do N_2 atmosférico em condições de temperatura e pressão ambiente. O resultado desse processo são moléculas de amônia (NH_3), que podem ser utilizadas por outros organismos, como as plantas.

As bactérias fixadoras de nitrogênio, ou diazotróficas, podem ser classificadas de acordo com suas associações com as plantas. No caso de gramíneas, as bactérias diazotróficas são denominadas de associativas, pois necessitam de carboidratos da planta, necessários ao processo da FBN. Ao contrário do que ocorre na simbiose entre rizóbios e leguminosas, na associação entre bactérias e gramíneas não ocorre a formação de estruturas específicas para a realização das trocas. As bactérias diazotróficas endofíticas colonizam o interior de tecidos vegetais sem a formação de estruturas específicas e sem causar sintomas de doenças. Elas estão presentes em todas as partes da planta, como raiz, caule, folhas, frutos, sementes e até no grão de pólen, e podem promover diversos benefícios, além da FBN, como solubilização de fosfato, supressão de fitopatógenos, produção de substâncias promotoras do crescimento, dentre outros.

Gramíneas de sistema fotossintético C4 apresentam alta eficiência fotossintética e de utilização de água, resultando em alto potencial de produção de biomassa. Além da importância na alimentação humana e de animais, apresentam grande interesse para utilização como culturas energéticas e são matéria-prima para produção de etanol e outros biomateriais. Para a obtenção de altas produtividades, essas culturas apresentam demandas altas por N. Em sistemas de produção com maior utilização de insumos, o N é usualmente fornecido na forma de fertilizantes nitrogenados, produzidos a partir do processo de Harber-Bosh. Como bem relatado na literatura, a utilização intensiva de fertilizantes resulta em grandes impactos ambientais, pela emissão de gases causadores do efeito estufa durante a produção e por processos de perdas quando aplicados ao solo, que resultam, também, em baixa eficiência de utilização pelas plantas. Outro ponto relevante é que o custo elevado para a obtenção de insumos, limita a utilização de fertilizantes nitrogenados por pequenos produtores, ficando as culturas dependentes da mineralização da matéria orgânica do solo (MOS) ou do processo de FBN.

A possibilidade de produção de grande quantidade de biomassa com utilização mínima de fertilizantes nitrogenados, dependentes de energia fóssil para sua fabricação, realça a importância da FBN atmosférico em gramíneas tropicais, que apresentam associações com bactérias diazotróficas, que colonizam a superfície ou o interior dos seus tecidos.

Na literatura, são bastante relatados os efeitos benéficos da associação entre o milho com bactérias endofíticas, principalmente dos gêneros *Azospirillum* (ou *Nitrospirillum*), *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia*, tanto para o fornecimento de N por meio da FBN, quanto por outros efeitos benéficos, como solubilização de fosfato, supressão de fitopatógenos, aumento da tolerância a estresses abióticos, e produção de fitohormônios, dentre outros. Apesar desta vasta literatura, ainda não está estabelecido se, e em que extensão, as gramíneas se beneficiam do N fixado pelos diazotróficos endofíticos ou se os benefícios são devidos à produção de ácido indol-3-acético (AIA) e outras substâncias promotoras de crescimento que, comprovadamente, provocam alterações morfológicas na raiz (como o aumento das raízes laterais e dos pelos radiculares), aumentando a absorção de nutrientes.

É fato que as plantas se beneficiam de muitas funções de seus microbiomas específicos, que vão além da FBN. Além dos efeitos dos genótipos das plantas sobre seu microbioma, outros fatores bióticos e abióticos afetam diretamente a microbiota das plantas e a composição de qualquer órgão vegetal, tanto acima quanto abaixo do nível do solo.

Uma alternativa biotecnológica para aumentar a produtividade e aliviar estresses bióticos e abióticos em cultivos é a inoculação das plantas com Bactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (BPCP), capazes de promover efeitos positivos de crescimento na planta. No entanto, a microbiota naturalmente associada às plantas desempenha papel importante no estabelecimento de bactérias inoculadas. Assim, para o sucesso da inoculação é importante o estudo aprofundado da composição total e funcional do microbioma, de suas variações de acordo com fatores bióticos e abióticos e de suas respostas à diferentes práticas de manejo.

1.1 Hipóteses

A contribuição da fixação biológica de nitrogênio para a nutrição do milho é variável de acordo com o genótipo da planta e com as condições edafoclimáticas de cultivo.

As comunidades de bactérias endofíticas das raízes e colmos do milho são diferentes e afetadas pelo genótipo e pelas condições edafoclimáticas de cultivo.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Estimar a contribuição da FBN e a composição das comunidades de bactérias endofíticas naturalmente estabelecidas em tecidos de milho cultivado em diferentes condições edafoclimáticas e de manejo no estado de Pernambuco.

1.2.2 Objetivos específicos

Estimar, por meio da técnica da abundância natural do ^{15}N , o efeito de diferentes condições edafoclimáticas e de cultivo sobre a contribuição da FBN para diferentes genótipos de milho identificados como os mais produtivos para as condições do Nordeste do Brasil.

Estimar variações qualitativas (diversidade, classificação de unidades taxonômicas operacionais e identificação de gêneros de maior ocorrência) do bacterioma endofítico de raiz e colmo entre diferentes genótipos e condições edafoclimáticas do cultivo de milho na região semiárida do Brasil, por meio de análise metagenômica do gene 16S rRNA.

2 CAPÍTULO 1: Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e a inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) em gramíneas

O nitrogênio (N) é o elemento mais abundante da atmosfera, no entanto, está em uma forma indisponível para a maioria dos organismos. É o quarto elemento mais abundante nas plantas, ficando atrás somente do carbono (C), hidrogênio (H) e oxigênio (O). É componente essencial na constituição de aminoácidos, proteínas (representando 18% do peso), bases nitrogenadas, ácidos nucleicos, hormônios e clorofilas, entre outros (SANTOS et al., 2008). No solo, ele está ligado principalmente à matéria orgânica (MO), ficando a sua liberação condicionada aos processos de decomposição (FREITAS et al., 2015b). Assim, somente uma pequena fração está disponível nas formas iônicas de amônio (NH_4^+) e nitrato (NO_3^-), que são normalmente absorvidas pelas plantas.

O nitrogênio atmosférico (N_2) inerte pode ser disponibilizado em formas assimiláveis pela maioria dos organismos através de três processos; a fixação espontânea, a fixação industrial e a fixação biológica de nitrogênio (FBN). A fixação espontânea é realizada por descargas elétricas, que liberam grande quantidade de energia, suficiente para quebrar a tríplice ligação da molécula de N_2 . A fixação industrial se dá pelo processo conhecido como Haber-Bosch, no qual o N_2 e o H_2 gasosos reagem, na presença de um catalisador à base de ferro (Fe), tendo como produto final a amônia (KYRIAKOU et al., 2019). Para esse processo, é necessária grande quantidade de energia (27,2 GJ) e pressão (10-15 MPa), que são alcançadas com a queima de combustíveis fósseis, o que caracteriza um processo extremamente poluente, liberando cerca de 1,6% do total das emissões globais de CO_2 (LIU, 2014; KYRIAKOU et al., 2019). No entanto, atualmente, é graças a esse processo que a agricultura consegue o N necessário para manter altas produtividades de alimentos, capazes de atender à demanda da população mundial.

A FBN é um processo natural realizado por organismos (bactérias e arqueias) que apresentam na sua estrutura a enzima nitrogenase, capaz de promover a quebra da tríplice ligação ente os átomos de N_2 da atmosfera em condições de temperatura e pressão ambiente, utilizando como fonte de energia a adenosina trifosfato (ATP) proveniente de processos foto e quimiossintéticos, ou obtidos a partir de carboidratos (provenientes da fermentação ou respiração) (SANTOS et al., 2008). O produto desse processo é NH_3 , uma forma de N assimilável pelas plantas. A FBN é uma fonte não poluente de N, melhorando a produção agrícola e reduzindo o uso de fertilizantes químicos. Grande parte do N presente nos

ecossistemas terrestres e aquáticos é oriunda desse processo, com a participação expressiva de comunidades diazotróficas atuando como principal entrada de N em ambientes naturais e agrícolas que não utilizam fertilizantes nitrogenados (FREITAS et al., 2015a).

Bactérias endofíticas são definidas como aquelas que habitam o interior de órgãos e tecidos de plantas sem causar danos, não expressando sinais externos ou estruturas visíveis, podendo estar presentes em raízes, caules, folhas, flores e frutos (RYAN et al., 2008; ASSUMPCÃO et al., 2009; COMPANT; CLÉMENT; SESSITSCH, 2010). Essas bactérias podem ser diazotróficas (capazes de realizar a FBN) e também podem promover o crescimento vegetal, pela produção de substâncias promotoras do crescimento (ex. ácido indol-3-acético), solubilizar fosfatos inorgânicos ou promover efeito antagônico contra fitopatógenos (MOREIRA et al., 2010; ANDRADE et al., 2014; ULLAH et al., 2017). As bactérias que promovem o crescimento de vegetais são conhecidas como bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP). Diversas espécies diazotróficas, principalmente dos gêneros *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* e *Burkholderia*, já foram identificadas colonizando o interior das raízes de sorgo (COELHO et al. 2009; LUNA et al. 2010), milho (MONTAÑEZ et al. 2009), e capim elefante (VIDEIRA et al. 2012), dentre outras gramíneas tropicais.

Bactérias pertencentes ao gênero *Azospirillum* (MOREIRA et al., 2010), já fazem parte da composição de inoculantes de milho bastante difundidos no Brasil, e atuam na FBN, no estímulo ao aumento da densidade e comprimento dos pelos absorventes das raízes, incrementos na velocidade de aparecimento de raízes laterais e do volume de superfície radicular, alteração da respiração das raízes e das atividades de enzimas da via glicolítica e do ciclo dos ácidos tricarbóxicos, produção de nitritos, aumento na absorção de nutrientes, além do aumento da produtividade (GLICK, 2012; FARIA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; ANDRADE et al., 2016; SANTOYO et al., 2016; PICAZEVICZ; KUSDRA; MORENO, 2017; WALITANG et al., 2017).

Galindo et al. (2019), ao avaliarem os efeitos da inoculação de *A. brasilense* em sementes de milho com diferentes doses e fontes de N, observaram o aumento no índice de clorofila foliar, diâmetro do caule, comprimento da espiga e eficiência de uso de nitrogênio, com reflexos positivos na produtividade de grãos, independente da fonte de N utilizada. Lana et al. (2012), ao avaliarem a resposta à inoculação com *A. brasilense* associada à adubação nitrogenada na cultura do milho, observaram que os tratamentos que foram inoculados com a bactéria sem adição de N proporcionaram incrementos na produtividade de 15,4 e 7,4%, em

dois ciclos consecutivos. Marini et al. (2015) também observaram incrementos no crescimento e na produtividade em dois genótipos de milho inoculados com *A. brasilense*.

Apesar de existir uma vasta literatura comprovando a ocorrência de bactérias endofíticas diazotróficas em gramíneas tropicais de sistema fotossintético C4 (COELHO et al., 2009; MONTAÑEZ et al., 2009; LUNA et al., 2010, VIDEIRA et al., 2012), ainda não está estabelecido se, e em que extensão, essas espécies se beneficiam do N fixado pela atividade desses micro-organismos ou se os benefícios são devidos à produção de ácido indol-3-acético (AIA) e outras substâncias promotoras de crescimento que, comprovadamente, provocam alterações morfológicas na raiz (como o aumento das raízes laterais e dos pelos radiculares), aumentando a absorção de nutrientes (VIDEIRA et al., 2012; BENEDUZI et al., 2013).

A microbiota na proximidade das raízes das plantas é fortemente influenciada pelos exsudados e estes, por sua vez, diferem em composição de acordo com a espécie, genótipo e idade da planta, assim como com o tipo e fertilidade do solo, além de estresses bióticos ou abióticos (SANTI et al., 2013). Em regiões áridas e semiáridas do Irã, Abadi et al. (2020) constataram que aproximadamente 32% das bactérias epifíticas isoladas da filosfera do milho foram identificados como diazotróficas, pela capacidade de crescer em meio Rennie e pela detecção de seu gene *nifH*, com predominância dos filos Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes.

Além da seleção e identificação de bactérias promissoras na promoção de crescimento de plantas, também estão sendo desenvolvidos diversos estudos de engenharia genética, com o intuito de aumentar a disponibilização de N através da FBN em plantas não-leguminosas. Uma delas é a alteração genética de plantas com a introdução de genes específicos, como o gene *Nif*, para as próprias plantas realizarem a FBN com a produção de enzimas do complexo da nitrogenase dentro de cloroplastos ou mitocôndrias (PANKIEVICZ et al., 2019; BLOCH et al., 2020; BOUJENNA; DEL MORAL, 2021), ou o gene *Nod*, para o desenvolvimento de nódulos (ambiente propício para a manutenção da nitrogenase) (PRIYADARSHINI et al., 2021). Uma outra via de estudos é a chamada “simbiose sintética”, que envolve a manipulação de ambos os parceiros (planta e bactéria) para trocar sinais apropriados entre eles e estabelecer uma colonização e FBN bem-sucedidas. Nessa abordagem, é realizada a alteração genética da planta para que ela produza uma fonte de carbono especializada que aumenta a competitividade de micro-organismos fixadores de nitrogênio recentemente introduzidos na rizosfera (MUS et al., 2016; ROSENBLUETH et al., 2018).

2.2 Produção de milho no Brasil e no Nordeste

O milho (*Zea mays* L.) é uma planta monocotiledônea pertencente à família Poaceae, com ciclo fotossintético C4. É o principal cereal produzido no Brasil e no mundo (USDA 2022). O grão é utilizado principalmente na alimentação humana e ração animal, e a biomassa da planta pode ser utilizada na produção de silagem, também destinada para alimentação animal, além de ser considerado uma cultura energética.

Segundo levantamento da CONAB (2021) a safra 2021/22 de milho no Brasil estava estimada em 117,18 milhões de toneladas, em uma área plantada de 20,9 milhões de hectares, com uma produtividade média estimada em 5.596 kg ha⁻¹. Na região nordeste do Brasil, a estimativa de produção de milho 2021/22 era de aproximadamente 8,7 milhões de t, em uma área de 2,8 milhões de ha e produtividade média de 3.027 kg ha⁻¹ (CONAB 2021). No Brasil, principalmente no Cerrado, o cultivo do milho é realizado em duas safras, sendo considerado como cultura no período de maior precipitação pluviométrica, e como “milho safrinha”, que entra no campo logo após a colheita da soja (CONAB, 2018), com a finalidade de aproveitar o N fixado pela leguminosa, além de deixar palhada para proteção do solo durante o período de estiagem.

O N é o macronutriente que mais limita a produção de milho (SILVA; SILVA; LABADI, 2013). A principal fonte desse elemento na agricultura moderna são os adubos minerais, que são produzidos através do processo Haber-Bosch, que resulta em alto custo de produção, além de liberação de gases causadores de agravamento do efeito estufa. Uma alternativa para a redução do consumo desses fertilizantes minerais e, conseqüentemente, a redução dos custos da produção agrícola e dos impactos ambientais, é o uso de bactérias capazes de realizar a FBN em associação com as plantas. Na cultura do milho diversas bactérias podem realizar essa associação e, a partir disso, promoverem a disponibilização de N, além de outros benefícios. No mercado brasileiro alguns inoculantes já estão disponíveis para os produtores, e a principal estirpe utilizada na sua composição é o *A. brasiliense*. Essa bactéria tem apresentado boas taxas de fornecimento de N, além da liberação de fitohormônios, que promovem maior desenvolvimento do sistema radicular, o que resulta em aumento de absorção de água e nutrientes (BOMFIM et al., 2020). A inoculação pode, ainda, conferir maior resistência a estresses como salinidade e seca, além de resultar em plantas mais vigorosas e produtivas (ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2018; WARRAD et al., 2020; KUSALE et al., 2021). Além disso, essas bactérias promovem a solubilização de fosfato, resultando em

economia na aquisição de fertilizantes fosfatados e proporcionando ganhos para o agricultor (HUNGRIA, 2011).

Szilagyi-Zecchun, Marriel e Silva (2017) verificaram que a produtividade do milho inoculado com *A. brasiliense* e 50% da dose recomendada de N igualou-se aos valores obtidos nos tratamentos que continham 100% da dose recomendada de N. Já Rockenbach et al. (2017), ao avaliarem um híbrido de milho com N mineral e outro com a inoculação de *A. brasiliense*, não verificaram diferença entre as produtividades dos tratamentos, demonstrando a variação entre genótipos e condições ambientais sobre as respostas à inoculação do milho.

2.3 Técnicas isotópicas para estudos do ciclo do N e da FBN

A origem do N absorvido pelas plantas pode ser determinada por meio do uso de técnicas isotópicas, seja por meio de marcação artificial ou por variações da abundância natural do ^{15}N . Na técnica da marcação artificial um isótopo é artificialmente enriquecido através de técnicas industriais, o que torna a técnica onerosa. Quando se utiliza a abundância natural do isótopo, técnica baseada no fracionamento (discriminação) que determinados isótopos sofrem conforme o elemento se move através dos diversos compartimentos de um ecossistema (MARTINELLI et al., 2009), os custos podem ser menores.

O N da atmosfera é tido como referência para estudos da dinâmica do N por não apresentar variação na sua composição (99,6337% de átomos de ^{14}N e 0,3663% de átomos de ^{15}N) (MARTINELLI et al., 2009). Devido às pequenas discriminações sofridas pelo isótopo mais pesado durante os processos que o N sofre no sistema solo-planta-atmosfera (mineralização, imobilização, nitrificação, desnitrificação, processos de perdas e FBN) é possível se observar pequenas variações nas concentrações dos isótopos, tornando o ^{15}N mais enriquecido no solo e nas plantas do que na atmosfera (SHEARER; KOHL; CHIEN, 1978; MARIOTTI et al., 1982).

As plantas que fazem uso do N originado da FBN tornam-se empobrecidas no átomo de ^{15}N , ao contrário das que fazem uso exclusivo do N disponível no solo (SCHULTZ et al., 2016). No solo, a maior parte dos processos que resultam na perda de N (nitrificação, volatilização de amônia e desnitrificação) discriminam o ^{15}N , o que resulta em maiores perdas de produtos enriquecidos em ^{14}N , levando ao enriquecimento do isótopo mais pesado no ecossistema (HANDLEY; SCRIMGEOUR, 1997).

Entre as gramíneas tropicais, as tentativas de comprovação da FBN através de técnicas isotópicas são mais abundantes para a cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), mas os resultados são variáveis, sugerindo forte influência de fatores ambientais e/ou do genótipo da planta. Por

exemplo, alguns trabalhos demonstram que algumas variedades cultivadas no Brasil (URQUIAGA et al., 2012; BAPTISTA et al., 2014) e no Uruguai (TAULÉ et al., 2011) podem obter quantidades consideráveis de N atmosférico, mas na cana-de-açúcar cultivada em outros locais, como na Austrália (BIGGS et al., 2002) e na África do Sul (HOEFSLOOT et al., 2005), não foram encontradas evidências de FBN. Para outras gramíneas, como milho (MONTAÑEZ et al., 2009) e capim elefante (MORAIS et al., 2012) os relatos são escassos. Recentemente alguns artigos foram publicados demonstrando FBN em sorgo (FERREIRA NETO et al., 2017; de CARVALHO et al., 2017; SANTOS et al., 2017; BARROS et al. 2020.). Para esta gramínea, aparentemente, o desempenho de diferentes genótipos é fortemente influenciado pelas condições abióticas (BARROS et al., 2020). Utilizando a técnica da abundância natural, de Carvalho et al. (2017), avaliaram a contribuição da FBN em gramíneas C4, verificando uma contribuição de 12,8 a 19,4% para a cana-de-açúcar, 22,4% para o milho, 20,9% para o capim-guiné (*Panicum maximum* Jacq) e 31,2% para o sorgo. Vale ressaltar que, uma limitação na utilização dessa técnica em gramíneas é seleção de uma planta referência considerada não fixadora (necessária para a estimativa da FBN), que deve apresentar características de crescimento e anatomia semelhantes à da planta de interesse.

Alves et al. (2014) constataram que diferentes genótipos de milho híbrido (SHS5050 e BRS4157), quando inoculados com a estirpe *Herbaspirillum seropedicae* ZAE94 e sob as mesmas condições de manejo, apresentam proporções diferente de N derivado da atmosfera (%N_{da}). Nesse estudo, foram utilizados como plantas referências os mesmos híbridos de milho, no entanto, sem a inoculação prévia de uma estirpe selecionada, podendo os mesmos serem colonizados por bactérias nativas do solo. Diante disso, é possível inferir que as contribuições para esses híbridos são maiores que o mostrado nesse estudo, pois os híbridos não inoculados podem ter se beneficiado da FBN através das bactérias nativas.

No trabalho desenvolvido por Ke et al. (2019), ao avaliarem o efeito da inoculação da bactéria *Pseudomonas stutzeri* A1501 em plantas de milho sob dois regimes hídricos (com e sem irrigação) verificaram através da técnica da abundância natural de ¹⁵N que, aproximadamente 27,8% do N era advindo da FBN nas plantas conduzidas sob a condição de irrigação, e 17,5% para aquelas plantas não irrigadas. Já no trabalho de Barros et al. (2020), onde avaliaram as contribuições da FBN em diferentes genótipos de sorgo sem inoculação prévia através da técnica da abundância natural do ¹⁵N, houve contribuições significativas para os diferentes genótipos, chegando a mais de 70% de N decorrente desse processo em alguns genótipos.

2.4 A análise metagenômica em estudos de comunidade microbianas

No passado, a classificação de bactérias era comumente realizada a partir de características morfológicas distintas (hábitos de crescimento, coloração, formação ou não de muco, dentre outros), por meio do cultivo em meios de culturas específicos e isolamento de diferentes colônias, estabelecendo-se uma identificação fenotípica dos micro-organismos. Essas técnicas são relativamente baratas, com resultados úteis em uma primeira triagem de isolados, além de propiciarem a obtenção de isolados com potencial biotecnológico. No entanto, apresenta algumas limitações, como definir qual o meio de cultura ideal em que cada micro-organismo cresce, o tempo que se leva para o crescimento das culturas, além do fato de que a maioria dos micro-organismos não poder ser cultivada em laboratório.

Por definição, metagenômica é a análise genética direta de genomas contidos em uma amostra ambiental (HANDELSMAN et al., 1998). Tal metodologia tem se desenvolvido bastante com o surgimento de novas tecnologias de sequenciamento, chamados de “nova geração”, em que é possível produzir um alto número de informações com baixa taxa de erro. Essas tecnologias permitem análise direta do DNA metagenômico, sem a necessidade de amplificar o DNA total e clonar em vetores, diminuindo as taxas de erros (OULAS et al., 2015). Com esses sequenciamentos em larga escala, é possível determinar a prospecção de genes e as suas funções, e podem ser baseados em duas abordagens: construção de biblioteca metagenômica e sequenciamento direto do DNA metagenômico (WILSON; PIEL, 2013).

Na construção de bibliotecas metagenômicas, é necessário fazer o isolamento do DNA metagenômico (necessário ser de alta qualidade) (GURGUI; PIEL, 2010; OUYANG et al., 2010), e também pode ser feito o enriquecimento das células alvo (IKEDA et al., 2009) e a construção de vetores e clonagem em organismos modelo (como por exemplo *Escherichia coli*) (WILSON; PIEL, 2013). Com a biblioteca construída, é feita a triagem das funções por meio de *screening* funcional (ensaios bioquímicos/enzimáticos *in vitro*) (REYES-DUARTE; FERRER; GARCÍA-ARELLANO, 2012) ou por meio de homologia (PCR, por exemplo) (WILSON; PIEL, 2013).

O sequenciamento direto do DNA metagenômico baseia-se na análise das sequências por meio da bioinformática (THOMAS; GILBERT; MEYER, 2012), ou seja, após a extração de DNA metagenômico, este é sequenciado em larga escala seguido de montagem das sequências (KUNIN et al., 2008) e anotação/predicação dos genes comparando-os com bancos de dados (MEYER et al., 2008). É recomendado que se restrinja o máximo possível a extração ao DNA das células de interesse, ou seja, o passo de enriquecimento celular é aconselhável antes da extração e sequenciamento das moléculas de DNA (WILSON; PIEL, 2013).

Liu et al. (2017), ao avaliarem 10 cepas de diazotróficos endofíticos isolados e identificados a partir de plantas de trigo, arroz e milho, verificaram através do ensaio *nifH*-PCR que esses diazotróficos apresentavam capacidade positiva para a fixação de nitrogênio, e usando a técnica de análise de sequenciamento do rRNA 16S, foi possível atribuir as 10 cepas pertencentes a grupos conhecidos de bactérias fixadoras de nitrogênio, incluindo organismos dos gêneros *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pantoea*. Alibrandi et al. (2020), ao investigarem a microbiota bacteriana endofítica em três espécies de orquídeas mediterrâneas (*Neottia ovata*, *Serapias vomeracea* e *Spiranthes spiralis*) em diferentes compartimentos (raízes, caules, folhas e cápsulas), por metabarcoding do gene 16S rRNA, obtiveram 1.930 unidades taxonômicas operacionais (UTOs), sendo compostas principalmente Proteobactérias e Actinobactérias, cujo modelo de distribuição indicou que o órgão vegetal foi o principal determinante da estrutura da comunidade bacteriana daquelas espécies, sendo observado uma redução da riqueza e diversidade de espécies microbianas na parte aérea, indicando que a comunidade bacteriana se adaptou para colonizar os órgãos das orquídeas de forma seletiva e sistêmica.

No trabalho desenvolvido por Tian e Zhang (2017), onde avaliaram a diversidade e a estrutura da comunidade de endófitos na halófita *Messerschmidia sibirical* em diferentes compartimentos da planta (raiz, caule e folha) a partir do sequenciamento da região V5–V7 do gene 16S rRNA bacteriano e usando a plataforma Illumina HiSeq, verificaram que a maior riqueza e diversidade bacteriana estava presente na raiz quando comparada aos demais compartimentos. Além disso, os autores observaram através da análise da diversidade microbiana a predominância dos filos Proteobacteria e Actinobacteria, sendo os principais gêneros classificados como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Rhizobium* e *Nocardioideseram*, sendo observado diferenças claras na diversidade e estrutura da comunidade entre os diferentes compartimentos avaliados.

Dessa forma, fica evidenciada a importância da FBN no processo na disponibilização de nitrogênio para ambientes naturais e agrícolas, especialmente para plantas de milho, no entanto, ainda são necessários mais estudos para se definir as proporções dessa contribuição. Para isso, é necessário compreender a estrutura da comunidade de bactérias endofíticas presentes nos diferentes compartimentos dentro da planta, além de definir as contribuições no fornecimento de N resultante dessa relação planta/endófito.

REFERÊNCIAS

- ABADI, V. A. J.; SEPEHRI, M.; RAHMANIN, H. A.; DOLATABAD, H. K.; SHAMSHIRIPOUR, M.; KHATABI, B. Diversity and abundance of culturable nitrogen-fixing bacteria in the phyllosphere of maize. **Journal of Applied Microbiology**. 2020. <https://doi.org/10.1111/jam.14975>
- ABEDINZADEH, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 21, e00305, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00305>
- ALIBRANDI, P.; SCHNELL, S.; PEROTTO, S.; CARDINALE, M. Diversity and Structure of the Endophytic Bacterial Communities Associated With Three Terrestrial Orchid Species as Revealed by 16S rRNA Gene Metabarcoding. **Frontiers in Microbiology**, n. 11, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.604964>
- ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, n. 387, p. 307–321, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2295-2>
- ANDRADE, A. T.; CONDÉ, A. B. T.; COSTA, R. L.; POMELA, A. W. V.; SOARES, A. L.; MARTINS, F. A. D.; LIMA, W. T.; OLIVEIRA, C. B. Produtividade de milho em função da redução do nitrogênio e da utilização de *Azospirillum brasilense*. **Brazilian Journal of Maize and Sorghum**, n. 15, p. 229-239, 2016. <https://doi.org/10.18512/1980-6477/rbms.v15n2p229-239>
- ANDRADE, L. F.; SOUZA, G. L. O. D.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; CARDOSO, A. M. S.; PEREIRA, M. C. T.; PEREIRA, D. F. G. S. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 27–34, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3019-2>
- ASSUMPÇÃO, L. C.; LACAVALA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.
- BAPTISTA, R. B.; MORAIS, R. F.; LEITE, J. M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Variations in the ¹⁵N natural abundance of plant-available N with soil depth: their influence on estimates of contributions of biological N₂ fixation to sugar cane. **Applied Soil Ecology**. v. 73, p. 124-129, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.08.008>
- BARROS, B. G. F.; FREITAS, A. D. S.; TABOSA, J. N.; LYRA, M. C. C. P.; MERGULHÃO, A. C. E. S.; SILVA, A. F.; OLIVEIRA, W. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; SAMPAIO, E. V. S. B. Biological nitrogen fixation in field-grown sorghum under different edaphoclimatic conditions is confirmed by N isotopic signatures. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, n. 117, p. 93–101, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10705-020-10051-3>

BENEDUZI, A.; MOREIRA, F.; COSTA, P. B.; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; FAVRETO, R.; BALDANI, J. I.; PASSAGLIA, L. M. P. Diversity and plant growth promoting evaluation abilities of bacteria isolated from sugarcane cultivated in the South of Brazil. **Applied Soil Ecology**, v. 63, p. 94-104, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2012.08.010>

BIGGS, I. M.; STEWART, G. R.; WILSON, J. R.; CRITCHLEY, C. ^{15}N natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. **Plant Soil**, v. 238, p. 21-30, 2002.

BLOCH, S. E.; RYU, M. H.; OZAYDIN, B.; BROGLIE, R. Harnessing atmospheric nitrogen for cereal crop production. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 62, p. 181–188, 2020.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.09.024>

BOMFIM, C. S. G.; DA SILVA, V. B.; CURSINO, L. H. S.; MATTOS, W. S.; SANTOS, J. C. S.; SOUZA, L. S. B.; DANTAS, B. F.; FREITAS, A. D. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Endophytic bacteria naturally inhabiting commercial maize seeds occupy different niches and are efficient plant growth-promoting agents. **Symbiosis**, n. 81(3), p. 255–269, 2020.

<https://doi.org/10.1007/s13199-020-00701-z>

BOUJENNA, A.; MORAL, L. F. G. Biotechnological approaches to develop nitrogen-fixing cereals: A review. **Spanish Journal of Agricultural Research**, n. 19(4), e08R01, 2021.

<https://doi.org/10.5424/sjar/2021194-18346>

COELHO, M. R. R.; MARRIEL, I. E.; JENKINS, S. N.; LANYON, C. V.; SELDIN, L.; O'DONNELL, A. G. Molecular detection and quantification of *nifH* gene sequences in the rhizosphere of sorghum (*Sorghum bicolor*) sown with two levels of nitrogen fertilizer.

Applied Soil Ecology, v. 42, p. 48-53, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.01.010>

COMPANT, S.; CLÉMENT, 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, p. 669-678, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.11.024>

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, Brasília, DF, v. 9, safra 2021/221, n. 3, terceiro levantamento, dezembro. 2021.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. Décimo segundo levantamento, Safra 2017/18, v. 12, p. 1-148, Brasília, 2018.

De CARVALHO, E. X.; MENEZES, R. S. C.; FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SIMÕES NETO, D. E.; TABOSA, J. N.; PRIMO, D. C.; QUEIROZ, R. O. The ^{15}N natural abundance technique to assess the potential of biological nitrogen fixation (BNF) in some important C4 grasses. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, p. 1559-1564, 2017.

<https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.12.pne729>

FARIA, D. C.; DIAS, A. C.; MELO, I. S.; COSTA, F. E. C. Bactérias endofíticas isoladas de orquídeas e seu potencial para promover o crescimento das plantas. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 29 (2), p. 217-221, 2013.

<https://doi.org/10.1007/s11274-012-1173-4>

FERREIRA NETO, R. A.; FREITAS, A. D. S.; GIONGO, V.; CAMARGO, P. B.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B. *Poaceae* and *Leguminosae* fixation in a green manure experiment in the Brazilian semiarid region. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, p. 1559-1564, 2017. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.12.pne729>

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. S.; SILVA, A. F.; CARVALHO, R. Fixação biológica de nitrogênio no Semiárido Brasileiro. **Revista Brasileira de Geografia e Física**, v. 8, p. 585-597, 2015 (a). <https://doi.org/10.26848/rbgf.v8.0.p585-597>

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; RAMOS, A. P. S.; BARBOSA, M. R. V.; LYRA, R. P.; ARAÚJO, E. L. Nitrogen isotopic patterns in tropical forests along a rain fall gradient in Northeast Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 391, p. 109–122, 2015 (b). <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2417-5>

GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; BUZETTI, S.; PAGLIARI, P. H.; SANTINI, J. M. K.; ALVES, C. J.; MEGDA, M.M.; NOGUEIRA, T.A.R.; ANDREOTTI, M.; ARF, O. Maize Yield Response to Nitrogen Rates and Sources Associated with *Azospirillum brasilense*. **Agronomy Journal**, v. 111, p. 1985-1995, 2019. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.07.0481>

GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. **Scientifica**, v. 2012, p. 1-15, 2012. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>

GURGUI, C.; PIEL, J. Metagenomic approaches to identify and isolate bioactive natural products from microbiota of marine sponges. **Methods in molecular biology** (Clifton, NJ), v. 668, p. 247–64, 2010. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-823-2_17

HANDELSMAN, J.; RONDON, M. R.; BRADY, S. F.; CLARDY, J.; GOODMAN, R. M. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. **Chemistry & Biology**, v. 5, n. 10, p. R245–R249, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)

HANDLEY, L. L.; SCRIMGEOUR, C. M. Terrestrial plant ecology and ¹⁵N natural abundance: the present limits to interpretation for uncultivated systems with original data from a Scottish old field. **Advances in Ecological Research**, San Diego, v. 27, p.133-212, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60008-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60008-2)

HOEFSLOOT, G.; TERMORSHUIZEN, A. J.; WATT, D. A.; CRAMER, M. D. Biological nitrogen fixation is not a major contributor to the nitrogen demand of a commercially grown South African sugarcane cultivar. **Plant Soil**, v. 277, p. 85-96, 2005. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-2581-0>

HUNGRIA, M. **Inoculação com *Azospirillum brasilense*: inovação em rendimento a baixo custo**. Londrina: Embrapa Soja, p. 36, 2011.

IKEDA, S.; KANEKO, T.; OKUBO, T.; RALLOS, L. E. E.; EDA, S.; MITSUI, H.; SATO, S.; NAKAMURA, Y.; TABATA, S.; MINAMISAWA, K. Development of a Bacterial Cell Enrichment Method and its Application to the Community Analysis in Soybean Stems. **Microbial Ecology**, v. 58, n. 4, p. 703–714, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9566-0>

KE, X.; FENG, S.; WANG, J.; LU, W.; ZHANG, W.; CHEN, M.; LIN, M. Effect of Inoculation with Nitrogen-fixing Bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 on Maize Plant Growth and the Microbiome Indigenous to the Rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.10.010>

KUNIN, V.; COPELAND, A.; LAPIDUS, A.; MAVROMATIS, K.; HUGENHOLTZ, P. A bioinformatician's guide to metagenomics. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 72, n. 4, p. 557–78, 2008. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00009-08>

KUSALE, S. P.; ATTAR, Y. C.; SAYYED, R. Z.; EI ENSHASY, H.; HANAPI, S. Z.; ILYAS, N.; ELGORBAN, A. M.; BAHKALI, A. H.; MARRAIKI, N. Inoculation of *Klebsiella variicola* Alleviated Salt Stress and Improved Growth and Nutrients in Wheat and Maize. **Agronomy**, v. 11, p. 927, 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050927>

KYRIAKOU, V.; GARAGOUNIS, I.; VOURROS, A.; VASILEIOU, E.; STOUKIDES, M. An Electrochemical Haber-Bosch Process. **Joule**, v. 4, p. 1-17, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.joule.2019.10.006>

LANA, M. C.; DARTORA, J.; MARINI, D.; HANN, J. E. H. Inoculação com *Azospirillum*, associado à adubação nitrogenada em milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 59, p. 399-405, 2012.

LIU, H. Ammonia synthesis catalyst 100 years: Practice, enlightenment and challenge. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35(10), p. 1619–1640, 2014. [https://doi.org/10.1016/s1872-2067\(14\)60118-2](https://doi.org/10.1016/s1872-2067(14)60118-2)

LIU, H.; ZHANG, L.; MENG, A.; ZHANG, J.; XIE, M.; QIN, Y.; FAULK, D. C.; ZHANG, B.; YANG, S.; QIU, L. Isolation and molecular identification of endophytic diazotrophs from seeds and stems of three cereal crops. **PLOS ONE**, v. 12(10), e0187383, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187383>

LUNA, M. F.; GALAR, M. L.; APREA, J.; MOLINARI, M. L.; BOIARDI, J. L. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Biotechnology Letters**, v. 32, p. 1071-1076, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0256-2>

MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; DARTORA, J.; LANA, M. C.; PINTO JÚNIOR, A. S. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, v. 62, n. 1, p. 117-123, 2015. <https://doi.org/10.1590/0034-737X201562010015>

MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; CHAMPIGNY, M. L.; AMARGER, N.; MOYSE, A. Nitrogen isotope fractionation associated with nitrate reductase activity and uptake of NO₃⁻ by pearl millet. **Plant Physiology**, v. 69, p. 880-884. 1982. <https://doi.org/10.1104/pp.69.4.880>

MARTINELLI, L.; OMETTO, J. P.; FERRAZ, E.; VICTORIA, R.; CAMARGO, P. B.; MOREIRA, M. **Desvendando questões ambientais com isótopos estáveis**. São Paulo: Oficina de Textos, p.144, 2009.

MONTAÑEZ, A.; ABREU, C.; GILL, P. R.; HARDARSON, G.; SICARDI, M. Biological nitrogen fixation in maize (*Zea mays* L.) by ^{15}N isotope-dilution and identification of associated culturable diazotrophs. **Biology and fertility of soils**, v. 45(3), p. 253-263, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00374-008-0322-2>

MORAIS, R. F.; QUESADA, D. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribution of biological nitrogen fixation to elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant Soil**, v. 356, p. 23-34, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0944-2>

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

MUS, F.; CROOK, M. B.; GARCIA, K.; GARCIA COSTAS, A.; GEDDES, B. A.; KOURI, E. D.; PARAMASIVAN, P.; RYU, M.; OLDROYD, G. E. D.; POOLE, P. S.; UDVARDI, M. K.; VOIGT, C. A.; ANÉ, J.; PETERS, J. W. Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82(13), p. 3698–3710, 2016. <https://doi.org/10.1128/aem.01055-16>

OULAS, A.; PAVLOUDI, C.; POLYMENAKOU, P.; PAVLOPOULOS, G. A.; PAPANIKOLAOU, N.; KOTOULAS, G.; ARVANITIDIS, C.; ILIOPOULOS, I. Metagenomics: Tools and insights for analyzing next-generation sequencing data derived from biodiversity studies. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 9, p. 75–88, 2015. <https://doi.org/10.4137/BBI.S12462>

OUYANG, Y.; DAI, S.; XIE, L.; KUMAR, M. S. R.; SUN, W.; SUN, H.; TANG, D.; LI, X. Isolation of high molecular weight DNA from marine sponge bacteria for BAC library construction. **Marine Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 318–325, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10126-009-9223-0>

PANKIEVICZ, V. N. C. S.; IRVING, T. B.; MAIA, L. G. S.; ANÉ, J.-M. Are we there yet? The long walk towards the development of efficient symbiotic associations between nitrogen-fixing bacteria and non-leguminous crops. **BMC Biology**, v. 17(1), 2019. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0710-0>

PICAZEVICZ, A. A. C.; KUSDRA, J. F.; MORENO, A. L. Maize growth in response to *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, molybdenum and nitrogen. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 21, n. 9, p. 623-627, 2017. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v21n9p623-627>

PRIYADARSHINI, P.; CHOUDHURY, S.; TILGAM, J.; BHARATI, A.; SREESHMA, N. Nitrogen fixing cereal: A rising hero towards meeting food security. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 167, p. 912–920, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.09.012>

REYES-DUARTE, D.; FERRER, M.; GARCÍA-ARELLANO, H. Functional-based screening methods for lipases, esterases, and phospholipases in metagenomic libraries. **Methods in Molecular Biology**, v. 861, p. 101–113, 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_6

ROCKENBACH, M. D. A.; ALVAREZ, J. W. R.; FOIS, D. A. F.; TIECHER, T.; KARAJALHO, J. C.; TRINIDAD, S. A. Eficiência da aplicação de *Azospirillum brasilense* associado ao nitrogênio na cultura do milho. **Acta Iguazu**, v. 6, n. 1, p. 33-44, 2017.

ROSENBLUETH, M.; ORMEÑO-ORRILLO, E.; LÓPEZ-LÓPEZ, A.; ROGEL, M. A.; REYES-HERNÁNDEZ, B. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, J. C.; REDDY, P. M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Nitrogen Fixation in Cereals. **Frontiers in Microbiology**. v. 9: n. 1794, p. 1-13, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01794>

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. Bacterial endophytes: recent developments and applications. **FEMS Microbiology Letters**, v. 278, p. 1-9, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00918.x>

SANTI, C.; BOGUSZ, D.; FRANCHE, C. Biological nitrogen fixation in non-legume plants. **Annals of Botany**, v. 111(5), p. 743-767, 2013. <https://doi.org/10.1093/aob/mct048>

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; CALAÇO, W. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M.V.B.; BURITY, H.A.; STAMFORD, N. P.; SANTOS, C. E. R. S. **Microrganismos e agrobiodiversidade: o novo desafio para a agricultura**. Guaíba: Agrolivros, p. 568, 2008.

SANTOS, C. L. R.; ALVES, G. C.; MACEDO, A. V. M.; GIORI, F. G.; PEREIRA, W.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. And *Herbaspirillum* ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 96-106, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.02.008>

SANTOYO, G.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OROZCO-MOSQUEDA, M. D. C.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacterial endophytes. **Microbiological Research**, v. 183, p. 92-99, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2015.11.008>

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. S. Produtividade e diluição isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51(9), p. 1594-1601, 2016. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2016000900059>

SHEARER, G.; KOHL, D. H.; CHIEN, S. H. The nitrogen-15 abundance in a wide variety of soils. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 42, p. 899-905, 1978. <https://doi.org/10.2136/sssaj1978.03615995004200060013x>

SILVA, F. C.; SILVA, M. M.; LIBADI, P. L. Aplicação de nitrogênio no cultivo de milho, sob sistema plantio direto: efeitos na qualidade física do solo e características agrônômicas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 3513-3528, 2013. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl1p3513>

SZILAGYI-ZECCHIN, V. J.; MARRIEL, I. E.; SILVA, P. R. F. Produtividade de milho inoculado com *Azospirillum brasilense* em diferentes doses de nitrogênio cultivado em campo no Brasil. **Revista de Ciências Agrárias**, Lisboa, v. 40(4), p. 795-798, 2017. <https://doi.org/10.19084/RCA17142>

- TAULÉ, C.; MAREQUES, C.; BARLOCCO, C.; HACKEMBRUCH, F.; REIS, V. M.; SICARDI, M.; BATTISTONI, F. The contribution of nitrogen fixation to sugarcane (*Saccharum officinarum* L.), and the identification and characterization of part of the associated diazotrophic bacterial community. **Plant Soil**, v. 356, p. 35-49, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1023-4>
- THOMAS, T.; GILBERT, J.; MEYER, F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. **Microbial Informatics and Experimentation**, v. 2, n. 1, p. 3, 2012. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- TIAN, X. Y.; ZHANG, C. S. Illumina-Based Analysis of Endophytic and Rhizosphere Bacterial Diversity of the Coastal Halophyte *Messerschmidia sibirica*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02288>
- ULLAH, A.; MUSHTAQ, H.; FAHAD, S. H.; HAKIM; SHAH, A.; CHAUDHARY, H. J. Plant growth promoting potential of bacterial endophytes in novel association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. **Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 119–127, 2017. <https://doi.org/10.1134/S0026261717010155>
- URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data of the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, p. 5-21, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3>
- USDA – United States Department of Agriculture. **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. WASDE-621, 2022.
- VIDEIRA, S. S.; OLIVEIRA, D. M.; MORAIS, R. F.; BORGES, W. L.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. Genetic diversity and plant growth promoting traits of diazotrophic bacteria isolated from two *Pennisetum purpureum* Schum. genotypes grown in the field. **Plant Soil**, v. 356, p. 51-66, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1082-6>
- WALITANG, D. I.; KIM, K.; MADHAIYAN, M.; KIM, Y. K.; KANG, Y.; SA, T. Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of rice. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 209, p. 1-13, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1117-0>
- WARRAD, M.; HASSAN, Y. M.; MOHAMED, M. S. M.; HAGAGY, N.; Al-MAGHRABI, O. A.; SELIM, S.; SALEH, A. M.; ABDELGAWAD, H. A Bioactive Fraction from *Streptomyces* sp. Enhances Maize Tolerance against Drought Stress. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30(8), p. 1156–1168, 2020. <https://doi.org/10.4014/jmb.2003.03034>
- WILSON, M. C.; PIEL, J. Metagenomic approaches for exploiting uncultivated bacteria as a resource for novel biosynthetic enzymology. **Chemistry and Biology**, v. 20, n. 5, p. 636–647, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.04.011>

3 Capítulo 2: Estimativa da contribuição do N atmosférico para a nutrição de diferentes genótipos de milho cultivados ao longo de um transecto edafoclimático em Pernambuco, Brasil

Estimativa da contribuição do N atmosférico para a nutrição de diferentes genótipos de milho cultivados ao longo de um transecto edafoclimático em Pernambuco, Brasil

RESUMO

A associação entre o milho e bactérias diazotróficas endofíticas ou rizoféricas é bem relatada na literatura. Entretanto, estimativas da contribuição do N atmosférico para a nutrição das plantas ainda são escassas. O objetivo deste trabalho foi estimar a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em genótipos de milho considerados como os mais produtivos em programas oficiais de melhoramento. Foram instalados três experimentos em municípios localizados ao longo de um transecto edafoclimático em Pernambuco, nos quais 10 genótipos de milho foram cultivados em blocos ao acaso, com 4 repetições. Em nenhum dos experimentos as sementes de milho foram previamente inoculadas com bactérias e a FBN foi promovida por comunidades bacterianas de ocorrência espontânea nas plantas. Dois experimentos foram instalados no Semiárido (Araripina e Serra Talhada), testando os mesmos 10 genótipos (BRS 4107, BRS 5026, BRS 4105, POTIGUAR, COPACABANA, BR 5036, BR 5037, MUCURIBE, IPR 164 e BR 2121 QPM) e sob condição de sequeiro. O outro experimento foi instalado na Zona da Mata (Vitória de Santo Antão), testando outros 10 genótipos (1L1411, 1P2224, DKB 390 PRO 2, 1F640, DKB 310 PRO 2, CMS 36, SÃO JOÃO, BRS 3042, 1P2227 e 1M1804) e sob irrigação. Em ambas as localidades, também foram amostradas folhas de feijão-caupi e sorgo, espécies com comprovada capacidade de FBN, cultivados nas proximidades dos experimentos, para estimativa do sinal isotópico de uma planta fixadora. A FBN foi estimada usando o método de abundância natural de ^{15}N , comparando o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ de cada genótipo de milho com o valor da composição isotópica do N do solo disponível para as plantas, estimado por espécies de referência coletadas no campo ou cultivadas em amostras de solo. Para cada genótipo de milho foi calculada a porcentagem de nitrogênio derivado da atmosfera (%Ndda). Em Araripina, as %Ndda dos genótipos foram acima de 30%, com destaque para os genótipos BR 5036 (57%) e BRS 4105 (53%). Nessa mesma localidade, o feijão teve menor %Ndda (28%) que os genótipos de milho e o sorgo (39%). Mesmo sendo cultivados os mesmos genótipos que em Araripina, não foi observada contribuição da FBN em Serra Talhada, provavelmente porque as plantas sofreram forte estresse hídrico durante o período da condução do experimento. Já em Vitória, todos os genótipos tiveram contribuições no fornecimento de N de mais de 57%, acima da %Ndda do feijão (55%) e do sorgo (48%), com destaque para os genótipos DKB 310 PRO2, 1F640 e 1P2227 (88%, 84% e 81%, respectivamente). Portanto, foram obtidos relevantes contribuições no fornecimento de N pela associação de plantas de milho com bactérias endofíticas naturalmente estabelecidas, exceto onde houve deficiência hídrica nas plantas.

Palavras-chave: *Zea mays*. Melhoramento vegetal. Isótopo ^{15}N .

Estimation of the contribution of atmospheric N to the nutrition of different maize genotypes cultivated along an edaphoclimatic transect in Pernambuco, Brazil

ABSTRACT

The association between maize and endophytic or rhizospheric diazotrophic bacteria is well reported in the literature. However, estimates of the contribution of atmospheric N to plant nutrition are still scarce. The objective of this work was to estimate biological nitrogen fixation (BNF) in maize genotypes which are considered as the most productive in official breeding programs. Three experiments were carried out in municipalities located along an edaphoclimatic transect in Pernambuco state, in which 10 maize genotypes were cultivated in randomized blocks, with 4 replications. In none of the experiments the maize seeds were previously inoculated with bacteria and the BNF was promoted by bacterial communities of spontaneous occurrence. Two experiments were installed in the semiarid region (Araripina and Serra Talhada municipalities), testing the same 10 genotypes (BRS 4107, BRS 5026, BRS 4105, POTIGUAR, COPACABANA, BR 5036, BR 5037, MUCURIBE, IPR 164 and BR 2121 QPM) and under rainfed conditions. The other experiment was carried out in the Zona da Mata (Vitória de Santo Antão municipality), testing another 10 different maize genotypes (1L1411, 1P2224, DKB 390 PRO 2, 1F640, DKB 310 PRO 2, CMS 36, SÃO JOÃO, BRS 3042, 1P2227 and 1M1804) and under irrigation. In both locations, cowpea and sorghum leaves were also sampled, species with proven FBN capacity, cultivated in the vicinity of the experiments, to estimate the isotopic signal of a fixative plant. BNF was estimated using the ^{15}N natural abundance method, comparing the mean value of $\delta^{15}\text{N}$ of each maize genotype with the value of the isotopic composition of soil N available to the plants, estimated by reference species collected in the field or cultivated in soil samples. For each corn genotype, the percentage of nitrogen derived from the atmosphere (%N_{dda}) was calculated. In Araripina, the genotypes had %N_{dda} above 30%, with emphasis to genotypes BR 5036 (57%) and BRS 4105 (53%). In the same location, beans had lower %N_{dda} (27.85%) than the maize and sorghum genotypes (39%). Despite the genotypes being the same in Araripina and Serra Talhada, no contribution of BNF was observed in the later locality, probably because of the strong water stress during the experimental period. In Vitória, all genotypes had %N_{dda} above 57%, higher than that of beans (55%) and sorghum (48%), with emphasis to the genotypes DKB 310 PRO2, 1F640 and 1P2227 (88%, 84% and 81%, respectively). Therefore, relevant contributions in the supply of N through the association of the maize plants with endophytic bacteria were obtained, despite the absence of inoculation.

Keywords: *Zea mays*. Plant breeding. ^{15}N isotope.

3.1 INTRODUÇÃO

O N é um dos elementos químicos mais demandados pelas espécies vegetais, fazendo parte de diversas estruturas das plantas (clorofila, vitaminas, carboidratos e proteínas). É um elemento bastante dinâmico no solo, em que predomina um grande compartimento orgânico e somente uma pequena fração encontra-se disponível para as plantas (SOUZA; MELO, 2000). O uso de fertilizantes tem representado uma série de problemas ambientais (LIU et al., 2019; ANAS et al., 2020) e é muito limitado em sistemas de cultivo de baixa utilização de insumos. Dessa forma, é crescente o desenvolvimento de estratégias alternativas para aumento da produtividade agrícola e redução da utilização de fertilizantes (PITTOL et al., 2015).

Estimativas da fixação biológica de nitrogênio (FBN) em plantas não-leguminosas, importantes para o estabelecimento de manejos que propiciem um melhor aproveitamento desse processo natural, ainda representam um desafio para a ciência. Apesar da existência de uma vasta literatura comprovando a ocorrência de bactérias endofíticas diazotróficas em gramíneas tropicais de sistema fotossintético C4 (PITTOL et al., 2015; MARINI et al., 2015; LIU et al., 2017a; FERREIRA NETO et al. 2017; CARVALHO et al. 2017; SANTOS et al., 2017; ANTUNES et al., 2019a; ANTUNES et al., 2019b; HARA et al., 2019; BARROS et al., 2020; ERCOLE et al., 2021), ainda não está estabelecido se, e em que extensão, essas espécies se beneficiam do N fixado pela atividade desses microrganismos ou se os benefícios são devidos à produção de ácido indol-3-acético (AIA) e outras substâncias promotoras de crescimento que, comprovadamente, provocam alterações morfológicas na raiz (como o aumento das raízes laterais e dos pelos radiculares), aumentando a absorção de nutrientes (LIU et al., 2017b; BOMFIM et al., 2020),

O milho (*Zea mays* L.) é o cereal mais produzido no Brasil, sendo utilizado na alimentação humana e animal, e para produção de biocombustíveis (Da SILVA et al., 2020). No país, essa cultura é largamente cultivada em todas as regiões, com destaque para o Centro-oeste como a mais produtora, seguidas pelas regiões Sul, Sudeste, Nordeste e Norte (CONAB, 2022). O melhoramento genético tem contribuído com novos genótipos e híbridos de milho, com o intuito de aumentar os rendimentos dessa cultura nas mais variadas condições ambientais, como tolerância a pragas e doenças (PEREIRA et al., 2020), estresses hídricos (ROCHA et al., 2021) e tolerância a herbicidas (SILVA, 2019), além da precocidade no ciclo de produção (PEREIRA et al., 2020), maior potencial produtivo, arquitetura mais ereta e porte baixo (Da SILVA et al., 2021). Por tanto, obtenção de altos rendimentos na produção são necessários levar em consideração os fatores edafoclimáticos da região onde se pretende instalar

a lavoura, além da escolha do material genético, sendo este último responsável por 50% do rendimento final (Da SILVA et al., 2021).

Para o cultivo intensivo do milho, são utilizadas grandes doses de adubos nitrogenados, que variam entre 90 a 270 kg h⁻¹ no Brasil, sendo a quantidade determinada de acordo com as características de fertilidade do solo e a produtividade esperada (RESENDE et al., 2012; SIMÃO et al., 2020; SOUSA NETTO et al., 2021), refletindo diretamente no aumento dos custos de produção. A FBN representa uma alternativa para reduzir a utilização de adubos nitrogenados artificiais. Mesmo sem utilização de inoculantes com bactérias diazotróficas, o milho cultivado na região semiárida brasileira pode obter entre 37 e 54% do N que acumula em sua biomassa aérea por meio da FBN. A inoculação do milho pode promover aumentos de produtividade e redução da necessidade de adubação nitrogenada. Alves et al. (2015), ao avaliarem a inoculação de diferentes estirpes de *Herbaspirillum* em plantas de milho, constataram que 37% do N nessas plantas advinham da FBN. Kuan et al. (2016) verificaram que até 35% do N demandado pelo milho era proveniente da FBN, quando estas plantas eram inoculadas com *Bacillus* e cultivadas em vasos. Entretanto, no Nordeste do Brasil a utilização de inoculantes para o milho ainda é incipiente, e o eventual benefício da cultura por meio da FBN se dá por meio de associações com bactérias vindas do solo ou de suas sementes.

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito das diferentes condições edafoclimáticas sobre as proporções de nitrogênio proveniente da FBN em genótipos de milho identificados como os mais produtivos para as condições do Nordeste brasileiro, sem a inoculação prévia.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos três experimentos em campo, em estações experimentais do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) localizadas nos municípios de Araripina, Serra Talhada e Vitória de Santo Antão, em Pernambuco, Brasil (Tabela 1), utilizando genótipos de milho mais produtivos, de acordo com as recomendações do Programa de Cereais, Feijões, Raízes e Tubérculos do IPA, responsável por avaliar e recomendar diferentes genótipos de milho para a região Nordeste do Brasil. Os genótipos avaliados diferiram entre os municípios do Sertão (Araripina e Serra Talhada) e da Zona-da-Mata (Vitória de Santo Antão), pois foram seguidas as recomendações de adaptação das variedades às condições edafoclimáticas.

Tabela 1: Caracterização edafoclimática das áreas onde os experimentos foram conduzidos.

PARÂMETRO	VITÓRIA DE SANTO ANTÃO	SERRA TALHADA	ARARIPINA
Mesoregião	Zona da Mata	Sertão	Sertão
Latitude	08° 08'00"S	07°59'00"S	7°27'50"S
Longitude	35° 22'00"W	38°19'16"W	40°24'38"W
Altitude (m)	146	500	828
Precipitação (mm)	1239	709	713
Temperatura máxima (°C)	33,1	35,9	32,7
Temperatura mínima (°C)	18,9	17,2	12,8
Temperatura média (°C)	25,4	24,5	22,9
Umidade relativa média (%)	67	50	55
Evaporação potencial (mm)	1344	1314	1139
Vegetação nativa	Mata Atlântica.	Caatinga hiperxerófila	Carrasco
Tipo de solo	Latossolo vermelho amarelo Distrófico,	Argissolo vermelho amarelo, equivalente Eutrófico	Latossolo vermelho amarelo Distrófico
Topografia	Ondulada	Plana	Plana

Os experimentos no Sertão semiárido (Serra Talhada e Araripina) foram conduzidos durante a estação chuvosa, sob condição de sequeiro e, em ambos, foram cultivados os mesmos genótipos de milho (BRS 4107, BRS 5026, BRS 4105, POTIGUAR, COPACABANA, BR 5036, BR 5037, MUCURIBE, IPR 164 e BR 2121 QPM). O experimento em Vitória de Santo Antão foi conduzido sob irrigação, e foram cultivados os genótipos (1L1411, 1P2224, DKB 390 PRO 2, 1F640, DKB 310 PRO 2, CMS 36, SÃO JOÃO, BRS 3042, 1P2227, 1M1804), os dados de produtividade dos genótipos estão dispostos na Tabela 2. A frequência e as lâminas de irrigação foram aplicadas de acordo com a necessidade diária da cultura e o monitoramento meteorológico.

Tabela 2. Produtividade de genótipos cultivados em Araripina, Serra Talhada e Vitória de Santo Antão

Genótipos	Araripina	Serra Talhada	Genótipos	V. de St. Antão
	----- Kg/ha -----			-- Kg/ha --
BR 5036	2652	0	DKB 310 PRO2	7812
BRS 4105	2308	0	1F640	9843
MUCURIBE	1608	0	1P2227	7968
BR 5037	1905	0	1M1804	5312
BR 2121 QPM	1081	751	BRS 3042	7812
BRS 5026	1595	0	1P2224	8906
IPR 164	2724	0	DKB 390 PRO2	7656
COPACABANA	2323	0	CMS 36	5156
POTIGUAR	1240	0	1L1411	8593
BRS 4107	1542	488	SÃO JOSÉ	2552

Nos três experimentos foi adotado um delineamento em blocos casualizados, com quatro repetições, sendo cada genótipo de milho considerado um tratamento. A parcela experimental foi constituída de 4 fileiras de 4 m de comprimento, espaçadas de 0,8 m, nas quais o milho foi semeado em covas espaçadas de 0,2 m. Como área útil da parcela foram utilizadas as duas fileiras centrais, desprezando-se 1 m em cada extremidade, para evitar o efeito de bordadura.

Amostras de solo deformadas foram coletadas para a caracterização das propriedades químicas e físicas (Tabela 3) das áreas onde os experimentos foram conduzidos. O manejo da correção e adubação do solo foi realizado de acordo com a análise química do solo de cada área. Nos três experimentos foi utilizada uma dose de arranque de N (30 kg ha^{-1} de ureia, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) em fundação, de acordo com a recomendação de Barros et al. (2020) para estimar a FBN em sorgo. Cloreto de potássio (KCl) e super simples ($\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 + \text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) também foram aplicados em fundação, em quantidades diferentes em cada local (30 kg ha^{-1} e 30 kg ha^{-1} , em Araripina; 10 kg ha^{-1} e 20 kg ha^{-1} em Serra Talhada; e 20 kg ha^{-1} e 20 kg ha^{-1} em Vitória de Santo Antão).

Tabela 3: Caracterização das propriedades químicas, físicas e isotópicas em camadas dos solos das áreas experimentais.

Local	Vitória de Santo Antão			Serra Talhada			Araripina		
	0-20	20-40	40-60	0-20	20-40	40-60	0-20	20-40	40-60
Camada (cm)	0-20	20-40	40-60	0-20	20-40	40-60	0-20	20-40	40-60
pH (H ₂ O)	8,0	7,7	7,0	6,5	6,4	6,9	4,4	4,4	4,6
N (%)	0,10	0,08	0,06	0,06	0,04	0,02	0,12	0,09	0,06
δ ¹⁵ N (‰)	10,62	9,84	9,05	10,57	9,25	8,90	16,73	17,16	16,93
C (%)	1,16	0,92	0,56	0,71	0,50	0,27	1,67	1,40	0,99
δ ¹³ C (‰)	-20,77	-21,36	-23,12	-17,78	-18,10	-17,20	-25,01	-24,96	-24,42
C/N (%)	11,6	11,5	9,3	11,8	12,5	13,5	13,9	15,5	16,5
P (mg/dm ³)	68,0	49,0	10,0	98,7	90,0	86,0	2,0	1,0	1,0
Ca ²⁺ (cmolc/dm ³)	2,0	2,1	1,5	2,3	2,9	2,3	0,4	0,3	0,2
Mg ²⁺ (cmolc/dm ³)	1,3	1,0	1,0	1,7	1,9	1,2	0,5	0,6	0,5
Na ⁺ (cmolc/dm ³)	1,3	0,7	0,6	0,1	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0
K ⁺ (cmolc/dm ³)	0,4	0,2	0,1	0,9	0,5	0,4	0,0	0,0	0,0
Al ³⁺ (cmolc/dm ³)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
H ⁺ (cmolc/dm ³)	0,2	0,3	0,6	1,2	0,5	0,5	2,8	2,2	1,5
S (cmolc/dm ³)	5,0	4,0	3,3	5,0	5,4	4,1	1,0	0,9	0,7
CTC (cmolc/dm ³)	5,2	4,3	3,8	6,1	5,9	4,6	4,3	3,8	2,7
V (cmolc/dm ³)	96,0	92,7	85,0	81,0	91,7	89,7	23,3	25,0	25,7
m (cmolc/dm ³)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	34,3	38,3	42,3
Dap (g/cm ³)	1,4	1,5	1,4	1,4	1,4	1,4	1,3	1,4	1,3
Dr (g/cm ³)	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Areia grossa (%)	46,3	51,7	51,7	31,7	38,3	38,7	53,3	53,3	48,7
Areia fina (%)	27,3	26,3	24,3	43,0	41,0	43,0	26,0	23,7	26,3
Silte (%)	16,3	11,3	12,0	15,3	10,7	8,3	4,0	2,3	3,0
Argila (%)	10,0	10,7	12,0	10,0	10,0	10,0	16,7	20,7	22,0

As amostragens de tecidos vegetais foram feitas quando as plantas de milho chegaram ao estágio VT (pendoamento), período de maior exigência nutricional da cultura. Nesse momento, foram coletadas quatro folhas de quatro plantas em cada parcela, para compor uma amostra composta por parcela. Foram escolhidas as folhas localizadas na inserção da espiga. Na ocasião, também foram coletadas amostras de folhas de girassol (*Helianthus annuus*), cultivados em áreas contíguas ao experimento (que também recebeu 30 kg ha⁻¹ de ureia em fundação), além de espécies que surgiram de forma espontânea da área dos experimentos: mamona (*Ricinus communis*), jasmim (*Plumeria rubra*), buva (*Conyza bonariensis*), trapoeraba (*Commelina Benghalensis* L.), pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), e ervaço branco (*Richardia grandiflora*) e uma espécie não identificada. Essas plantas foram utilizadas para estimativa do sinal isotópico do N do solo disponível para o milho (especificadas para cada área nas Tabelas 4, 5 e 6), sendo as espécies referências para a estimativa da FBN por meio da técnica da abundância natural do ¹⁵N. Todo o material vegetal foi levado ao laboratório, identificado e colocado para secar em estufa de circulação forçada a 60 °C, até o material estar em peso constante. Posteriormente, cada amostra foi moída em moinho de facas e macerada até virar pó.

A principal restrição ao uso da metodologia da abundância natural de ¹⁵N para estimativa da FBN em não leguminosas é a dificuldade para encontrar uma planta referência apropriada para estimar o sinal isotópico do N do solo disponível para a planta alvo (FREITAS; SAMPAIO; SANTOS, 2010). Por isso, além da coleta de diversas plantas referência em cada área experimental, foram realizadas duas outras estratégias para confirmar as estimativas do %N_{da} nos genótipos de milho. A primeira foi a amostragem, em cada estação experimental, da biomassa aérea de feijão-caupi e sorgo, espécies com potencial de FBN comprovado na região Nordeste do Brasil (FREITAS et al., 2012; BARROS et al., 2020, respectivamente) cultivadas em áreas próximas ao experimento, para comparação entre seus %N_{da} e os do milho, conforme utilizado por Biggs et al. (2002) para cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). A segunda estratégia foi estimar a variação do sinal de $\delta^{15}\text{N}$ do N do solo disponível para o milho, de acordo com a profundidade, adotando o procedimento descrito por Ledgard et al. (1984), assumindo que a maioria das raízes do milho se concentra até essa profundidade de solo. Para isso, foram coletadas amostras de solo nas profundidades de 0-20, 20-40 e 40-60 cm nos locais onde os experimentos de campo foram instalados. Foi conduzido um experimento em casa de vegetação do Departamento de Agronomia da UFRPE, no qual algodão, mamona e girassol foram cultivados, por 90 dias, em vasos contendo as amostras

coletadas em cada área experimental e em cada profundidade, configurando um esquema fatorial 3x3x3, com quatro repetições para cada tratamento, totalizando 108 unidades experimentais. O delineamento foi inteiramente casualizado. Ao fim do experimento, as partes aéreas das plantas foram coletadas e colocadas para secar em estufa de circulação forçada a 60° C até obter peso constante. Uma vez secas e pesadas, as amostras foram maceradas até chegar a pó. Na ocasião, foram coletadas amostras de terra fina seca ao ar (TFSA) de cada solo e profundidade, com quatro repetições.

Subamostras de todo o material vegetal e de solo foram enviadas para determinação dos teores de N (%) e das abundâncias naturais de ^{15}N e ^{13}C (‰) em espectrômetro de massa Thermo Quest-Finnigan Delta Plus (Finnigan-MAT; CA, USA) com interface com um Analisador Elementar (Carlo Erba model 1110; Milan, Italy), no Laboratório de Ecologia Isotópica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP). Materiais de referência (atropina, extrato de levedura e padrão de solo 502–308, LECO Corporation) foram incluídos em todas as execuções analíticas. A abundância natural de ^{15}N nas amostras foram expressas usando a notação delta ($\delta^{15}\text{N}$), que representa as partes por mil desvios (‰) em relação à razão ^{15}N e ^{14}N (R) no N_2 atmosférico (JUNK; SVEC, 1958; MARIOTTI, 1983):

$$\delta = [(R_{\text{amostra}} / R_{\text{referência}}) - 1] \times 1000$$

Para estimar o sinal isotópico do N disponível para a planta com sistema radicular explorando a camada de solo de 0,0 a 0,60 m de profundidade, foi calculada a média ponderada do sinal de ^{15}N das plantas utilizadas no experimento em casa de vegetação, usando a seguinte equação (URQUIAGA et al. 2012):

$$\delta^{15}\text{N} = \Sigma (\delta^{15}\text{N}_{\text{rp}} * \text{N}_{\text{Trp}}) / \Sigma(\text{N}_{\text{Trp}})$$

Em que: $\delta^{15}\text{N}_{\text{rp}}$ e N_{Trp} são a abundância de ^{15}N e o N total acumulado, respectivamente, nas espécies cultivadas nos vasos com os solos de cada intervalo de profundidade.

A proporção de nitrogênio derivado da atmosfera (%N_{dda} 1) foi estimada comparando o valor médio de $\delta^{15}\text{N}$ de cada genótipo de milho com os das espécies de referência em cada

experimento, desde que a diferença fosse estatisticamente significativa ($p < 0,05$), usando a fórmula (SHEARER; KOHL, 1986):

$$\%N_{dda} = 100 [(\delta^{15}N_{refer\acute{e}ncia} - \delta^{15}N_{milho}) / (\delta^{15}N_{refer\acute{e}ncia} - B)]$$

Em que $\delta^{15}N_{milho}$ = valor médio de $\delta^{15}N$ de cada genótipo de milho; $\delta^{15}N_{refer\acute{e}ncia}$ = valor médio de $\delta^{15}N$ do N do solo disponível para o milho, estimado pelo valor isotópico da espécie referência coletadas em campo ou pela média ponderada do sinal de ^{15}N das plantas cultivadas em vasos, e B é a abundância de ^{15}N do milho quando as plantas dependem inteiramente do FBN do N_2 atmosférico (AMARGER et al., 1979). Na ausência de um valor conhecido para o milho, o valor B foi assumido como zero, como foi feito para a estimativa da fixação espécies de Poaceae (ALVES et al., 2015; BAPTISTA et al., 2014; de MORAIS et al., 2012).

Além disso, a FBN também foi estimada (%N_{dda} 2) utilizando a estimativa do sinal isotópico do N disponível para uma planta com sistema radicular explorando a camada de solo de 0,0 a 0,60 m de profundidade, utilizando a média ponderada do sinal de ^{15}N das plantas utilizadas no experimento em casa-de-vegetação em substituição ao valor de $\delta^{15}N_{refer\acute{e}ncia}$ na equação de Shearer e Kohl (1986).

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de probabilidade de 0,05. Todos os testes foram rodados no Sisvar versão 4.8 (FERREIRA, 2008).

3.3 RESULTADOS

Em Araripina, foram verificadas diferenças significativas entre os diferentes genótipos de milho (Tabela 4) e as plantas referências para as variáveis analisadas ($\delta^{13}C$, %C, $\delta^{15}N$, %N, C/N e %N_{dda}). O $\delta^{13}C$ não diferiu estatisticamente entre os genótipos de milho, no entanto, diferiram quando comparados com as plantas referências, sendo estas menos enriquecidos com o isótopo de ^{13}C (Tabela 4).

Tabela 4: Composição isotópica de C e N (‰), Nitrogênio total (%), relação C/N e percentual do N derivado da atmosfera (%) em diferentes genótipos de milho e plantas referências cultivadas em Araripina no estado de Pernambuco.

Espécies	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	N	C/N	%Ndda 1
BR 5036	-12,06 a	4,50 d	3,72 bcd	10,90 ab	56,58 a
BRS 4105	-12,04 a	4,88 cd	3,85 bcd	11,15 a	52,91 a
MUCURIPE	-11,96 a	5,58 bcd	3,64 bcd	11,76 a	46,14 ab
BR 5037	-11,99 a	5,63 bcd	3,79 bcd	11,06 a	45,68 ab
BR 2121 QPM	-11,86 a	5,79 bcd	3,79 bcd	11,05 a	44,15 ab
BRS 5026	-11,16 a	6,28 bcd	3,54 cd	12,20 a	39,44 bc
IPR 164	-11,90 a	6,36 bcd	3,65 bcd	11,72 a	38,61 bc
COPACABANA	-11,89 a	6,72 bcd	3,24 d	12,80 a	35,19 bc
POTIGUAR	-11,86 a	6,89 bc	3,59 bcd	11,47 a	33,53 bc
BRS 4107	-11,51 a	7,18 bc	3,51 cd	12,43 a	30,73 c
Feijão	-29,11 bc	7,48 b	4,69 ab	8,59 bc	27,85 c
Sorgo	-12,19 a	6,30 bcd	3,9 bcd	10,90 ab	39,17 bc
Girassol florado	-29,70 cd	10,09 a	4,42 abc	8,51 bcd	
Mijona	-30,21 d	10,23 a	5,18 a	6,12 d	
Girassol frente	-28,58 b	10,68 a	5,11 a	7,92 cd	
Girassol fundos	-29,72 cd	10,71 a	4,34 abcd	8,41 cd	
CV (%)	-1,93	11,36	9,81	8,83	17,22
Média geral	-19,24	7,59	4,10	10,05	26,73

Os sinais de $\delta^{15}\text{N}$ de todos os genótipos de milho diferiram significativamente dos sinais das espécies referência coletadas em campo (Tabela 4). As plantas referências também foram isotopicamente mais enriquecidas que o feijão-caupi e o sorgo. Com isso, há evidência de fixação simbiótica de N atmosférico em todas elas, com %Ndda acima de 27% (feijão) em todas, e com variação nos genótipos de milho de 31 a 57% (BR 5036). Os genótipos de milho também não diferiram quanto às concentrações de N nos tecidos, que foram inferiores às concentrações de algumas das referências. Por consequência, os valores da relação C/N foram mais altos nos genótipos de milho que nas plantas referências

Em Serra Talhada, não houve diferenças significativas entre os valores de $\delta^{15}\text{N}$ nem dos genótipos de milho e nem do feijão e do sorgo, em relação aos valores de $\delta^{15}\text{N}$ das plantas referência. Dessa forma, não foi possível calcular o Ndda 1, de acordo com o critério adotado neste trabalho. As concentrações de N e a relação C/N não diferiram entre os genótipos de milho (Tabela 5), mas ficaram abaixo e acima, respectivamente, dos valores do girassol.

Tabela 5: Composição isotópica de C e N (‰), Nitrogênio total (%), relação C/N e percentual do N derivado da atmosfera (%) em diferentes genótipos de milho e plantas referências cultivadas em Serra Talhada no estado de Pernambuco.

Espécies	$\delta^{13}\text{C}$	C	$\delta^{15}\text{N}$	N	C/N	%Ndda 1
MUCURIPE	-12,46 a	42,63 a	6,64 a	2,11 bcd	20,24 ab	
BR 5037	-11,82 a	41,62 a	7,49 a	2,04 bcd	20,39 ab	
POTIGUAR	-12,63 a	42,32 a	7,59 a	1,73 d	24,55 a	
BRS 4105	-11,99 a	42,34 a	8,05 a	1,98 bcd	21,34 ab	
BRS 4107	-11,85 a	41,90 a	8,21 a	1,92 bcd	22,02 ab	
BR 5036	-11,69 a	42,02 a	8,26 a	2,11 bcd	20,13 ab	
BRS 5026	-12,01 a	41,81 a	8,31 a	2,08 bcd	20,42 ab	
BR 2121 QPM	-12,11 a	42,61 a	8,42 a	2,17 bcd	20,42 ab	
COPACABANA	-12,01 a	42,42 a	9,22 a	2,27 bcd	19,23 ab	
IPR 164	-11,90 a	41,16 a	10,06 a	1,79 d	24,39 a	
Feijão	-27,50 b	40,61 ab	6,53 a	3,56 abc	13,67 abc	
Sorgo	-15,59 a	42,26 a	8,64 a	3,25 bcd	13,01 bc	
Girassol	-29,18 b	40,73 ab	9,93 a	5,20 a	7,87 c	
Mamona	-26,11 b	41,59 a	8,99 a	3,63 ab	11,77 bc	
Ervanço-branco	-27,57 b	37,15 b	8,88 a	2,04 bcd	20,75 ab	
CV (%)	-12,77	3,33	19,36	21,33	23,13	
Média geral	-17,96	41,48	8,48	2,84	17,25	

Em Vitória de Santo Antão foram encontradas diferenças significativas entre os genótipos de milho e as plantas referências quanto aos sinais de ^{15}N , concentrações de N nas folhas e relação C/N (Tabela 6). Os sinais de ^{15}N de todos os genótipos, assim como os do feijão e do sorgo, foram significativamente inferiores aos das plantas de referência, permitindo o cálculo das %Ndda, que variaram de 53 a 87% no milho e que foram 43 e 52% no sorgo e no feijão, respectivamente. Apenas concentrações de N do genótipo 1L1411 (1,66%) diferiram das concentrações de outros dois genótipos (2,54 e 3,22% de CMS 36 e São José, respectivamente), causando diferenças na relação C/N.

Tabela 6: Composição isotópica de C e N (‰), Nitrogênio total (%), ralação C/N e percentual do N derivado da atmosfera (%) em diferentes genótipos de milho e plantas referências cultivadas em Vitória de Santo Antão no estado de Pernambuco.

Espécies	$\delta^{13}\text{C}$	C	$\delta^{15}\text{N}$	N	C/N	%Ndda 1
DKB 310 PRO2	-12,03 a	42,90 ab	1,01 e	2,06 cde	21,49 ab	87,19 a
1F640	-12,20 a	42,67 ab	1,37 de	2,24 cde	19,11 abcd	82,75 a
1P2227	-12,05 a	42,79 ab	1,66 cde	1,90 de	22,60 ab	79,09 ab
1M1804	-12,22 a	42,52 ab	2,10 bcde	2,10 cde	20,24 abc	73,49 abc
BRS 3042	-12,39 a	42,49 ab	2,14 bcde	2,46 bcde	18,28 bcd	73,04 abc
1P2224	-12,00 a	42,87 ab	2,20 bcde	2,41 bcde	17,80 bcd	72,29 abc
DKB 390 PRO2	-11,88 a	42,60 ab	2,66 bcde	2,10 cde	20,32 abc	66,56 abcd
CMS 36	-12,13 a	42,60 ab	3,07 bcde	2,54 bcd	16,75 bcde	61,38 abcd
1L1411	-12,12 a	41,84 ab	3,66 bcd	1,66 e	25,31 a	53,94 bcd
SÃO JOSÉ	-12,43 a	42,67 ab	3,68 bcd	3,22 ab	13,30 de	53,70 bcd
Feijão	-29,17 c	39,80 bc	3,95 bc	3,61 a	11,11 e	50,28 cd
Sorgo	-12,41 a	42,74 ab	4,55 b	2,30 cde	19,03 abcd	42,76 d
Jasmim	-26,06 b	41,09 bc	7,47 a	2,41 bcde	17,11 bcde	
Buva	-30,60 d	38,32 c	7,84 a	2,04 cde	18,71 bcd	
Trapoeraba	-30,84 d	33,96 d	8,09 a	2,07 cde	16,70bcde	
Pião manso	-26,06 b	40,98 bc	8,32 a	2,88 abc	14,37 cde	
CV (%)	-2,53	3,02	20,62	12,93	13,40	21,85
Media geral	-19,93	41,17	4,43	2,49	17,49	44,15

Entre os genótipos de milho os valores isotópicos do N variaram entre 3,68 ‰ (SÃO JOSÉ) e 1,01‰ (DKB 310 PRO2), sendo menores aos observados nas plantas referências. O feijão-caupi e o sorgo apresentaram valores semelhantes aos observados para os genótipos de milho, sendo ligeiramente mais elevados que estes. Dessa forma, o %Ndda diferiu entre os diferentes genótipos de milho, feijão e sorgo, sendo o genótipo DKB 310 PRO2 o que apresentou a maior contribuição de N oriundo da FBN (87,19%). Para a %N e relação C/N somente o genótipo 1L1411 diferiu dos demais genótipos, sendo o menor para a variável %N (1,66%) e o maior para a relação C/N (25,31). Para essas mesmas variáveis, o feijão também se mostrou diferente das demais espécies, sendo o que apresentou o maior valor para %N (3,61%) e o menor para a relação C/N (11,11).

Os resultados obtidos no experimento com algodão, mamona e girassol cultivados em vasos com amostras de solo coletadas nas áreas experimentais (Vitória de Santo Antão, Serra Talhada e Araripina) estão demonstrados na Tabela 7. De maneira geral o girassol e a mamona se mostraram mais enriquecidos nesse isótopo que o algodão. Observa-se ainda que essas plantas são mais enriquecidas quando cultivadas em solos de camadas mais superficiais, reduzindo o seu sinal isotópico de acordo que aumenta a profundidade do solo. Em relação a média ponderada geral de cada local, as plantas cultivadas em Araripina tiveram os maiores

teores de $\delta^{15}\text{N}$ (9,75 ‰), seguida pelas plantas cultivadas em Vitória de Santo Antão e Serra Talhada (8,75 ‰ e 7,80 ‰, respectivamente).

Tabela 7: Estimativa do sinal isotópico do N do solo disponível em profundidade em plantas referência cultivadas em vaso em solo proveniente dos locais dos experimentos de campo

Local	Planta referência				Média geral**
	Camada (cm)	Girassol	Mamona	Algodão	
		$\delta^{15}\text{N}$ (‰)			
Araripina	0-20	12,08 a	10,99 a	7,94 b	
	20-40	11,02 a	10,23 a	7,16 b	
	40-60	11,06 a	10,01 a	7,28 b	
Média ponderada*		11,38	10,41	7,46	9,75
Serra Talhada	0-20	9,40 a	8,04 ab	6,64 b	
	20-40	8,54 a	9,22 a	5,32 b	
	40-60	8,00 b	10,02 a	5,09 c	
Média ponderada*		8,64	9,09	5,68	7,80
Vitória de Santo Antão	0-20	9,65 a	9,98 a	8,10 b	
	20-40	9,60 a	8,78 a	7,29 a	
	40-60	8,69 b	10,66 a	6,05 c	
Média ponderada*		9,31	9,80	7,14	8,75

Médias seguidas de letras iguais, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

* Média ponderada do $\delta^{15}\text{N}$ (‰) para as plantas de referência de acordo com equação de

Urquiaga et al. (2012)

** Média dos valores ponderados para cada local

A partir dessas informações, foi realizado o cálculo de %N_{dda} 2 considerando separadamente a média geral de ^{15}N para as três espécies utilizadas (Tabela 8). Em Araripina foi observado contribuições relevantes para os diferentes genótipos utilizados, com valores variando entre 26% e 53%, valores esses superiores aos observados para o feijão, com destaque para o genótipo BR 5036, o qual obteve 53,83% de N através da FBN. Em Serra Talhada não foi verificado essas contribuições, mesmo se tratando dos mesmos genótipos, chegando em muitos casos a não ser constatado indícios de FBN. Já em Vitória de Santo Antão, as contribuições no fornecimento de N através desse processo foram bastante expressivas, com valores acima de 50% para todos os genótipos avaliados, chegando a mais de 80% para os genótipos 1P2227, 1F640 e DKB 310 PRO2 (81%, 84,32% e 88,36%, respectivamente).

Tabela 8: Estimativas da proporção de N derivado da atmosfera (%N_{da 2}) estimada pela técnica de abundância natural de ¹⁵N utilizando como valor de $\delta^{15}\text{N}$ da planta referência o valor da média ponderada para as profundidades de 0-0,6 m.

	Araripina	Serra Talhada	Vitória de Santo Antão	
Referência (%)*	9,75	7,80	8,75	
Genótipo	N _{da 2} (%)		Genótipo	N _{da 2} (%)
BR 5036	53,82 a	0,00	DKB 310 PRO2	88,36 a
BRS 4105	49,92 ab	0,08	1F640	84,32 a
MUCURIPE	42,72 abc	14,78	1P2227	81,00 ab
BR 5037	42,23 abc	3,95	1M1804	75,91 abc
BR 2121 QPM	40,60 abc	0,00	BRS 3042	75,50 abc
BRS 5026	35,58 bcd	0,45	1P2224	74,83 abc
IPR 164	34,71 bcd	0,00	DKB 390 PRO2	69,62 abcd
COPACABANA	31,07 cd	0,00	CMS 36	64,91 bcde
POTIGUAR	29,30 cd	2,97	1L1411	58,15 cde
BRS 4107	26,33 cd	0,22	SÃO JOSÉ	57,93 cde
Feijão	23,26 d	26,85	Feijão	54,33 de
Sorgo	35,30 bcd	13,22	Sorgo	50,68 e

Médias seguidas de letras iguais, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

*Valor da média ponderada das plantas de referência (girassol, mamona e algodão) cultivadas em casa de vegetação com os solos dos diferentes locais nas profundidades de 0-60 cm

3.4 DISCUSSÃO

Os diferentes genótipos de milho avaliados apresentaram sinais isotópicos indicativos de contribuição de N atmosférico em seus tecidos (Tabelas 4, 5 e 6), sendo importante ressaltar que as sementes utilizadas nos experimentos não foram inoculadas com bactérias selecionadas para a eficiência da FBN. Dessa forma, as plantas estabeleceram associações com bactérias diazotróficas presentes no solo, que penetraram nos tecidos das plantas ou se estabeleceram na rizosfera, ou endofíticas das sementes (BOMFIM et al., 2020). As contribuições da FBN são muito variáveis entre genótipos e localidades, corroborando resultados de outros trabalhos (ALVES et al., 2014), porém foram verificadas contribuições expressivas para determinados genótipos nas diferentes localidades, com valor máximo de 87,10%, no genótipo DKB 310 PRO2 cultivado em Vitória de Santo Antão.

Apesar de serem cultivados os mesmos genótipos e com as mesmas condições de manejo nas cidades de Araripina e Serra Talhada, os mesmos apresentaram contribuições de N derivado da associação com bactérias nativas de Araripina, mas não de Serra Talhada. Além das diferenças de condições edafoclimáticas, que possivelmente influenciaram a comunidade bacteriana nativa, o principal fator que comprometeu a FBN do milho em Serra Talhada foi a ocorrência de período de estiagem, que afetou severamente o desenvolvimento das plantas.

Mesmo o feijão-caupi, leguminosa que comprovadamente é capaz de apresentar proporção de mais de 80% de N fixado quando cultivado sem restrição hídrica no Semiárido (FREITAS et al. 2012), não apresentou composição isotópica claramente diferente das plantas referência (Tabela 5). Em Araripina, os mesmos genótipos obtiveram maiores benefícios da FBN, com todos os genótipos de milho apresentando mais de 30% do N decorrente desse processo, valores que foram superiores ao observado para o feijão-caupi (27,85%). Para os genótipos BR 5036 e BRS 4105, o %N_{dda} foi de mais de 50%, maior que o do sorgo (40%). Boddey et al. (2003) relatam que a disponibilidade de água no solo é um fator primordial para os processos biológicos e, conseqüentemente, para o sucesso da FBN. Urquiaga et al. (2017) relata que a baixa disponibilidade de água no solo reduz a colonização de raízes por bactérias, além de afetar diretamente o processo de fotossíntese e, conseqüentemente, o crescimento da planta. Araripina está localizada na Serra do Araripe, no Semiárido brasileiro, que apresenta uma precipitação pluviométrica melhor distribuída ao longo do período das águas (verão), já Serra Talhada apresenta condições climáticas mais áridas, com precipitações pluviométricas mais irregulares, mesmo estando também inserida no Semiárido brasileiro, e estando a aproximadamente 270 km de Araripina.

O tipo e as características dos solos nas áreas em que os experimentos foram instalados também podem ter influência sobre a FBN. Em Araripina, o solo é classificado como Latossolo, que são solos caracteristicamente bem desenvolvidos, fisicamente estruturados e quimicamente pobres (principalmente de bases), além de serem ácidos. No entanto, se corrigidos a acidez e a fertilidade com adubação (mineral e/ou orgânica), são solos bastante produtivos, desde que, tenham uma umidade ideal durante todo o ciclo das culturas. Já em Serra Talhada, o solo é classificado como Argissolo, que se caracteriza pela presença de um horizonte B textural imediatamente abaixo do horizonte superficial, podendo ter argila de atividade baixa ou alta. A grande quantidade de argila nesse solo (Tabela 3) e conseqüentemente a predominância de microporos, podem ter provocado um agravamento do estresse hídrico para as plantas devido ao veranico, resultando na diminuição do potencial da água no solo, dificultando a absorção de água e nutrientes pelas plantas. Por outro lado, tal situação abre portas para estudos futuros relacionados a comunidades bacterianas nativas capazes de beneficiar as plantas quando submetidas a esse tipo de estresse.

Apesar da não ocorrência de FBN no milho cultivado em Serra Talhada, a associação de bactérias diazotróficas com esta gramínea se mostra promissora para o estabelecimento de um manejo com redução da aplicação de adubos nitrogenados, o que pode favorecer

principalmente os pequenos produtores. Além disso, outros benefícios podem estar relacionados a associação de bactérias diazotróficas com o milho, que podem apresentar mecanismos de promoção de crescimento com a liberação de fitohormônios (ex. AIA), solubilização de fosfatos, supressão de fitopatógenos, tolerância a estresse abióticos etc. (MOREIRA et al., 2010; ANDRADE et al., 2014; ULLAH et al., 2017). Li et al. (2020) viram que a inoculação de *Paenibacillus beijingsensis* e *Paenibacillus* sp. em sementes de trigo promove a solubilização de P e aumente a contribuição da FBN nessa cultura.

Como relatado anteriormente, em Vitória de Santo Antão foram utilizados genótipos de milho diferentes dos das outras duas localidades, e com uso do sistema de irrigação para a manutenção da capacidade de campo do solo. Como observado, a maioria dos genótipos obtiveram mais de 50% do N derivado da atmosfera (Tabela 6), chegando a mais de 82% para os genótipos 1F640 e DKB 310 PRO 2. Apenas dois genótipos ficaram abaixo de 50% de N_{dda}, com aproximadamente 41% cada. A elevada contribuição da FBN para o milho em Vitória de Santo Antão pode estar relacionada às condições ideais de umidade do solo, permitindo que os genótipos e a comunidade bacteriana nativa expressassem um alto potencial de desenvolvimento. Outro fator que pode estar relacionado a esse resultado são os genótipos de milho, no entanto, seria necessária uma replicação do experimento em outras localidades e com condições semelhantes para a constatação dessa hipótese.

De acordo com os resultados obtidos no experimento de casa de vegetação foi constatado que, as plantas cultivadas nas camadas superficiais se mostraram mais enriquecido no isótopo de ¹⁵N para os solos avaliados (Tabela 7). Uma possível explicação para esse fato, se deve a maior deposição de matéria orgânica nessas camadas, que foi evidenciado pela maior quantidade de C nessas camadas (Tabela 3), e com a maior decomposição resultou em uma maior mineralização do N, que conseqüentemente, promoveu o aumento nos valores do isótopo ¹⁵N nessas camadas. No trabalho desenvolvido por Mendonça et al. (2010), avaliando solos com diferentes coberturas na região Nordeste do Brasil, verificaram que as maiores quantidades de C estavam presentes nas camadas superficiais, ocorrendo um decréscimo com o aumento da profundidade.

A estimativa da proporção de N derivado da atmosfera (%N_{dda} 2) para os diferentes genótipos de milho considerando a média ponderada geral das plantas referencias cultivadas em solo (0-60 cm) de cada local está disponível na tabela 7. Em Araripina, as contribuições no fornecimento de N para os genótipos de milho variaram entre 26,33 % e 53,82%, sendo essa maior contribuição observada para o genótipo BR 5036. Já em Serra Talhada, não foi observado

contribuições significativas para a maioria dos genótipos, chegando em alguns casos a constatação da ausência de evidências da FBN, mesmo sendo cultivadas os mesmos genótipos de Araripina. Uma possível explicação para esses resultados se deve ao fato da baixa precipitação ocorrida no local durante o período do experimento, o que deve ter comprometido a relação planta-bactéria e a fotossíntese (URQUIAGA et al., 2017). Em Vitória de Santo Antão foram observadas as maiores contribuições da FBN, apresentando valores entre 57,95% e 88,36%, com destaque para os genótipos 1F640 e DKB 310 PRO2 (84,32% e 88,36%, respectivamente).

3.5 CONCLUSÃO

Os genótipos de milho recomendados para maior produtividade para a região Nordeste do Brasil apresentam potencial para se beneficiar da FBN, porém os %N_{da} são impactados pelas condições edafoclimáticas e estresse hídrico.

Genótipos de milho podem apresentar respostas variáveis às condições edafoclimáticas dos locais de cultivo, em relação ao potencial de acumular N fixado.

A técnica da abundância natural do ¹⁵N, apesar de ser de utilização mais difícil em gramíneas que em leguminosas, pode indicar genótipos de milho com maior aptidão de se beneficiar da FBN, informação útil em programas de melhoramento vegetal da cultura.

O milho mesmo sendo cultivado em diferentes condições edafoclimáticas de manejo, se beneficia do N atmosférico proporcionado pelo processo de FBN, o que pode refletir em reduções significativas na adubação nitrogenada.

Esse trabalho abre margem para estudos futuros sobre as comunidades de bactérias fixadoras de nitrogênio nativas nas diferentes localidades, refletindo a importância do estudo micro regional, podendo resultar na seleção de estirpes específicas para localidades e genótipos das culturas utilizadas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, G. C.; VIDEIRA, S. S.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Differential plant growth promotion and nitrogen fixation in two genotypes of maize by several *Herbaspirillum* inoculants. **Plant and Soil**, v. 387, p. 307–321, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11104-014-2295-2>
- AMARGER, N.; MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; DURR, J. C.; BOURGUIGNON, C.; LAGACHERIE, B. Estimate of symbiotically fixed nitrogen in field grown soybeans using variations in ¹⁵N Natural abundance. **Plant and Soil**, v. 52, n. 2, p. 269–280, 1979. <https://doi.org/10.1007/BF02184565>
- ANAS, M.; LIAO, F.; VERMA, K. K.; SARWAR, M. A.; MAHMOOD, A.; CHEN, Z.-L.; LI, Q.; ZENG, X.-P.; LIU, Y.; LI, Y.-R. Fate of nitrogen in agriculture and environment: agronomic, eco-physiological and molecular approaches to improve nitrogen use efficiency. **Biological Research**, v. 53, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.1186/s40659-020-00312-4>
- ANDRADE, L. F.; SOUZA, G. L. O. D.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; CARDOSO, A. M. S.; PEREIRA, M. C. T.; PEREIRA, D. F. G. S. Analysis of the abilities of endophytic bacteria associated with banana tree roots to promote plant growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 27–34, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3019-2>
- ANTUNES, G. R.; SANTANA, S. R. A.; ESCOBAR, I. E. C.; BRASIL, M. S.; ARAÚJO, G. G. L.; VOLTOLINI, T. V.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Associative diazotrophic bacteria from forage grasses in the Brazilian semiarid region are effective plant growth promoters. **Crop & Pasture Science**, v. 70, p. 899–907, 2019a. <https://doi.org/10.1071/CP19076>
- ANTUNES, J. E. L.; FREITAS, A. D. S.; OLIVEIRA, L. M. S.; LYRA, M. C. C. P.; FONSECA, M. A. C.; SANTOS, C. E. R. S.; OLIVEIRA, J. P.; ARAÚJO, A. S. F.; FUGEUIREDO, M. V. B. Sugarcane inoculated with endophytic diazotrophic bacteria: effects on yield, biological nitrogen fixation and industrial characteristics. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 4, 2019b. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920180990>
- BAPTISTA, R. B.; MORAIS, R. F.; LEITE, J. M.; SCHULTZ, N.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. Variations in the ¹⁵N natural abundance of plant-available N with soil depth: Their influence on estimates of contributions of biological N₂ fixation to sugar cane. **Applied Soil Ecology**, v. 73, p. 124–129, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2013.08.008>
- BARROS, B. G. F.; FREITAS, A. D. S.; TABOSA, J. N.; LYRA, M. C. C. P.; MERGULHÃO, A. C. E. S.; SILVA, A. F.; OLIVEIRA, W. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I.; SAMPAIO, E. V. S. B. Biological nitrogen fixation in field-grown sorghum under different edaphoclimatic conditions is confirmed by N isotopic signatures. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 117, n. 1, p. 93–101, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10705-020-10051-3>
- BIGGS, I. M.; STEWART, G. R.; WILSON, J. R.; CRITCHLEY, C. ¹⁵N natural abundance studies in Australian commercial sugarcane. **Plant Soil**, v. 238, p. 21–30, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1014280420779>

BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B.J.R; REIS, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 139–149, 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1024152126541>

BOMFIM, C. S. G.; SILVA, V. B.; CURSINO, L. H. S.; MATTOS, W. S.; SANTOS, J. C. S.; SOUZA, L. S. B.; DANTAS, B. F.; FREITAS, A. D. S.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Endophytic bacteria naturally inhabiting commercial maize seeds occupy different niches and are efficient plant growth-promoting agents. **Symbiosis**, v. 81, n. 3, p. 255–269, 2020. <https://doi.org/10.1007/s13199-020-00701-z>

CARVALHO, E. X.; MENEZES, R. S. C.; FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SIMÕES NETO, D. E.; TABOSA, J. N.; PRIMO, D. C.; QUEIROZ, R. O. The ¹⁵N natural abundance technique to assess the potential of biological nitrogen fixation (BNF) in some important C4 grasses. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, p. 1559-1564, 2017. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.12.pne729>.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira – Grãos**. Safra 2021/22, 5º Levantamento, 2022. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>

Da SILVA, H. J. T.; SANTOS, P. F. A.; NOGUEIRA JUNIOR, E. C.; VIAN, C. E. F. Aspectos técnicos e econômicos da produção de etanol de milho no Brasil. **Revista da Política Agrícola**, n. 4, 2020.

De MORAIS, R. F.; QUESADA, D. M.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Contribution of biological nitrogen fixation to Elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Plant and Soil**, v. 356, p. 23–34, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0944-2>

ERCOLE, T. G.; SAVI, D. C.; ADAMOSKI, D.; KAVA, V. M.; HUNGRIA, M.; GALLI-TERASAWA, L. V. Diversity of maize (*Zea mays* L.) rhizobacteria with potential to promote plant growth. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 52, p. 1807–1823, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00596-y>

FERREIRA NETO, R. A.; FREITAS, A. D. S.; GIONGO, V.; CAMARGO, P. B.; MENEZES, R. S. C.; SAMPAIO, E. V. S. B. Poaceae and Leguminosae fixation in a green manure experiment in the Brazilian semiarid region. **Australian Journal of Crop Science**, v. 11, p. 1559-1564, 2017. <https://doi.org/10.21475/ajcs.17.11.12.pne729>

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SANTOS, C. E. R. E S. Abundância natural do ¹⁵N para quantificação da fixação biológica do nitrogênio em plantas. In: FIGUEIREDO, M. V. B. et al. (Eds.). **Biotecnologia Aplicada à Agricultura - Textos de apoio e Protocolos Experimentais**. Brasília: p. 505–518., 2010

FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; SILVA, A. F. Yield and biological nitrogen fixation of cowpea varieties in the semi-arid region of Brazil. **Biomass & Bioenergy**, v. 45, p. 109-114, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.05.017>

HARA, S.; MORIKAWA, T.; WASAI, S.; KASAHARA, Y.; KOSHIBA, T.; YAMAZAKI, K.; FUJIWARA, T.; TOKUNAGA, T.; MINAMISAWA, K. Identification of nitrogen-fixing *Bradyrhizobium* associated with roots of field-grown sorghum by metagenome and proteome analyses. **Frontiers in Microbiology**, 2019. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00407>

JUNK, G.; SVEC, H. J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 14, n. 3, p. 234–243, 1958. [https://doi.org/10.1016/0016-7037\(58\)90082-6](https://doi.org/10.1016/0016-7037(58)90082-6)

KUAN, K. B.; OTHMAN, R.; ABDUL RAHIM, K.; SHAMSUDDIN, Z. H. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Inoculation to Enhance Vegetative Growth, Nitrogen Fixation and Nitrogen Remobilisation of Maize under Greenhouse Conditions. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1-19, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152478>

LEDGARD, S. F.; FRENEY, J. R.; SIMPSON, J. R. Variations in natural enrichment of ^{15}N in the profiles of some Australian pasture soils. **Australian Journal of Soil Research**, v. 22, n. 2, p. 155-164, 1984.

LI, Y.; LI, Q.; GUAN, G. CHEN, S. Phosphate solubilizing bacteria stimulate wheat rhizosphere and endosphere biological nitrogen fixation by improving phosphorus content. **Plant Biology**, 2020. <https://doi.org/10.7717/peerj.9062/supp-1>

LIU, Z.; GAO, F.; LIU, Y.; YANG, J.; ZHEN, X.; LI, X., Li, X. Timing and splitting of nitrogen fertilizer supply to increase crop yield and efficiency of nitrogen utilization in a wheat-peanut relay intercropping system in China. **The Crop Journal**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2018.08.006>

LIU, H.; ZHANG, L.; MENG, A.; ZHANG, J.; XIE, M.; QIN, Y.; QIU, L. Isolation and molecular identification of endophytic diazotrophs from seeds and stems of three cereal crops. **PLOS ONE**, v. 12, n. 10, e0187383, 2017a. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187383>

LIU, H.; CARVALHAIS, L. C.; CRAWFORD, M.; SINGH, E.; DENNIS, P. G.; PIETERSE, C. M. J.; SCHENK, P. M. Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017b. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02552>

MARINI, D.; GUIMARÃES, V. F.; DARTORA, J.; LANA, M. C.; PINTO JÚNIOR, A. S. Growth and yield of corn hybrids in response to association with *Azospirillum brasilense* and nitrogen fertilization. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 62, n. 1, p. 117-123, 2015.

MENDONÇA, L. A. R.; FRISCHKORN, H.; SANTIAGO, M. F.; CAMARGO, P. B.; LIMA, J. O. G.; FILHO, J. M. Identificação de mudanças florestais por ^{13}C e ^{15}N dos solos da Chapada do Araripe, Ceará. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 314–319, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662010000300012>

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

PITTOL, M.; DURSO, L.; VALIATI, V. H.; FIUZA, L. M. Agronomic and environmental aspects of diazotrophic bacteria in rice fields. **Ann Microbiology**, v. 66, p. 511–527, 2015. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1154-6>

RESENDE, A. V.; COELHO, A. M.; SANTOS, F. C.; LACERDA, J. J. J. **Fertilidade do Solo e Manejo da Adubação NPK para Alta Produtividade de Milho no Brasil Central**. Embrapa Milho e Sorgo, 12 p., 2012 (Circular técnica 181).

SANTANA, S. R. A.; VOLTOLINI, T. V.; ANTUNES, G. R.; SILVA, V. M.; SIMÕES, W. L.; MORGANTE, C. V.; FREITAS, A. D. S.; CHAVES, A. R. M.; AIDAR, S. T.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Inoculation of plant growth-promoting bacteria attenuates the negative effects of drought on sorghum. **Archives of Microbiology**, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-01810-5>

SANTOS, C. L. R.; ALVES, G. C.; MACEDO, A. V. M.; GIORI, F. G.; PEREIRA, W.; URQUIAGA, S.; REIS, V. M. Contribution of a mixed inoculant containing strains of *Burkholderia* spp. and *Herbaspirillum* ssp. to the growth of three sorghum genotypes under increased nitrogen fertilization levels. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 96-106, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.02.008>

SCHULTZ, N.; PEREIRA, W.; REIS, V. M.; URQUIAGA, S. S. Produtividade e diluição isotópica de ¹⁵N em cana-de-açúcar inoculada com bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 9, p. 1594–1601, 2016. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2016000900059>

SHEARER, G.; KOHL, D. N₂-Fixation in Field Settings: Estimations Based on Natural ¹⁵N Abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 13, n. 6, 699-756, 1986. <https://doi.org/10.1071/pp9860699>

SILVA, E. R.; ZOZ, J.; OLIVEIRA, C. E. S.; ZUFFO, A. M.; STEINER, F.; ZOZ, T.; VENDRUSCOLO, E. P. Can co-inoculation of *Bradyrhizobium* and *Azospirillum* alleviate adverse effects of drought stress on soybean (*Glycine max* L. Merrill)? **Archives of Microbiology**, v. 201, p. 325–335, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00203-018-01617-5>

SIMÃO, E. P.; RESENDE, A. V.; GONTIJO NETO, M. M.; SILVA, A. F.; GODINHO, V. P. C.; GALVÃO, J. C. C.; BORGHI, E.; OLIVEIRA, A. C.; GIEHL, J. Nitrogen fertilization in offseason corn crop in different Brazilian Cerrado environments. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 55, e01551, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.01551>

SOUSA NETTO, M.; OLIVEIRA, F. C.; ARAÚJO, L. S.; SILVEIRA, P. M.; CUNHA, P. C. R. Épocas, formas de aplicação e doses de nitrogênio na cultura do milho em condições de Cerrado. **Colloquium Agrariae**. ISSN: 1809-8215, v. 16, n. 6, p. 56–66, 2021. Recuperado de <https://revistas.unoeste.br/index.php/ca/article/view/3381>

ULLAH, A.; MUSHTAQ, H.; FAHAD, S. H.; HAKIM; SHAH, A.; CHAUDHARY, H. J. Plant growth promoting potential of bacterial endophytes in novel association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. **Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 119–127, 2017. <https://doi.org/10.1134/S0026261717010155>

URQUIAGA, S.; XAVIER, R. P.; MORAIS, R. F.; BATISTA, R. B.; SCHULTZ, N.; LEITE, J. M.; SÁ, J. M.; BARBOSA, K. P.; RESENDE, A. S.; ALVES, B. J. R.; BODDEY, R. M. Evidence from field nitrogen balance and ^{15}N natural abundance data for the contribution of biological N_2 fixation to Brazilian sugarcane varieties. **Plant and Soil**, v. 356, n. 1–2, p. 5–21, 2012. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-1016-3>

URQUIAGA, S. S. **Fixação Biológica de Nitrogênio**, 2017. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-deacucar/arvore/CONTAG01_31_711200516717.html

4. CAPÍTULO 3: Composição qualitativa das comunidades de bactérias endofíticas de raiz e colmo do milho cultivado em região semiárida: influências do genótipo e das condições edafoclimáticas

Composição qualitativa das comunidades de bactérias endofíticas de raiz e colmo do milho cultivado em região semiárida: influências do genótipo e das condições edafoclimáticas

RESUMO

O milho é largamente cultivado em diversas regiões do globo, para consumo na alimentação humana e animal e para produção de biocombustíveis. Bactérias endofíticas estão presentes nos diversos tecidos do milho, formando interações complexas que podem resultar em aumento da produtividade da cultura. Um primeiro passo para o manejo dessas comunidades é o entendimento e a definição do microbioma das plantas. O objetivo desse trabalho foi identificar variações qualitativas entre genótipos (BRS4107, BRS4105, BR5036, BR5037) e condições edafoclimáticas dos cultivos do bacterioma endofítico do milho cultivado na região semiárida do Brasil, por meio do sequenciamento de nova geração do gene 16S rRNA presente em raízes e colmos de milho cultivado em dois municípios (Serra Talhada e Araripina) do Semiárido de Pernambuco. Os gêneros de bactérias endofíticas de maior ocorrência encontrados em raízes e colmos de milho foram *Leifsonia*, *Bacillus*, *Klebsiella* e *Streptomyces*, independentemente do genótipo da planta ou das condições edafoclimáticas do local de cultivo. A composição da comunidade de bactérias endofíticas difere entre a raiz e o colmo, tendo a raiz maior diversidade, provavelmente devido aos compostos excretados por ela. As condições edafoclimáticas do local de cultivo tem grande influência na composição das comunidades de bactérias endofíticas em plantas de milho, provavelmente porque condicionam as comunidades de micro-organismos nativas. Raízes e colmos de milho são colonizados, endofiticamente, por comunidades de bactérias que abrigam gêneros com relatos de capacidade de promoção de crescimento de plantas, como produção de fitohormônios, supressão de fitopatógenos, tolerância a fatores abióticos, solubilização de nutrientes e Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN).

Palavras-chave: Metagenômica. *Zea mays* L. Microbioma.

Qualitative composition of root and stem endophytic bacteria communities in maize cultivated in a semi-arid region: influences of genotype and edaphoclimatic conditions

ABSTRACT

Maize is widely cultivated in different regions of the world, for consumption in human and animal food and for the production of biofuels. Endophytic bacteria are present in the different tissues of maize, forming complex interactions that can result in an increase in crop productivity. A first step in managing these communities is understanding and defining the plant microbiome. The objective of this work was to identify qualitative variations between genotypes (BRS4107, BRS4105, BR5036, BR5037) and edaphoclimatic conditions of cultures of the endophytic bacteriome of maize cultivated in the semiarid region of Brazil, through the sequencing of a new generation of the 16S rRNA gene present in roots and corn stalks cultivated in two municipalities (Serra Talhada and Araripina) in the semiarid region of Pernambuco. The most frequent genera of endophytic bacteria found in corn roots and stalks were *Leifsonia*, *Bacillus*, *Klebsiella* and *Streptomyces*, regardless of the plant genotype or the soil and climate conditions of the place of cultivation. The composition of the endophytic bacterial community differs between the root and the stem, with the root having greater diversity, probably due to the compounds excreted by it. The edaphoclimatic conditions of the cultivation site have a great influence on the composition of the communities of endophytic bacteria in maize plants, probably because they condition the communities of native microorganisms. Corn roots and stalks are colonized, endophytically, by communities of bacteria that harbor genera with reports of ability to promote plant growth, such as phytohormones production, phytopathogen suppression, tolerance to abiotic factors, nutrient solubilization and Biological Nitrogen Fixation. (FBN).

Keywords: Metagenomics. *Zea mays* L. Microbiome.

4.1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é um dos principais cereais produzidos no mundo, sendo utilizado na alimentação humana e animal, além do uso como matéria prima para produção de biocombustíveis. É uma gramínea tropical que apresenta sistema fotossintético C4, caracterizado pela elevada eficiência fotossintética, e que tem alta demanda por nitrogênio (N), nutriente que comumente se torna um fator limitante para expressão de seu potencial produtivo (SILVA; Da SILVA; LIBADI, 2013). Em sistemas produtivos com alta utilização de insumos, o nutriente geralmente é disponibilizado na forma de fertilizante mineral (TILMAN et al., 2011), sujeito à baixa eficiência de uso pelas plantas e potencial causador de impactos ambientais deletérios, em sua fabricação assim como por meio de processos de perdas (STEHFEST; BOUWMAN, 2006). Em sistemas com baixa utilização de insumos, geralmente não são utilizados fertilizantes nitrogenados, ficando a cultura dependente, principalmente, da mineralização da matéria orgânica do solo ou da biomassa de leguminosas consorciadas ou cultivadas previamente. Assim como ocorre em plantas de outras famílias, as gramíneas possuem em suas estruturas nichos ocupados por micro-organismos que formam uma grande e complexa interação e que estabelecem benefícios, bem como interações neutras ou prejudiciais. Estes nichos se localizam na rizosfera (solo próximo à raiz), no rizoplano (superfícies da raiz) e na endosfera (tecidos internos da planta) (TURNER; JAMES; POOLE, 2013). Bactérias endofíticas estão presentes em raízes, caules, folhas, flores e frutos, podendo apresentar diversos mecanismos de promoção de crescimento de plantas como fixação biológica de nitrogênio (FBN), produção de substâncias promotoras do crescimento (ex. ácido indol-3-acético), solubilização de fosfatos inorgânicos e promoção de efeito antagônico contra fitopatógenos (ANDRADE et al., 2014; ULLAH et al., 2017). Quando ocorrem endofiticamente em gramíneas, bactérias promotoras de crescimento de plantas (BPCP) não causam danos e não condicionam a formação de sinais externos ou estruturas visíveis no hospedeiro (MITTER et al., 2017; ALIBRANDI et al., 2020).

As BPCP podem apresentar um potencial para melhorar a eficiência de produção vegetal, por isso é importante entender quais as variáveis que podem modular as interações simbióticas e associativas entre a planta e os microrganismos (SACHS; SKOPHAMMER; REGUS, 2011). Um primeiro passo para esse entendimento é a definição clara do que é um microbioma de raiz e colmo. Para se ter uma ideia, segundo Berg et al. (2015), a área de uma folha pode ter um número muito menor de micro-organismos em relação a diversidade da rizosfera mesmo que esta possua uma rica e diversificada microbiota, porém, em determinados

compartimentos da planta, a comunidade presente desenvolve mecanismos específicos para interagir nestes locais. Com estas interações, os micro-organismos podem modular a resposta da imunidade inata da planta e que são conhecidos como endosfera (LUNDBERG et al, 2012; ANDREOTE; GUMIERE; DURRER, 2014).

É fato que as plantas se beneficiam de muitas funções de seus microbiomas específicos (SANTOS; OLIVARES, 2021). As plantas investem uma boa parte de suas fontes de carbono na formação e manutenção da microbiota. Moe (2013) afirma que plantas com diferentes genótipos podem liberar compostos com diferentes composições promovendo microrganismos com sinalizações e colonizações específicas. Dessa forma, genótipos distintos se comportam de forma diferente em relação ao metabolismo da raiz, quanto à composição de exsudatos radiculares e suas respostas aos sistemas de reconhecimento e imunidade inata (BULGARELLI et al., 2015). Variações desta natureza podem alterar a estrutura e a atividade do microbioma e, consequentemente, atuar no crescimento, nutrição e resistência a estresses bióticos e abióticos.

Além dos efeitos dos genótipos, fatores bióticos e abióticos afetam diretamente a microbiota das plantas e a composição de qualquer órgão vegetal, tanto acima quanto abaixo do nível do solo (FIERER, 2017; HARDOIM et al., 2015). Os microrganismos que estão fortemente associados a uma determinada planta, espécie ou genótipo, independente do solo e das condições ambientais, são definidos como o microbioma central da planta (TOJU et al., 2018). Interessantemente, alguns táxons microbianos que ocorrem em baixa abundância em um número reduzido de sítios são chamados de táxons satélites (MAGURRAN; HENDERSON, 2003). Táxons satélites podem ser definidos com base na distribuição geográfica, abundância local e especificidade de habitat (JOUSSET et al., 2017). A importância dos táxons satélites está sendo cada vez mais reconhecida, sendo considerados impulsionadores com função chave para o ecossistema. Estudos recentes demonstraram que táxons satélites ocorrendo em baixa abundância são essenciais para a redução de microrganismos invasores indesejados nas comunidades do solo (MALLON et al., 2015).

O uso de alternativas biotecnológicas para aumentar a produtividade e aliviar estresses bióticos e abióticos em cultivos é a inoculação das plantas com BPCP, capazes de promover efeitos positivos de crescimento na planta. No entanto, a microbiota naturalmente associada às plantas desempenha papel importante no estabelecimento de bactérias inoculadas, assim, para o sucesso da inoculação é importante o estudo aprofundado da composição total e funcional do microbioma, de suas variações de acordo com fatores bióticos e abióticos e de suas respostas à diferentes práticas de manejo. Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo

identificar variações qualitativas (entre genótipos e condições edafoclimáticas dos cultivos) do bacterioma endofítico em diferentes tecidos (raiz e colmo) de milho cultivado na região semiárida do Brasil, por meio de análise metagenômica do gene 16S rRNA.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Caracterização dos locais e desenho experimental

Foram instalados dois experimentos em campo, em estações experimentais do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizadas nos municípios de Araripina e Serra Talhada, ambos situados no Semiárido do Brasil. Os solos das áreas experimentais são de classes diferentes, com menor fertilidade em Araripina, local em que as temperaturas são ligeiramente mais amenas, em consequência da altitude (Tabela 9). As diferenças edafoclimáticas entre os dois municípios refletem-se no tipo de vegetação nativa. Em Serra Talhada a vegetação nativa é uma floresta tropical seca decídua, localmente chamada de caatinga, enquanto que em Araripina a vegetação original é uma transição entre caatinga e savana (cerrado). O solo de Araripina apresenta-se enriquecido em ^{15}N e empobrecido em ^{13}C em relação aos solos de Serra Talhada (Tabela 10), indicando a uma maior abertura do ciclo do N, com condições edafoclimáticas (Tabela 9) que condicionam maior predominância de processos de perdas em Araripina, e um histórico de cultivo com gramíneas C4 mais antigo em Serra Talhada (De FREITAS et al., 2015).

Tabela 9: Caracterização edafoclimática das áreas experimentais

PARÂMETRO	SERRA TALHADA	ARARIPINA
Latitude	07°59'00"S	7°27'50"S
Longitude	38°19'16"W	40°24'38"W
Altitude (m)	500	828
Precipitação (mm)	709	713
Temperatura máxima (°C)	35,9	32,7
Temperatura mínima (°C)	17,2	12,8
Temperatura média (°C)	24,5	22,9
Umidade relativa média (%)	50	55,2
Evaporação potencial (mm)	1314	1139
Tipo de solo	Argissolo amarelo, Eutrófico	vermelho equivalente Latossolo vermelho amarelo Distrófico
Topografia	Plana	Plana

Os dois experimentos adotaram um delineamento em blocos casualizados, com 4 repetições, sendo que os tratamentos consistiram em quatro genótipos de milho (BRS 4107, BRS 4105, BR 5036 e BR 5037). Os experimentos foram conduzidos durante a estação chuvosa, sob condição de sequeiro, e não houve a inoculação prévia de bactérias selecionadas. A parcela experimental foi constituída de 4 fileiras de 4 m de comprimento, espaçadas de 0,80 m, nas quais o milho foi semeado em covas espaçadas de 0,20 m. Como área útil da parcela foram utilizadas as duas fileiras centrais, desprezando-se 1 m em cada extremidade, para evitar o efeito bordadura.

Tabela 10: Caracterização química e física dos solos das áreas experimentais

Local	Serra Talhada			Araripina		
	0-20	20-40	40-60	0-20	20-40	40-60
Camada (cm)	0-20	20-40	40-60	0-20	20-40	40-60
pH (H ₂ O)	6,5	6,4	6,9	4,4	4,4	4,6
N (%)	0,06	0,04	0,02	0,12	0,09	0,06
δ ¹⁵ N (‰)	10,57	9,25	8,90	16,73	17,16	16,93
C (%)	0,71	0,50	0,27	1,67	1,40	0,99
δ ¹³ C (‰)	-17,78	-18,10	-17,20	-25,01	-24,96	-24,42
C:N	11,8	12,5	13,5	13,9	15,5	16,5
P (mg/dm ³)	98,7	90,0	86,0	2,0	1,0	1,0
Ca ²⁺ (cmolc/dm ³)	2,3	2,9	2,3	0,4	0,3	0,2
Mg ²⁺ (cmolc/dm ³)	1,7	1,9	1,2	0,5	0,6	0,5
Na ⁺ (cmolc/dm ³)	0,1	0,1	0,3	0,0	0,0	0,0
K ⁺ (cmolc/dm ³)	0,9	0,5	0,4	0,0	0,0	0,0
Al ³⁺ (cmolc/dm ³)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
H ⁺ (cmolc/dm ³)	1,2	0,5	0,5	2,8	2,2	1,5
S (cmolc/dm ³)	5,0	5,4	4,1	1,0	0,9	0,7
CTC (cmolc/dm ³)	6,1	5,9	4,6	4,3	3,8	2,7
V (cmolc/dm ³)	81,0	91,7	89,7	23,3	25,0	25,7
m (cmolc/dm ³)	0,0	0,0	0,0	34,3	38,3	42,3
Dap (g/cm ³)	1,4	1,4	1,4	1,3	1,4	1,3
Dr (g/cm ³)	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6
Areia grossa (%)	31,7	38,3	38,7	53,3	53,3	48,7
Areia fina (%)	43,0	41,0	43,0	26,0	23,7	26,3
Silte (%)	15,3	10,7	8,3	4,0	2,3	3,0
Argila (%)	10,0	10,0	10,0	16,7	20,7	22,0

Amostras de solo deformadas foram coletadas para a caracterização das propriedades químicas e físicas (Tabela 10) das áreas onde os experimentos foram conduzidos. O manejo da correção e adubação do solo foi realizado de acordo com a análise química do solo de cada área. Nos dois experimentos foram utilizados 70 kg ha⁻¹ de ureia, sendo 30 kg ha⁻¹ em fundação, pouco antes da semeadura, e 40 kg ha⁻¹ em cobertura, aos 40 dias após a semeadura. Em

Araripina foram aplicados 30 kg ha⁻¹ de super fosfato simples (SFS, Ca(H₂PO₄)₂ + CaSO₄. 2H₂O) e 30 kg ha⁻¹ de cloreto de potássio (KCl), ambos em fundação. Em Serra Talhada, foram aplicados 10 kg ha⁻¹ de SFS e 20 kg ha⁻¹ de KCl.

4.2.2 Amostragem do material vegetal e esterilização superficial

Em 3 parcelas experimentais de cada experimento, foram coletadas 5 plantas, das quais foram coletadas subamostras de raízes e colmos, formando amostras compostas para cada genótipo. Ainda no local da coleta, as amostras foram estocadas em frascos estéreis contendo sílica gel, que foram posteriormente transportados para o laboratório e armazenados em temperatura ambiente até o início do processamento. Em laboratório, o material vegetal foi reidratado por 1 hora em água mineral estéril e, em seguida, foi realizada a esterilização superficial, pela imersão em etanol 70%, por 1 min, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio a 2.5% por 1 min. Após a desinfestação, as amostras foram lavadas com água destilada estéril por 5 vezes. No total, foram analisadas 48 amostras, originadas de 3 repetições de dois compartimentos (raiz e colmo) de cada um dos 4 genótipos, cultivados em dois locais diferentes.

4.2.3 Extração do DNA total das amostras

A lise celular do tecido vegetal foi realizada pelo processo de maceração com almofariz autoclavado e nitrogênio líquido. O DNA total foi extraído separadamente de cada amostra usando o kit Qiagen DNeasy (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA resultantes foram verificadas quanto à integridade por eletroforese em um gel de agarose a 1% e armazenadas a -20° C. O DNA total extraído estava com uma conformação de três bandas, mostrando os diferentes níveis de condensação do DNA.

4.2.4 Preparação da biblioteca, amplificação e sequenciamento do DNA no Illumina MiSeq.

A preparação da biblioteca foi feita de acordo com a metodologia do Illumina (AMPLICON, CLEAN-Up; INDEX 2013). As sequencias de genes usadas foram das regiões hipervariáveis V3 e V4 do gene 16S rRNA produzindo um amplicon de aproximadamente 460pb. O protocolo Illumina inclui sequencias de adaptadores que foram anexados as

sequencias dos pares de primers para obter a compatibilidade com os indexes e o sequenciamento. As sequencias dos primers genes específicos usados neste protocolo foram:

Forward	Primer	=	5'
TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG,			
Reverse	Primer	=	5'
GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTA			

ATCC (KLINDWORTH; PRUESSE; SCHWEER; PEPLLES; QUAST et al. (2013). A reação em cadeia da polimerase (PCR) que amplificaram estas regiões foi realizada para cada amostra de DNA usando estes primers unidos a uma sequência identificadora multiplex, seguindo os protocolos padrão recomendados pelo fabricante. Para cada amostra, amplicons foram gerados em várias PCR replicadas usando uma mistura (25µL) contendo 5 µL de cada primers com concentração de 1µM, de 2X KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Kapa Biosystems, Wilmington, MA USA), e 5 ng/µL do DNA molde. O programa de PCR consistiu numa desnaturação inicial de 95 °C por 3 min; 25 ciclos de 95 °C por 30 seg; 55 °C por 30 seg; 72 °C por 30 seg de extensão e 72 °C por 5 min de extensão final. Os amplicons do mesmo tratamento foram agrupados para reduzir a variabilidade da PCR e purificados usando AMPure XP beads (Beckman Coulter, IN USA) de acordo com a instrução do fabricante. Após a limpeza da PCR, foi realizada uma quantificação usando o Qubit 4.0 ((Thermo Fisher Scientific). A mistura contendo Nextera Index Primers 1 e 2 (5µL) por amostra, 2× KAPA HiFi Hotstart ReadyMix (25 µl), DNA (5 µl) and PCR água ultra pura (10 µl) para um total volume de 50 µl. O programa de PCR neste passo consistiu numa desnaturação inicial de 95 °C por 3 min, seguido de 8 ciclos of desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s e extensão a 72 °C por 30 s, e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os amplicons foram limpos como descrito previamente. Após a limpeza, a biblioteca de amplicons foram quantificadas usando Qubit 4.0, visualizadas em gel de agarose 2% e coradas com SybrGold, observou-se a presença de dímeros e tivemos que fazer uma nova limpeza usando a concentração de beads a 0.6X para eliminar os dímeros e requantificou os amplicons e observamos o desaparecimento dos dímeros na biblioteca. A biblioteca foi quantificada, normalizada e agrupada. A concentração final da biblioteca desnaturada de 20 pM foi de 8 pM e usou a solução de Pre-chilled HT1 e como controle foi usado 5% de Phix a 4nM e sequenciada no illumina MiSeq da plataforma do Laboratório de bioinformática e biologia Evolutiva – LABBE, Departamento de Genética – Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal de Pernambuco.

4.2.5 Análise de Bioinformática de Sequências Metabarcodificadoras

Com os dados obtidos, as amostras foram separadas em dois modelos (Tabela 11) para análises de Bioinformática, isso foi necessário devido a qualidade do material genético obtido nas extrações e amplificações, sendo excluídas das análises aquelas que apresentaram um baixo número de sequências. No MODELO I foi usado genótipos versus tecidos, ou seja, a influência da genética no tecido estudado, no caso raiz e colmo cultivados em Serra Talhada.

No MODELO II, foi usado a análise da genótipos versus local de plantio, ou seja, a influência do local em função da área plantada. Foram utilizados somente os dados da raiz de dois genótipos (BR 5036 e BR 5037) das duas localidades onde os experimentos foram instalados (Araripina e Serra Talhada), e a análise feita para esse Modelo foi a comparação entre Genética x Local.

Tabela 11: Amostras dos genótipos/órgãos estudados em cada MODELO

Nome da amostra	Localização	Genótipos	Órgãos
MODELO I			
G1.R	Serra Talhada	BRS4107	Raiz
G3.R	Serra Talhada	BRS4105	Raiz
G6.R	Serra Talhada	BR 5036	Raiz
G7.R	Serra Talhada	BR 5037	Raiz
G1.C	Serra Talhada	BRS4107	Colmo
G3.C	Serra Talhada	BRS4105	Colmo
G6.C	Serra Talhada	BR 5036	Colmo
G7.C	Serra Talhada	BR 5037	Colmo
MODELO II			
G6.A	Araripina	BR 5036	Raiz
G7.A	Araripina	BR 5037	Raiz
G6.ST	Serra Talhada	BR 5036	Raiz
G7.ST	Serra Talhada	BR 5037	Raiz

4.2.6 Análise de Bioinformática

As sequências brutas de DNA, extraídas das amostras de milho, foram processadas usando o *software* Mothur v.1.44.3 (SCHLOSS et al., 2009) com o objetivo de avaliar e analisar a diversidade bacteriana total das amostras. As sequências *forward* e *reverse* foram combinadas, a partir do comando *make.contigs()*. Posteriormente, foram cortadas por meio do comando *screen.seqs()*, removendo sequências fora da faixa de 440-465 nucleotídeos, com qualquer

ambiguidade e/ou com um número maior que 8 homopolímeros. Por meio do comando *unique.seqs()*, as sequências de características idênticas foram agrupadas. Em seguida, as mesmas foram alinhadas com a base de dados SILVA 138.1 após um PCR virtual performedo com os *primers* 341F-805R. O alinhamento resultante foi submetido aos comandos *screen.seqs()* e *filter.seqs()* para remover sequências de mau alinhamento e colunas pouco informativas. Com isso, as sequências foram sujeitas ao comando *pre-cluster()*, com o parâmetro “*diff=2*”. As sequências quiméricas foram detectadas e removidas a partir do método *chimera.vsearch()*, com parâmetro “*dereplicate=T*”. A classificação foi feita usando a base de dados RDP v.18 (julho, 2020) como referência, empregando 80% de limite de confiança, e aqueles classificados como cloroplastos, mitocôndrias, Archaea, Eukarya ou desconhecidos foram retirados. As demais sequências de alta qualidade foram agrupadas em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) usando *dist.seqs()*, seguido pelo comando *cluster()* com um corte de dissimilaridade de sequência de 3%; todos os *singletons* foram removidos por meio do comando *split.abund()*. A normalização de sequências foi aplicada, separadamente, nos dois *datasets* (4.126 sequências), através do método *sub.sample()*, visando manter ao máximo o desenho experimental original e a qualidade no número das sequências. Com isso, cada *dataset* foi organizado, de forma distinta, em uma matriz de abundância de OTUs, por meio da função *make.shared()*. A partir desse ponto, foram gerados índices de alfa diversidade, curva de rarefação e abundância relativa das classificações taxonômicas. Tais dados de cada conjunto foram exportados do Mothur, a fim de serem aplicados nas análises de estatísticas.

4.2.7 Análises Estatísticas

Utilizando o *software* Past v4.06 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001), as análises estatísticas referentes à abundância relativa de táxons e índices de alfa diversidade foram realizadas através do método ANOVA de duas vias, onde os fatores foram genética e localidade. O teste de normalidade foi realizado em ambos *datasets*, pelo método de Shapiro-Wilk. Para analisar a beta diversidade dos *datasets*, um escalonamento multidimensional não métrico (nMDS) foi feito a partir da matriz de OTUs, utilizando o índice de dissimilaridade de Bray-Curtis, juntamente com os metadados registrados na coleta das amostras. Para confirmação estatística dos nMDSs, foi realizada uma PERMANOVA de duas vias. No *software* R, a homocedasticidade dos dados foi verificada por meio do teste de Levene. O teste de Tukey foi

aplicado em dados com resultado homocedástico; já dados heterocedásticos foram submetidos ao teste de Games-Howell.

Uma análise discriminante linear de tamanho de efeito (LEfse) foi realizada visando identificar organismos indicadores de comunidade, bem como explicar diferenças de táxons apontados em cada par de fatores. A análise foi feita utilizando a matriz de OTUs, exportada do Mothur, como entrada para o *software* LEfSE (SEGATA et. al., 2011), hospedado no Huttenhower lab Galaxy server (disponível em: <http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>).

Por fim, através do *software* Cytoscape (SHANNON et al., 2003) em conjunto com o *plugin* CoNet (FAUST; RAES, 2016), redes de coocorrência foram geradas utilizando os métodos de correlação de Pearson e Spearman, juntamente com a dissimilaridade de Bray-Curtis, para o cálculo de distância das linhas de interações, aplicadas à matriz de OTUs. Para montagem das redes finais também foram utilizadas, em conjunto com a correção de Bonferroni, matrizes de randomização com *scores* de *bootstrap* e permutação. Além disso, visando manter uma alta qualidade nas redes, as linhas de interação que se encontravam fora da distribuição de *bootstrap* e permutação foram filtradas.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Diversidade de bactérias endofíticas em raízes e colmo de quatro genótipos de milho cultivados em Serra Talhada

De acordo com a curva de rarefação (S1) referente ao Modelo 1, mostrou que 4126 sequências foram suficientes para se cobrir a diversidade alfa presente nos genótipos de milho e os órgãos raiz e colmo na região de Serra Talhada, sertão de Pernambuco. Dos genótipos estudados, o que maior número de OTUs foi o genótipo BR 5037 para a raiz mostrando ter uma cobertura de diversidade alfa maior que os demais genótipos e também em relação ao colmo desse genótipo, entretanto, vale ressaltar que, o número de classificação taxonômica ou de indivíduos conseguem chegar à exaustão. O número de OTUs dá uma estimativa de espécies. Para o Modelo II a curva de rarefação (S2) também mostrou que 4126 sequências foram suficientes para se fazer a cobertura da diversidade alfa dessas amostras.

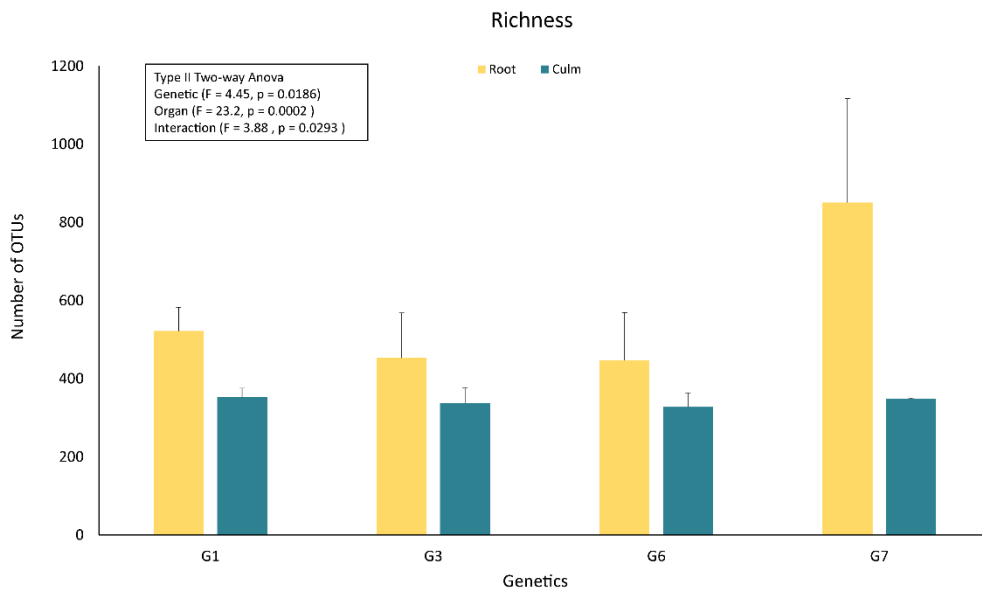
A diversidade alfa de bactérias endofíticas entre os diferentes genótipos (BRS 4107, BRS 4105, BR 5036 e BR 5037) de milho cultivados em Serra Talhada (Figura 1.A) foram significativamente diferentes (teste de Richness, $p = 0,0186$), considerando a riqueza de

espécies nas amostras. Em todos os genótipos avaliados, a quantidade de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) foi superior a 300, com destaque para o genótipo BR 5037, que apresentou maior diversidade alfa. Ainda de acordo com esse índice, a alfa diversidade de bactérias endofíticas entre os diferentes tecidos (raiz e caule) também foi significativamente diferente ($p = 0,0002$), assim como a interação entre genótipos e tecidos da planta ($p = 0,0293$). O número de OTUs de raiz foi superior ao de colmo, em todos os genótipos, e esse, por sua vez, foi similar para todos os genótipos. O genótipo BR 5037 apresentou a maior discrepância do número de OTUs entre raiz e colmo, sendo na raiz encontrado o dobro do colmo.

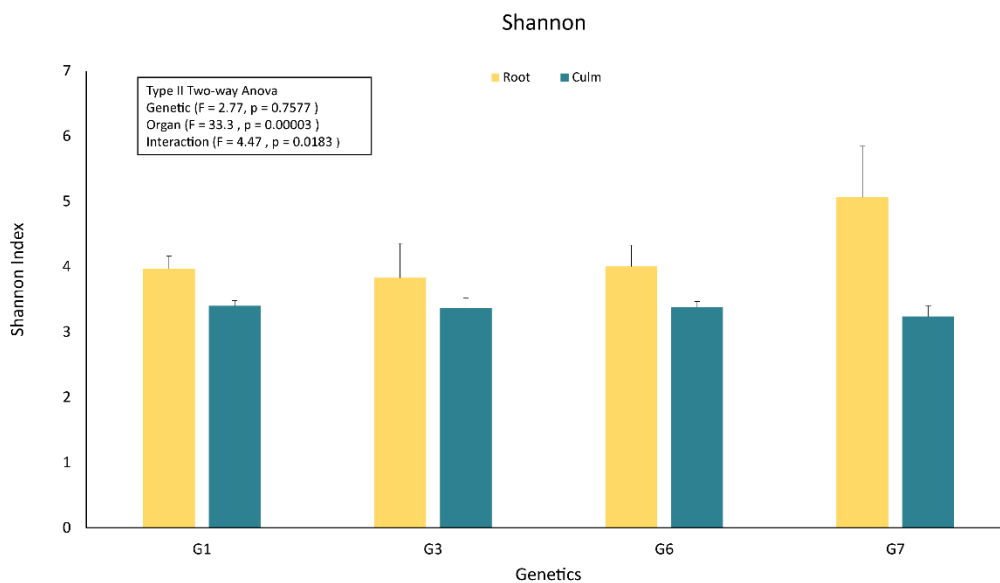
A diversidade beta, estimada pelo teste de Shannon (Figura 1.B) não variou entre os diferentes genótipos, entretanto houve diferença significativas ($p = 0,00003$) entre os tecidos e para a interação ($p = 0,0183$), com as raízes apresentando os maiores valores. Assim como no teste anterior, o genótipo BR 5037 se destacou por apresentar a maior diferença entre os compartimentos avaliados.

Figura 1: Alfa diversidade de bactérias endofíticas em diferentes genótipos e compartimentos de plantas milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (MODELO I).

(A)



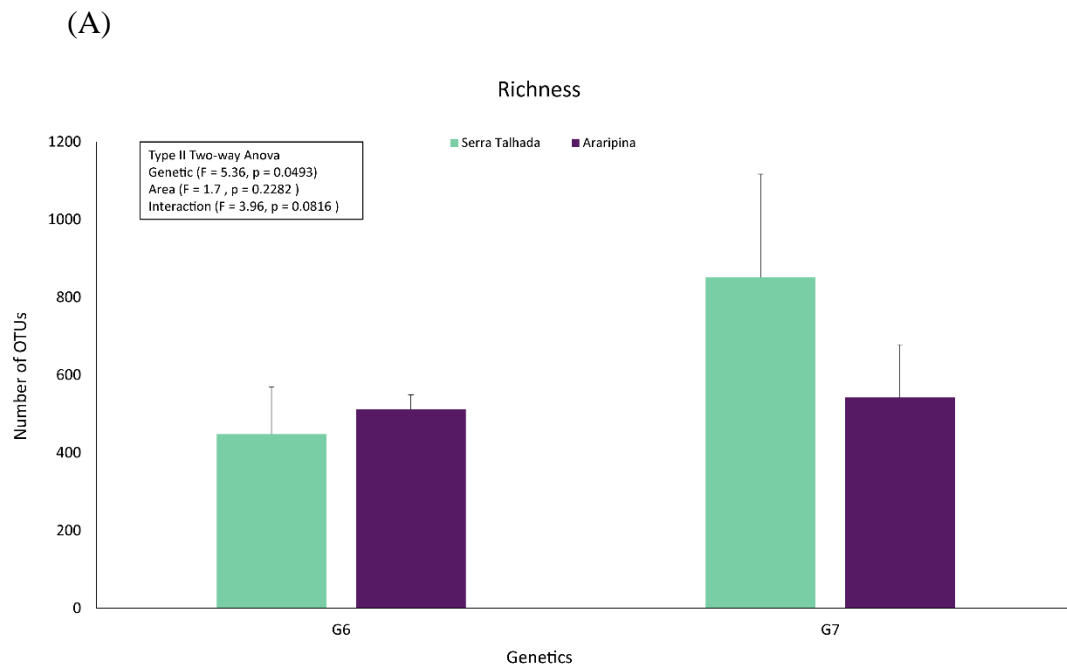
(B)

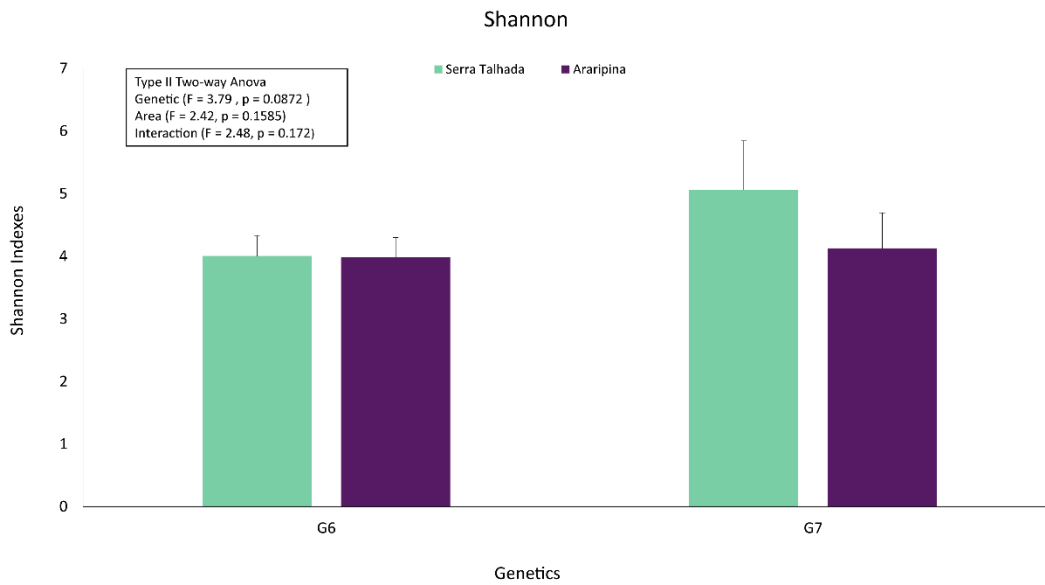


4.3.2 Diversidade de bactérias endofíticas em raízes de dois genótipos de milho cultivados em diferentes condições edafoclimáticas

A avaliação do efeito do local de cultivo sobre a diversidade de bactérias endofíticas foi feita apenas para os genótipos BR 5036 e BR 5037, devido à baixa amplificação das demais amostras. A diversidade alfa de bactérias endofíticas em raiz variou entre os dois genótipos (BR 5036 e BR 5037) de milho e de acordo com o local de cultivo (Figura 2.A) (teste de Richness, $p = 0,0493$). Em Serra Talhada, as raízes do genótipo BRS 5023 apresentaram maior diversidade, enquanto que o genótipo BR 5036 apresentou um comportamento similar para as duas localidades. A quantidade de OTUs dos tratamentos avaliados foram superiores a 400, chegando a 800 para o genótipo BR 5037 quando cultivado em Serra Talhada. Para a comparação feita entre locais de cultivo (Araripina e Serra Talhada) não houve diferenças estatísticas. Pelo teste de Shannon (Figura 2.B) não foi encontrada diferença da alfa diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho, tanto para a comparação entre os genótipos e localidades onde os cultivos ocorreram, quanto para a interação.

Figura 2: Alfa diversidade de bactérias endofíticas em diferentes genótipos e compartimentos de plantas milho cultivados em Araripina e Serra Talhas de Pernambuco, Brasil (MODELO CII).

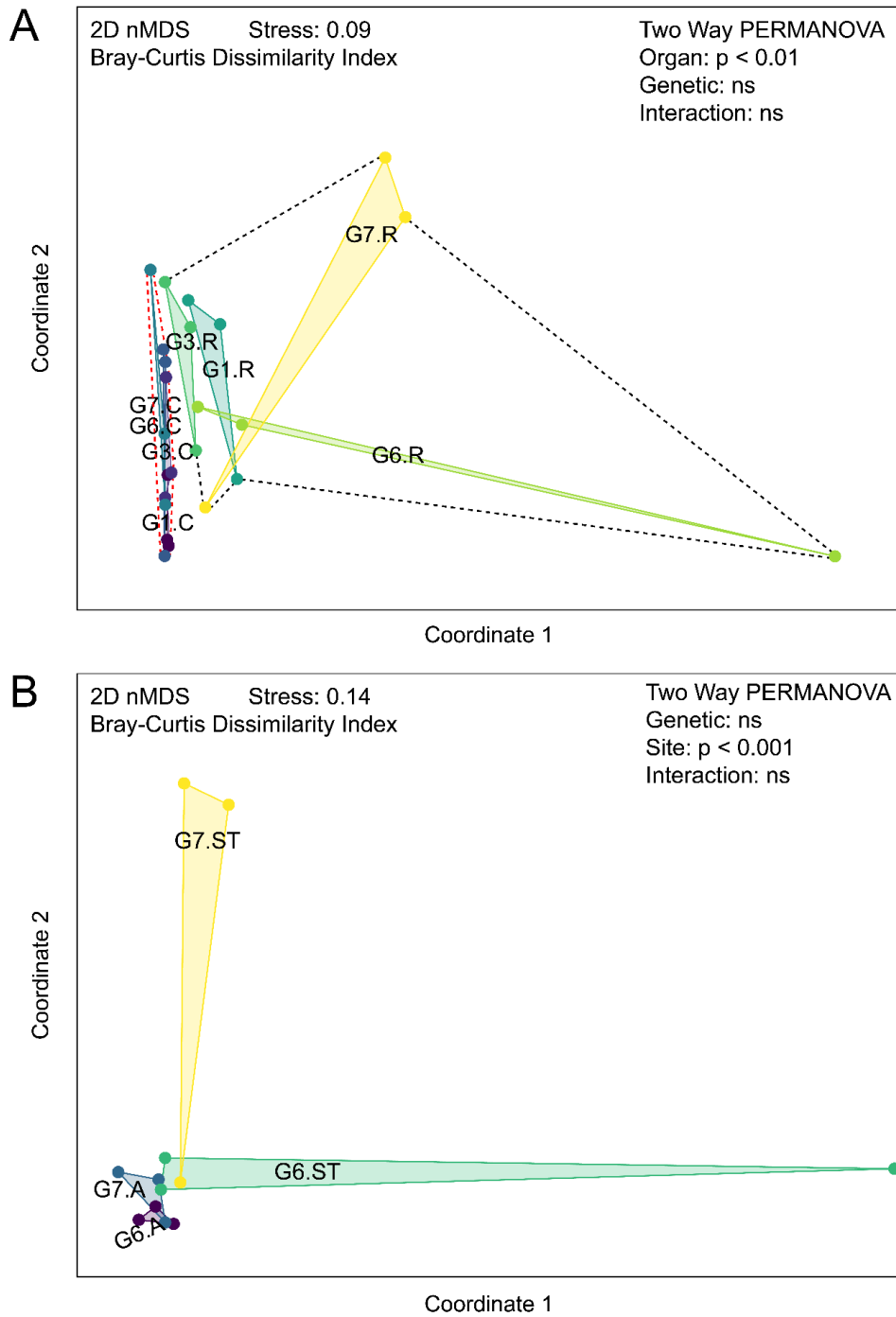




Para a beta diversidade de bactérias endofíticas em diferentes genótipos e tecidos de milho cultivados em Serra Talhada (Figura 3.A) não foi observada diferença significativa entre genótipos nem da interação. No entanto, foi observado significância entre os compartimentos (órgãos) avaliados ($p < 0,01$). Foi observado que, para o colmo ambas as variedades se agruparam, com baixa diversidade de bactérias endofíticas. Nas raízes houve maior diversidade entre as amostras, isso é refletido pela distribuição mais espaçada dos pontos dentro do plano, ocupando uma maior área. Vale destacar que os genótipos BR 5036 e BR 5037 apresentaram uma maior dispersão de seus pontos dentro desse plano.

Quando a comparação da beta diversidade foi feita em relação às duas localidades para os dois genótipos de plantas, considerando apenas um compartimento (Figura 3.B), verificou-se que não houve diferença entre os genótipos e interação não foi significativa. Já para a comparação entre locais, houve significância ($p < 0,001$), observou-se que os dois genótipos apresentaram maior diversidade quando cultivados em Serra Talhada que quando cultivados em Araripina.

Figura 3: Beta diversidade de bactérias endofíticas em diferentes genótipos e compartimentos de plantas milho cultivados em Araripina e Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (MODELOS I e II).



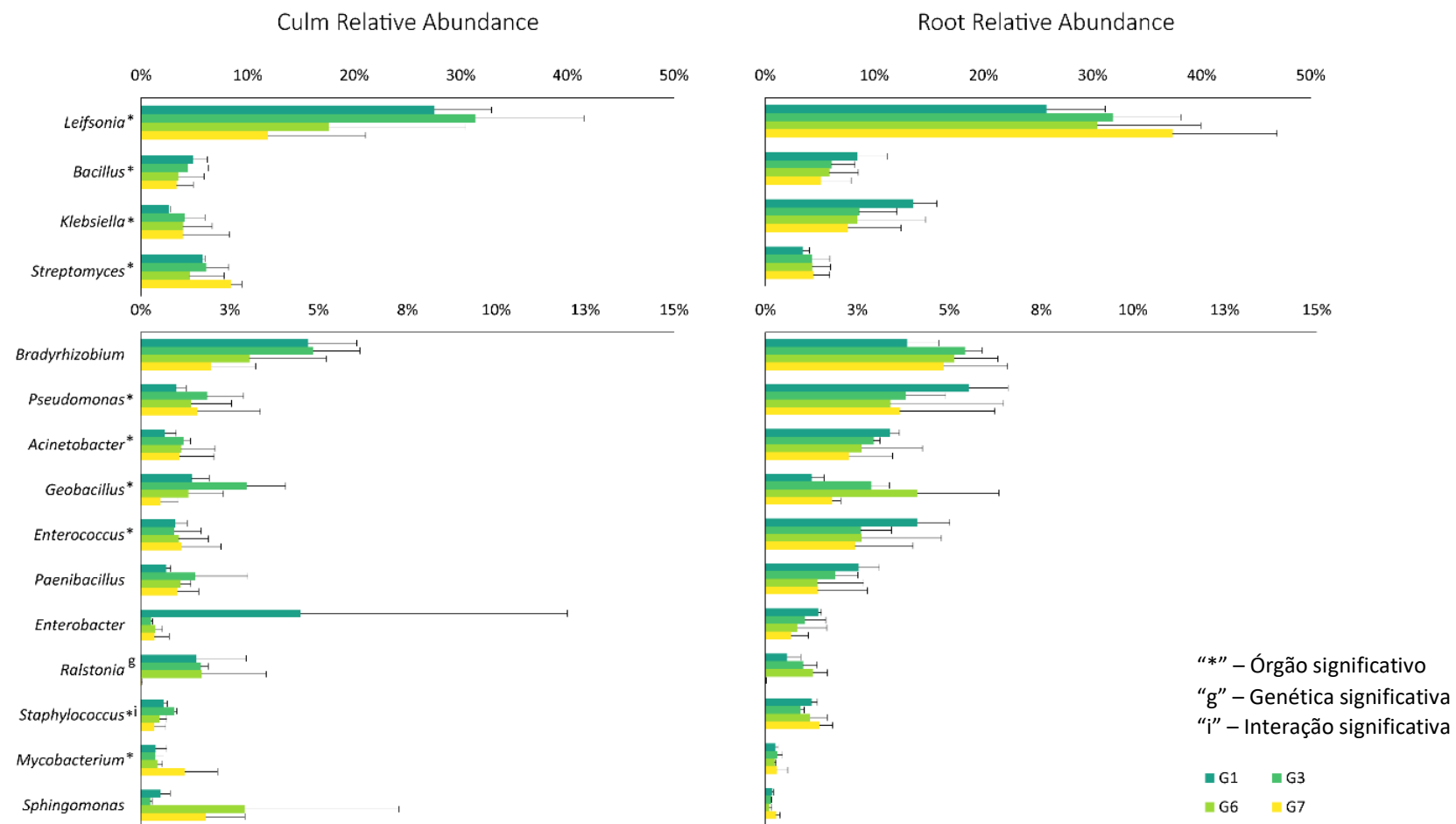
4.3.3 Abundância relativa de gêneros de bactérias endofíticas de maior presença em raízes e colmo de diferentes genótipos de milho cultivados em Serra Talhada

A classificação das unidades taxonômicas do milho cultivado em Serra Talhada é mostrada na Figura 4, na qual se observa a abundância relativa dos 15 gêneros de bactérias endofíticas mais presentes nos diferentes genótipos e compartimentos das plantas de milho. O gênero *Leifsonia* foi o mais predominante nos diferentes compartimentos das quatro variedades de milho estudadas, apresentando diferenças significativas entre os compartimentos avaliados, porém, não foi observada diferença entre genótipos e nem efeito da interação. A maior predominância desse gênero foi na raiz para ambos os genótipos, tendo uma participação de quase 40% do total de bactérias presentes na raiz do genótipo BR 5037. O gênero *Bacillus* foi o segundo mais presente nas amostras, diferindo estatisticamente entre os compartimentos, mas sem diferenças entre genótipos nem efeito da interação. A maior participação desse gênero foi na raiz para os quatro genótipos. Em terceiro lugar ficou *Klebsiella*, que apresentou diferenças de abundância relativa apenas entre os compartimentos, que foi maior na raiz que no colmo. O quarto gênero mais abundante foi *Streptomyces*, cujas abundâncias relativas foram maiores nas raízes que no colmo, nas não diferiram entre os genótipos e sem efeito da interação entre eles.

Nas amostras também foi observada a presença de *Bradyrhizobium*, *Paenibacillus*, *Enterobacter* e *Sphingomonas*, sem diferenças de abundâncias entre genótipos e locais de cultivo, assim como sem efeito da interação entre esses fatores. Em menores quantidades foi observada a presença de *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Geobacillus*, *Enterococcus* e *Mycobacterium*, todos com maior abundância relativa nas raízes para os quatro genótipos de milho.

Nesses tratamentos ainda foi observado a presença de *Rhastonia*, apresentando significância entre genótipos, estando ausente somente no genótipo BR 5037. Para a comparação entre compartimentos e interação não foi constatado significância para esse gênero. Outro gênero presente foi o *Staphylococcus*, sendo estatisticamente diferente entre compartimentos e também na interação, a comparação entre genótipos não se observou significância.

Figura 4: Abundância relativa dos 15 gêneros bactérias endofíticas de maior presença em diferentes genótipos e compartimentos de plantas milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (MODELO I).

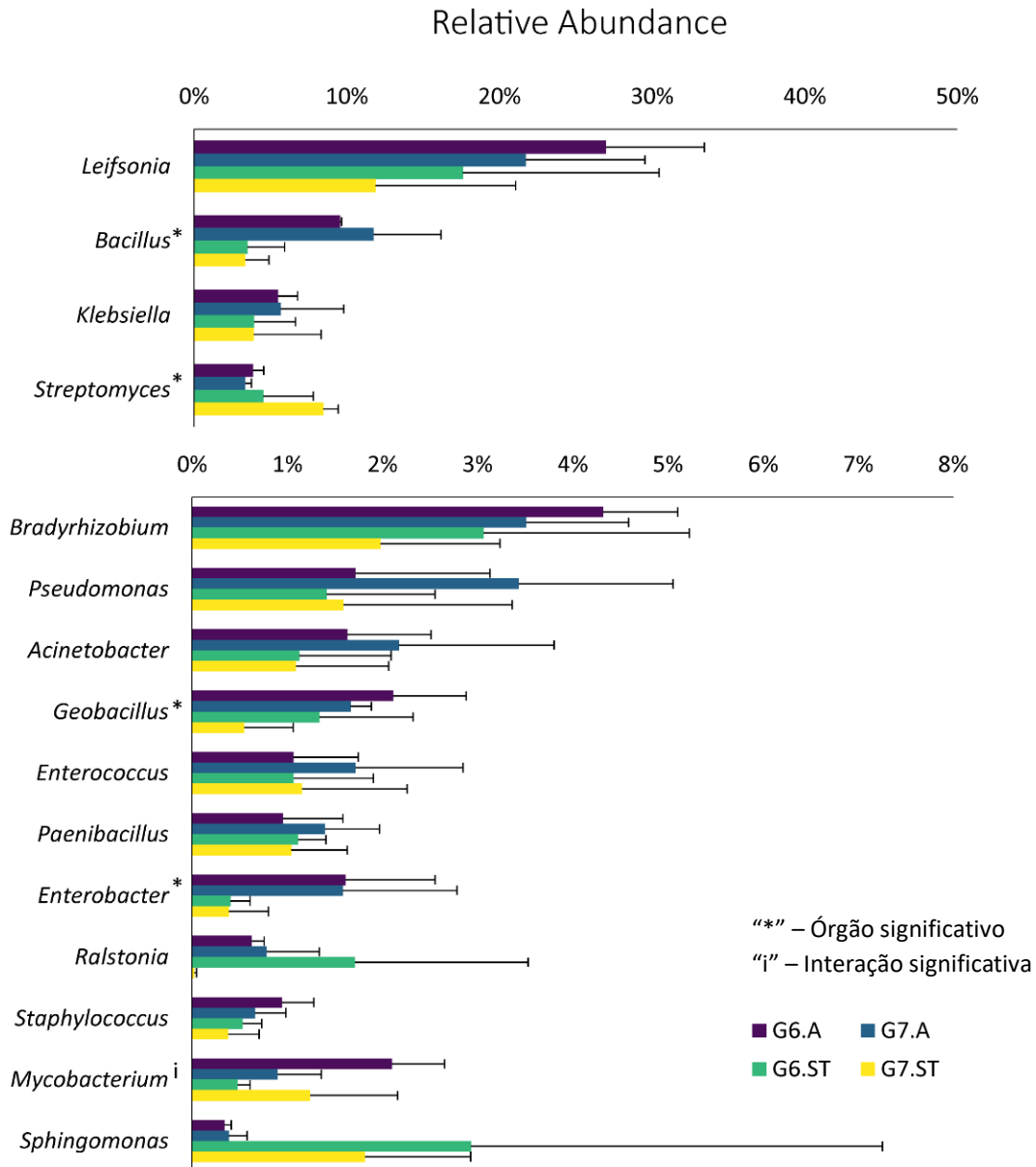


4.3.4 Abundância relativa de gêneros de bactérias endofíticas de maior presença em raízes de genótipos de milho cultivados em Araripina e Serra Talhada.

A abundância relativa dos 15 gêneros de bactérias endofíticas de maior presença em raízes de dois genótipos de milho cultivados em Araripina e Serra Talhada é mostrada na Figura 5. O gênero de maior presença nas comunidades observadas foi *Leifsonia*, com participação de quase 30% nas raízes do genótipo BR 5036 cultivado em Araripina. Não foram observadas diferenças significativas entre locais de cultivo, entre genótipos e nem houve interação entre os dois fatores. Para a ocorrência de *Klebsiella*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Enterococcus*, *Paenibacillus*, *Ralstonia*, *Staphylococcus* e *Sphingomonas* também não foram observadas diferenças estatísticas entre locais nem entre genótipos.

Para a abundância dos gêneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Geobacillus* e *Enterobacter* houve efeito dos genótipos ou do local de cultivo. Os gêneros *Bacillus* e *Enterobacter* foram mais abundantes nas raízes do milho cultivado em Araripina, para ambos os genótipos. O gênero *Streptomyces* foi mais abundante no genótipo BR 5037 cultivado em Serra Talhada; *Geobacillus*, com diferença significativa entre os locais, sendo mais abundante nos genótipos quando cultivados em Araripina.

Figura 5: Abundância relativa dos 15 gêneros bactérias endofíticas de maior presença em raiz de dois genótipos milho cultivados em Araripina e Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (MODELO II).



4.3.5 Core da microbiota presente em genótipos de milho

Na figura 6 está representado o Gráfico de Core no qual se dispõe a classificação das bactérias endofíticas com ocorrência de 80% a 100% em todas as amostras de colmo e de raiz das quatro variedades de milho cultivadas em Serra Talhada. Em ambas as representações o anel interior é referente ao filo e o anel exterior representa a maior classificação obtida pela unidade taxonômica, chegando em alguns casos a gênero. Para raiz, foi verificado um total de 54 OTUs presentes, sendo a sua grande maioria dos filios Proteobacteria, Firmicutes e

Actinobacteria, e em menor quantidade estavam Chloroflexi, Cyanobacteria e Bacteroidetes. Do filo da Proteobacteria se destacou os *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* e *Acidibacter*. Do filo Firmicutes a maior predominância foram *Bacillus*, Bacillaceae e *Staphylococcus*. Já no filo Actinobacteria se destacaram *Leifsonia*, *Streptomyces* e Microbacteriaceae. Nas amostras de colmo foram verificados 65 OTUs, sendo a grande maioria também pertencentes aos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes, e em menor quantidade Chloroflexi e Cyanobacteria. Do filo Proteobacteria a predominância foram de *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Klebsiella* e *Acidibacter*. Do filo Actinobacteria a predominância foi de *Streptomyces*, Micromonosporaceae e *Leifsonia*. Já para o filo Firmicutes a maior ocorrência foram de *Bacillus* e Bacillaceae, seguidos pelo *Staphylococcus*.

4.3.6 Coocorrência de bactérias endofíticas presentes em genótipos de milho

A coocorrência/interação entre as bactérias endofíticas presentes em amostras de raízes de milho cultivado em Serra Talhada é mostrada na Figura 7. As bactérias se agruparam em relação às interações entre os indivíduos, chegando a ocorrer interação entre grupos. Observa-se que a maior predominância foi da *Leifsonia* por se mostrar mais abundante (o balão mais inflado) em relação às demais. Para esse grupo de indivíduos só foram observadas relações positivas (linhas verdes), com destaque para as relações entre o *Bradyrhizobium*, *Dictyobacter*, *Ktedonobacterales* e *Paraburkholderia*, e também entre *Streptomycetaceae*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, que apresentaram as relações mais intensas (linha mais espessa). *Paraburkholderia* foi o gênero que apresentou o maior número de interação (balão com a borda mais espessa) com unidades taxonômicas dentro daquela rede.

Para colmo, a rede de coocorrência/interação entre as bactérias endofíticas presentes em plantas de milho cultivado em Serra Talhada é mostrada na Figura 8. Nessa rede a *Leifsonia* também se mostrou como o gênero mais abundante (balão mais inflado), seguido por *Klebsiella*. Foi verificada a presença de relação negativa entre micro-organismos, com destaque para a *Leifsonia* que apresentou maior número de relações e mais intensas, principalmente com *Enterobacter*. Também foram verificadas relações negativas da presença de *Bradyrhizobium* e *Streptomyces* com outros organismos daquela rede, assim como entre *Acinetobacter* e *Klebsiella* e entre *Bacillaceae* e *Pantoea*.

A rede de coocorrência/interação entre as bactérias endofíticas presentes em raiz dos dois genótipos de milho cultivados em Araripina e Serra Talhada são mostradas nas Figuras 9 e 10, respectivamente. Em ambos os locais *Leifsonia* foi o gênero mais abundante, apresentando relação negativa com *Bacillaceae*, apenas em Araripina. Os agrupamentos de Araripina foram mais espaçados, formando grupos mais definidos, diferente do que ocorreu em Serra Talhada, onde os grupos apresentaram mais interações entre si.

Figura 7: Rede de coocorrência/interação de bactérias endofíticas em raiz de genótipos milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (MODELO I). Tamanho do balão se refere a abundância da unidade taxonômica em relação aos demais. A cor do balão se refere ao agrupamento. Espessura da borda significa uma maior interação com outros indivíduos. Linha verde se refere a relação positiva e a vermelha relação negativa. A espessura da linha se refere a intensidade da interação. Letras: (k) – Reino; (p) – filo; (c) – Classe; (o) – Ordem; (f) – Família; (g) – Gênero.

Root samples Network

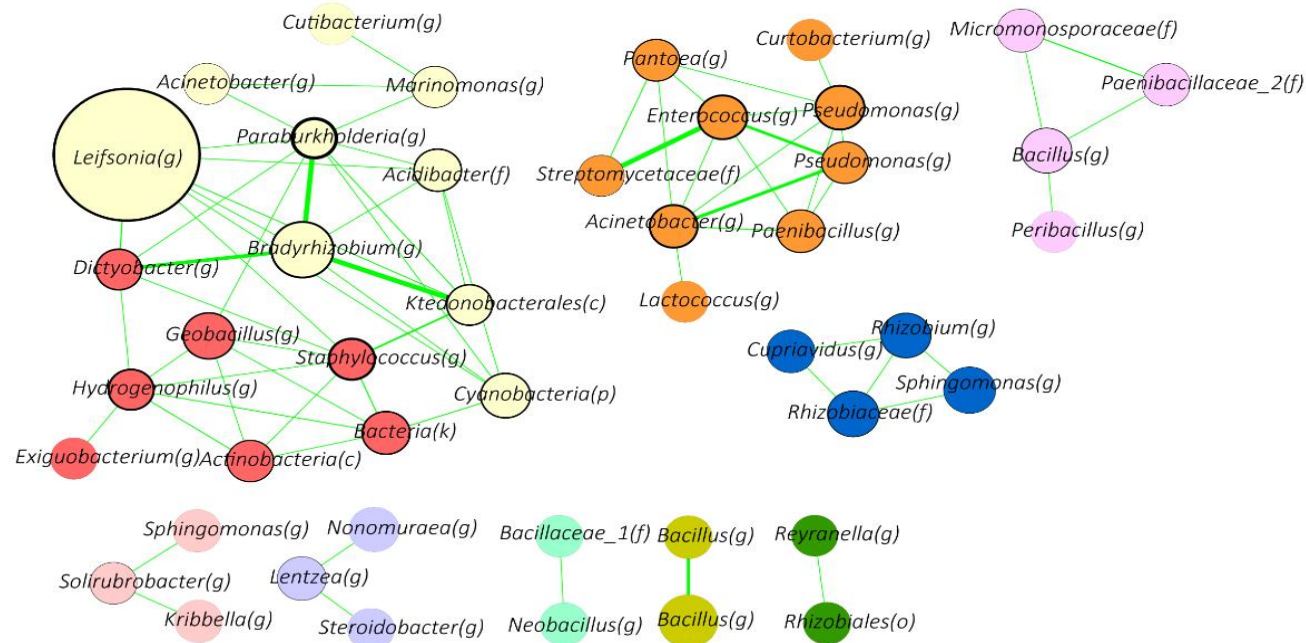


Figura 9: Rede de coocorrência/interação de bactérias endofíticas em raiz de dois genótipos milho cultivados em Araripina, Pernambuco, Brasil (MODELO II). Tamanho do balão se refere a abundância da unidade taxonômica em relação aos demais. A cor do balão se refere ao agrupamento. Espessura da borda significa uma maior interação com outros indivíduos. Linha verde se refere a relação positiva e a vermelha relação negativa. A espessura da linha se refere a intensidade da interação. Letras: (k) – Reino; (p) – filo; (c) – Classe; (o) – Ordem; (f) – Família; (g) – Gênero.

Araripina samples Network

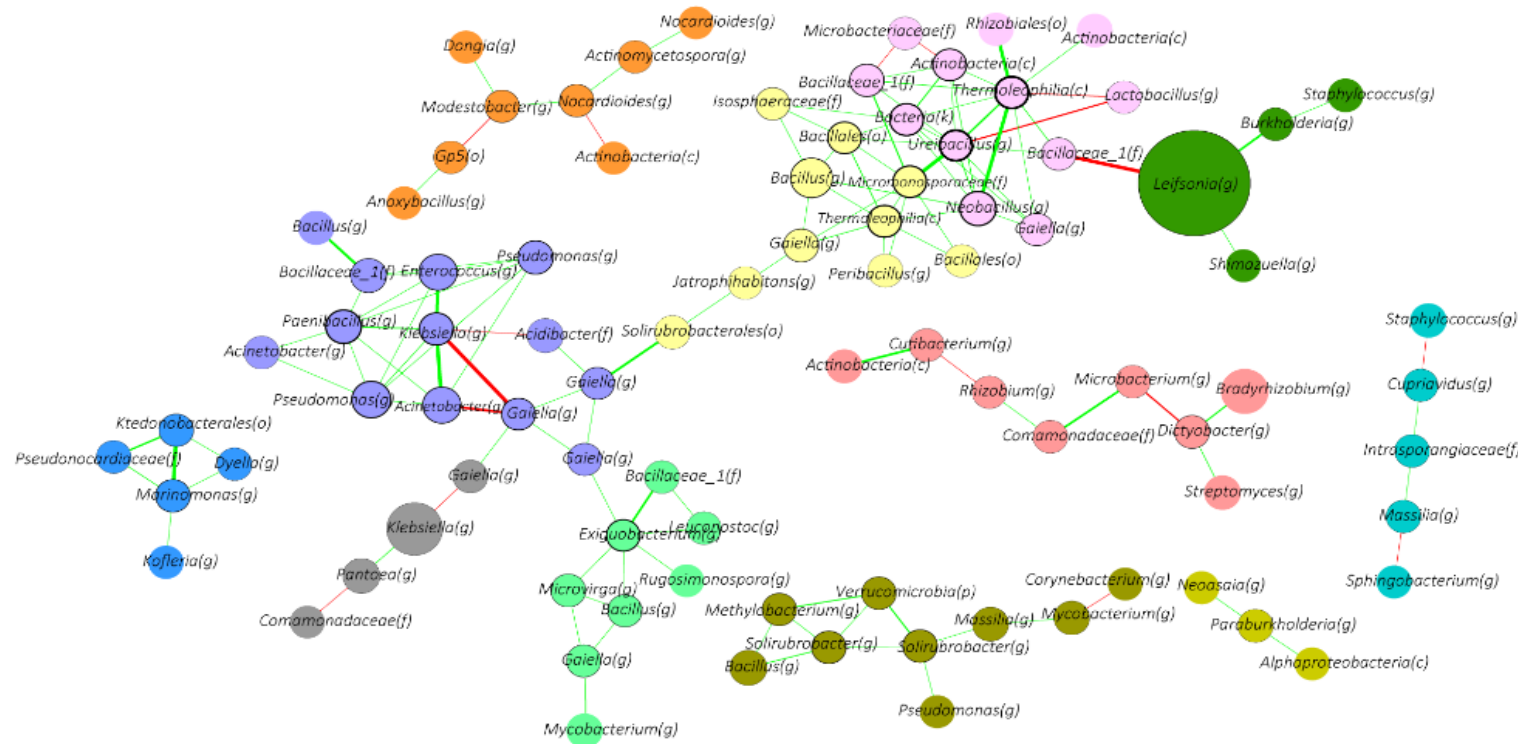
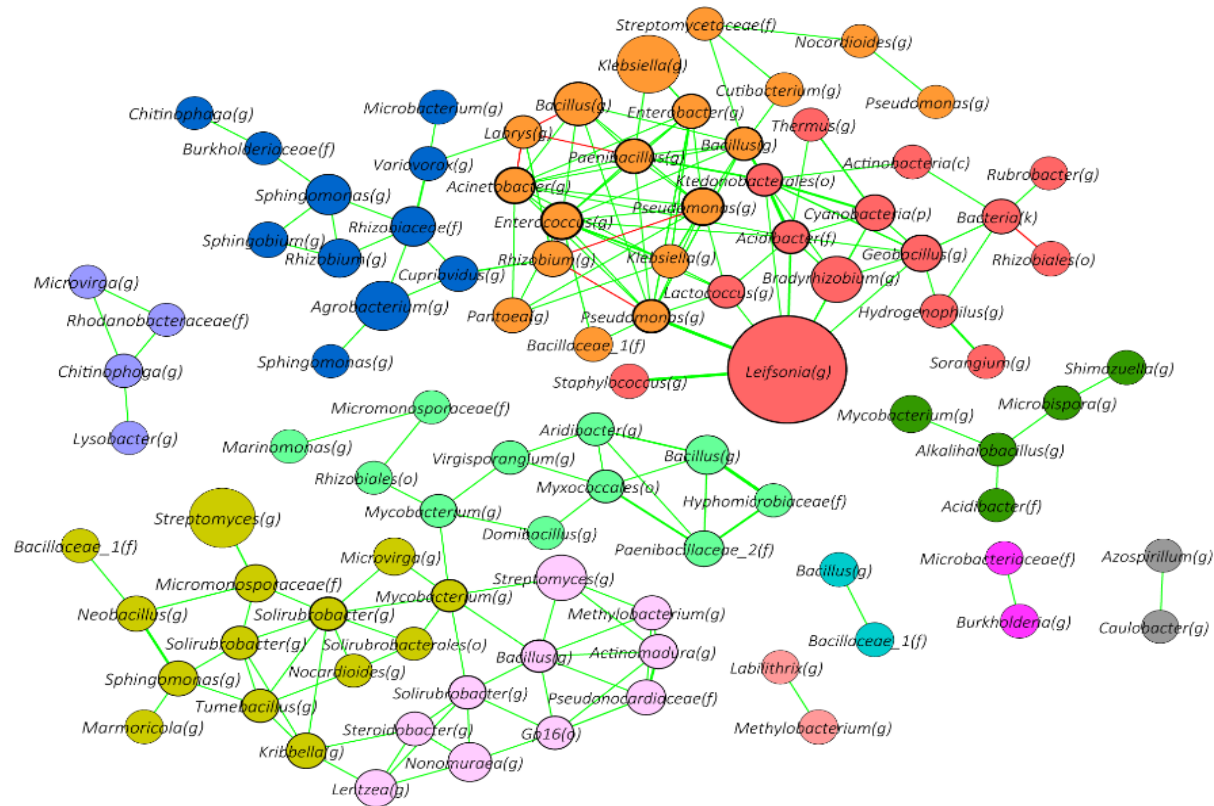


Figura 10: Rede de coocorrência/interação de bactérias endofíticas em raiz de dois genótipos milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, CORBrasil (MODELO II). Tamanho do balão se refere a abundância da unidade taxonômica em relação aos demais. A cor do balão se refere ao agrupamento. Espessura da borda significa uma maior interação com outros indivíduos. Linha verde se refere a relação positiva e a vermelha relação negativa. A espessura da linha se refere a intensidade da interação. Letras: (k) – Reino; (p) – filo; (c) – Classe; (o) – Ordem; (f) – Família; (g) – Gênero.

Serra Talhada samples Network



4.3.7 Comparação das bactérias endofíticas presentes em diferentes compartimentos, genótipos e locais de cultivo de milho

O cladograma de comparação de bactérias endofíticas presentes em raiz e colmo de diferentes variedades de milho cultivados em Serra Talhada está disposto na Figura 11. Observa-se a predominância dos filos Actinobactéria, Deltaproteobacteria e Betaproteobacteria nas amostras de raiz. Nas amostras de colmo, os filos predominantes foram Firmicutes e Gamaproteobacteria, sendo que este último também apresenta abundância significativa nas amostras de raiz (Figura 11).

Quando se compara os diferentes genótipos e tecidos das plantas quanto à predominância dos filos, observa-se pouca diferença entre os genótipos de milho se a avaliação é feita para os dois tecidos da planta (raiz e colmo) separadamente (Figura 12). Em raízes do milho, o filo Betaproteobacteria é predominante no genótipo BR 5036; no genótipo BRS 4105 os filos que apresentaram maior predominância são Clostridia e Hydrogenophilalia; e no genótipo BR 5037 predominou o filo Bacteroidetes. Para esse compartimento não foi observado significância para o genótipo BRS 4107 (Figura 12.A). Para colmo (Figura 12.B), a predominância foi dos filos Betaproteobacteria e Pseudonocardialis, no genótipo BR 5036, e do filo Pseudonocardialis, no genótipo BRS 4107. Os demais genótipos não apresentaram predominância significativa.

Figura 11: Cladograma por análise de LfSE comparando as bactérias endofíticas de raiz e colmo de genótipos milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (MODELO I).

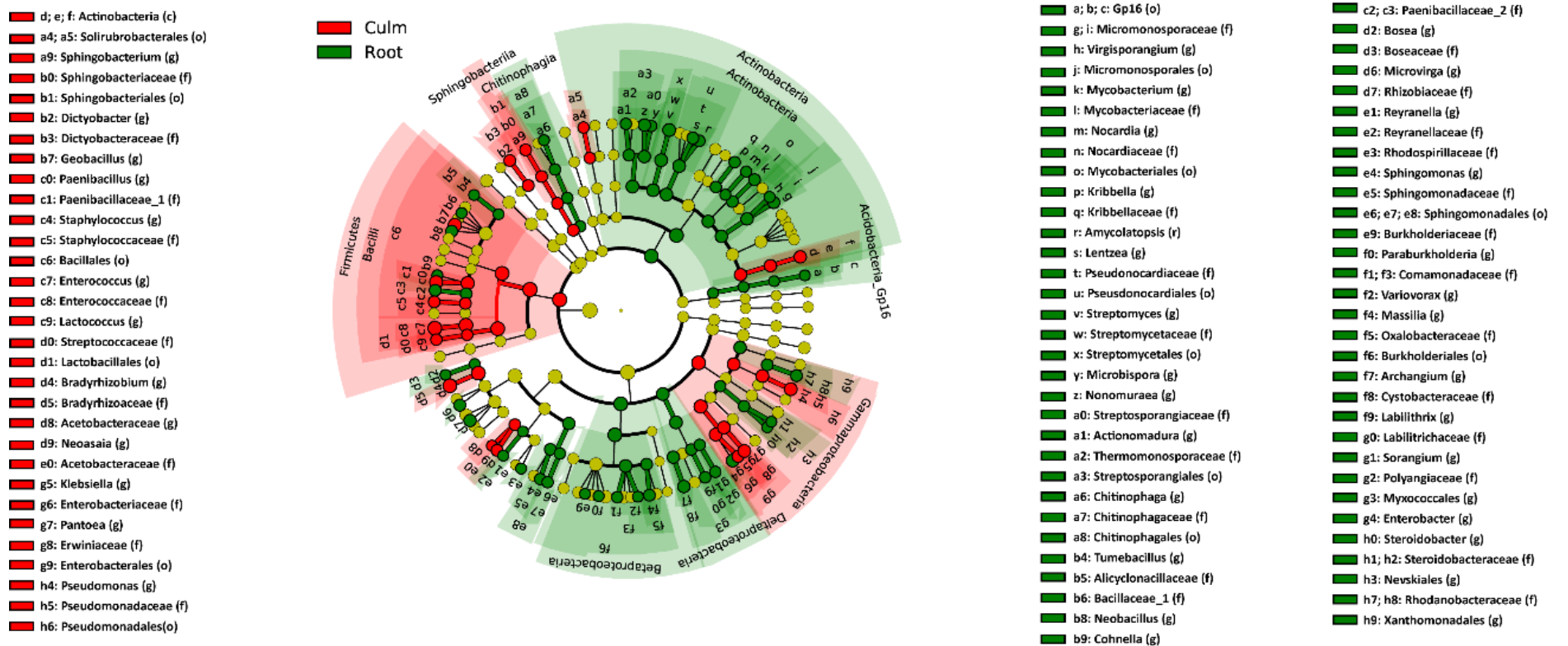
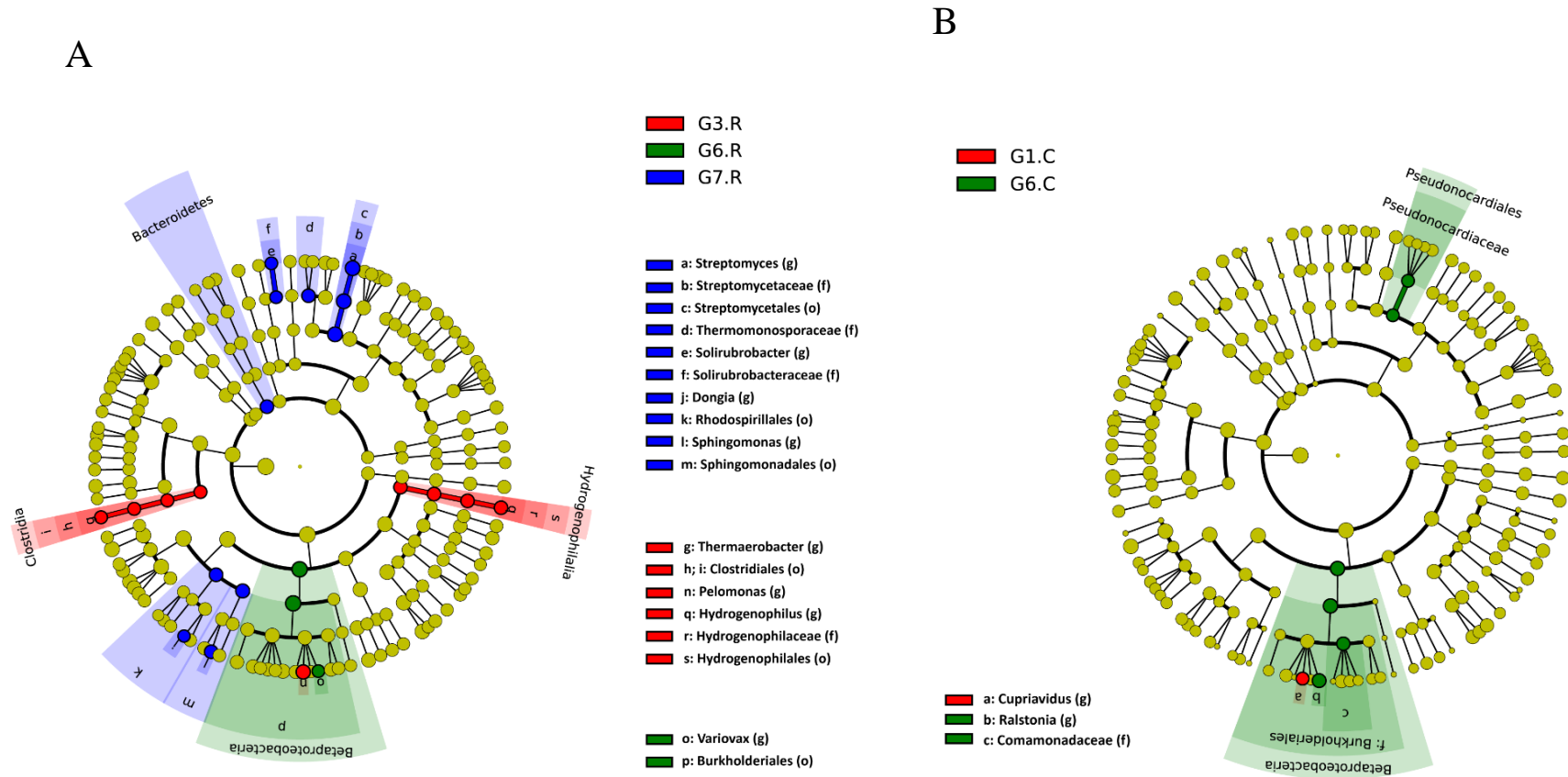


Figura 12: Cladograma por análise de LEfSE comparando as bactérias endofíticas de raiz e colmo em relação aos genótipos milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (MODELO I).



Quando se compara locais de cultivo sobre a predominância de filos de bactérias endofíticas de raiz dos dois genótipos de milho (Figura 13), observa-se diferenças significativas. Em Serra Talhada a predominância foi dos filos Proteobacteria e Acidobacteria, em Araripina, a predominância foi dos filos Firmicutes, Cyanobacteria e Bacteria. Quando se compara os genótipos de milho, de maneira geral há pouca diferença entre os filos presentes. Em Serra Talhada (Figura 14.A), a predominância no genótipo BR 5036 foi dos filos Betaproteobacteria e Clostridia, já no genótipo BR 5037 foi dos filos Bacteroidetes e Thermoleophilia, as demais unidades taxonômicas tiveram predominância similar em ambos os genótipos, não apresentando significância. Em Araripina (Figura 14.B) a predominância no genótipo BR 5036 foi dos filos Alicyclobacillaceae e Rubrobacteria, e no genótipo BR 5037 a predominância foi do filo Thermomonosporaceae, sendo a presença das demais unidades taxonômicas similares para os dois genótipos avaliados.

Figura 13: Cladograma por análise de LEfSE comparando as bactérias endofíticas em raiz de genótipos milho cultivados em Araripina e Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (MODELO II).

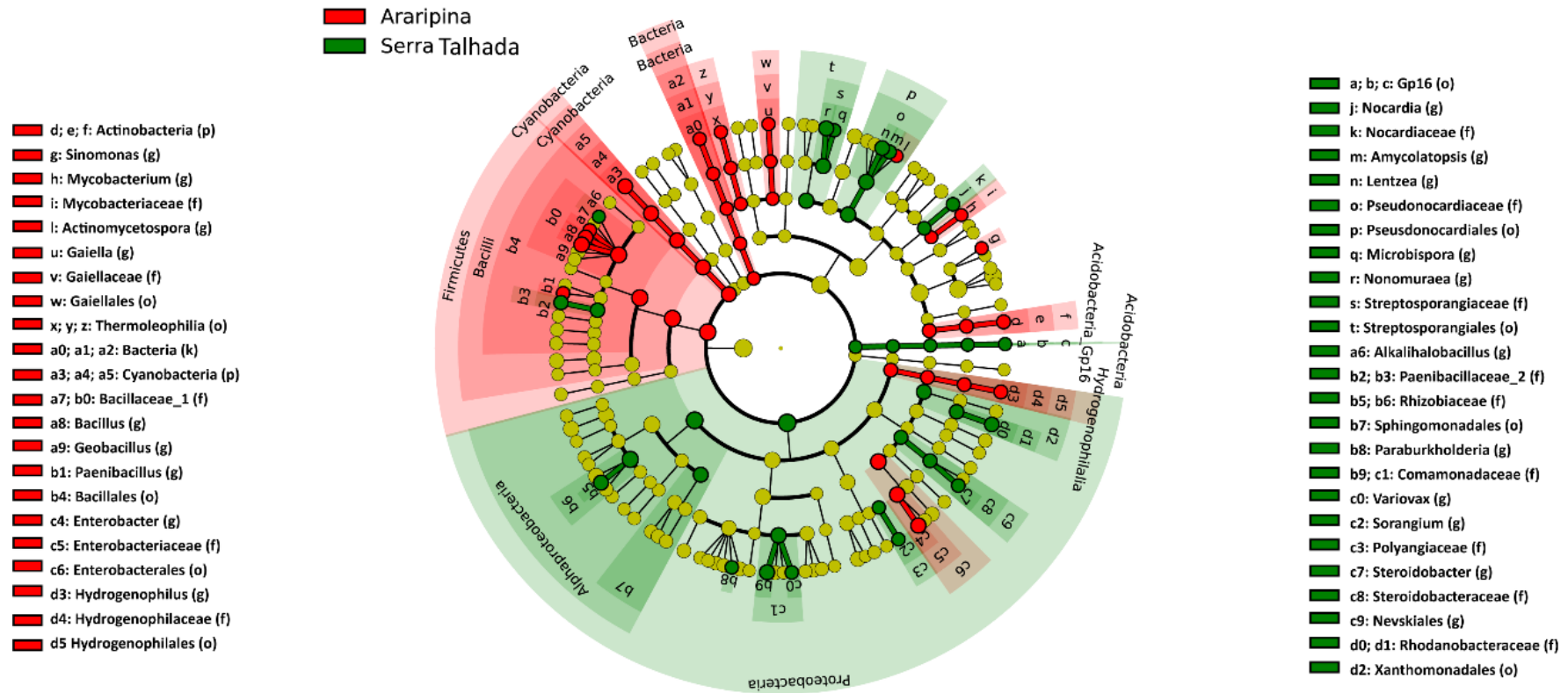
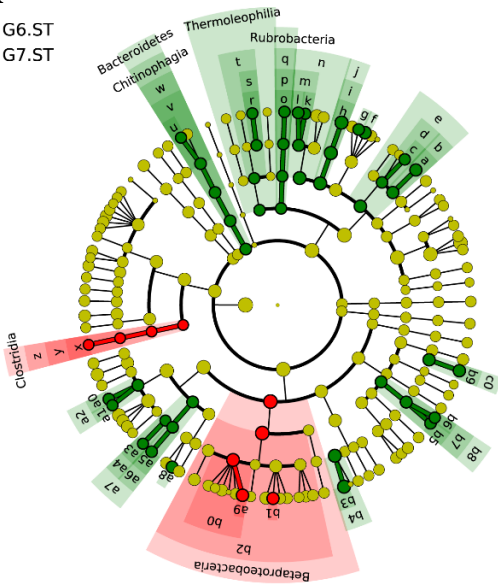


Figura 14: Cladograma por análise de LEfSE comparando as bactérias endofíticas de raiz de dois genótipos milho cultivados em Araripina e Serra Talhada, Pernambuco, Brasil (MODELO II).

A

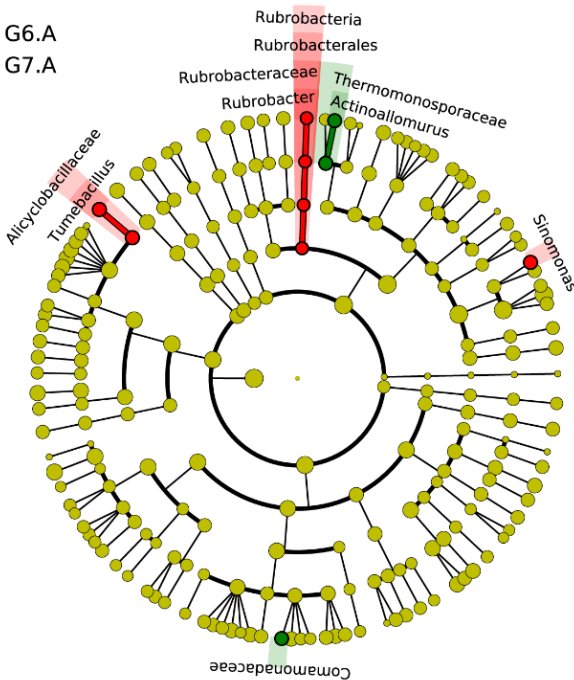
G6.ST
G7.ST



- a: Kribbella (g)
- b: Kribbellaceae (f)
- c: Marmoricola (g)
- d: Nocardioidaceae (f)
- e: Propinibacteriales (o)
- f: Lentzea (g)
- g: Pseudonocardia (g)
- h: Streptomyces (g)
- i: Streptomycetaceae (f)
- j: Streptomycetales (o)
- k: Actinoallomurus (g)
- l: Actionomadura (g)
- m: Thermomonosporaceae (f)
- n: Streptosporangiales (o)
- o: Rubrobacter (g)
- p: Rubrobacteraceae (f)
- q: Rubrobacterales (o)
- r: Solirubrobacter (g)
- s: Solirubrobacteraceae (f)
- t: Solirubrobacterales (o)
- u: Niastella (g)
- v: Chitinophagaceae (f)
- w: Chitinophagales (o)
- a0: Methylobacterium (g)
- a1: Microvirga (g)
- a2: Methylobacteriaceae (f)
- a3: Reyranella (g)
- a4: Reyranellaceae (f)
- a5; a6: Rhodanobacteraceae (f)
- a7: Rhodospirillales (o)
- a8: Sphingomonas (g)
- b3: Archangium (g)
- b4: Cystobacteraceae (f)
- b5: Steroidobacter (g)
- b6; b7: Steroidobacteraceae (f)
- b8: Nevskiales (g)
- b9; c0: Rhodanobacteraceae (f)
- x: Thermoerobacter (g)
- y; z: Clostridiales (o)
- a9: Ralstonia (g)
- b0: Burkholderiaceae (f)
- b1: Pelomonas (g)
- b2: Burkholderiales (o)

B

G6.A
G7.A



4.4 DISCUSSÃO

Com o aumento da demanda por alimentos e a necessidade de se reduzir os impactos ao meio ambiente e os custos da produção agrícola, é cada vez mais importante o entendimento das interações plantas e micro-organismos, que pode facilitar a identificação e o manejo de micro-organismos com atributos de promoção de crescimento de plantas.

A alfa diversidade das amostras do MODELO I mostrou que o genótipo BR 5037 possui maior riqueza de espécies, pelos dois índices aplicados (Richness e Shannon). De maneira geral, as raízes apresentaram uma maior riqueza quando comparadas com o colmo, com destaque para o compartimento raiz do genótipo BR 5037, que apresentou a maior alfa diversidade. Esses resultados corroboram a observação que a maior riqueza de bactérias endofíticas é encontrada em isolados de raiz que em isolados de caule e folha de um híbrido de milho em diferentes estágios de crescimento (MARAG; SUMAN, 2018). Para o colmo, foi verificado uma homogeneidade entre os diferentes genótipos. Quando se compara os tecidos de dois genótipos (MODELO II) observam-se diferenças quando aplicado o teste de Richness, com genótipo BR 5037 cultivado em Serra Talhada se sobressaindo, diferentemente do MODELO I, em não foram observadas diferenças entre tecidos das plantas.

Em uma análise geral, foi observada uma baixa variabilidade da composição das comunidades bacterianas (beta diversidade) nas amostras de milho cultivado em Serra Talhada, avaliadas no MODELO I (Figura 3.A), sendo o fator tecido da planta (raiz e colmo) mais determinante que o fator genótipo da planta. Foi verificada uma separação entre raiz e colmo, sendo a área coberta pela raiz maior que a de colmo, ou seja, a beta diversidade da raiz é maior que a de colmo, e esse por sua vez apresenta uma comunidade bacteriana mais parecida entre os genótipos.

É possível verificar o efeito do local de cultivo sobre a composição das comunidades de bactérias endofíticas nas raízes dos dois genótipos de milho (MODELO II). A comunidade de bactérias é mais homogênea em Araripina e mais diversificada em Serra Talhada (Figura 3.B). Os dois locais de cultivo apresentam diferentes condições edafoclimáticas, sendo Serra Talhada mais árida que Araripina (Tabela 9) e apresentando um solo Argissolo Amarelo, mais fértil que o Latossolo Amarelo de Araripina, mais ácido. Tais diferenças condicionam diferentes comunidades de bactérias nativas nos solos (KE et al., 2018). Com isso, é possível afirmar que a comunidades de bactérias endofíticas é influenciada pelas bactérias nativas dos solos, e estas

por sua vez são determinadas pelo tipo de solo e condições edafoclimáticas (ROESCH et al., 2007).

A abundância relativa dos 15 gêneros mais presentes nos dois modelos (I e II) adotados nesse estudo mostrou uma predominância do gênero *Leifsonia* (Figuras 4 e 5). As espécies desse gênero são Gram-positivas e nutricionalmente exigentes, crescem muito lentamente em meios de cultura complexos (QUECINE et al., 2016). Geralmente estão presentes nos vasos do xilema das plantas, podendo se movimentar e ser encontrada até no mesofilo e nas células da bainha do feixe que circundam o sistema vascular (QUECINE et al., 2016). Não há relatos na literatura de efeitos maléficis do gênero *Leifsonia* em plantas de milho. No entanto, a espécie de bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é o patógeno causador do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar, uma importante doença de colmo, que causa redução significativamente da altura das plantas, do diâmetro do colmo e do peso do colmo, refletindo diretamente na redução da produtividade de canaviais em todo o mundo (QUECINE et al., 2016; ZHU et al., 2017; GUO et al., 2019; CASTRO-MORETTI et al., 2021). Os gêneros *Bacillus*, *Klebsiella* e *Streptomyces* também tiveram participação expressiva nas amostras avaliadas. Diversos trabalhos mostram os efeitos benéficos de espécies desses gêneros na promoção de crescimento de plantas de milho. O gênero *Bacillus* tem importante contribuições na FBN (LOBO; dos SANTOS; RIGOBELLO, 2019; de AQUINO et al., 2019), produção de AIA e solubilização de P (ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI 2018; RIBEIRO et al., 2018), além da supressão de fitopatógenos (MUGIASTUTI et al., 2020). Algumas espécies de *Klebsiella* já tiveram a comprovação como bactéria promotora de crescimento de plantas, com a produção de AIA, amônia, sideróforos e FBN (YANG; YANG, 2020). Mowafy et al. (2021) verificaram um aumento significativo do vigor de mudas de milho quando inoculadas conjuntamente com estirpes de *Bacillus* e *Klebsiella*. A inoculação de milho e trigo cultivados em solo salino com *Klebsiella variicola* resultou na melhoria da germinação de sementes, comprimento de raiz, altura da parte aérea e teor de clorofila, além da melhoria da salinidade, como resultado da secreção de osmólitos e a mudança no pH da salinidade para a neutralidade (KUSALE et al. 2021). Por outro lado, a espécie *Klebsiella pneumoniae* KpC4 foi recentemente identificada como agente causador da podridão superficial bacteriana em plantas de milho (HUANG et al., 2019). Não foram identificados sintomas de doenças nas plantas utilizadas nesse trabalho, de que se deduz que essa espécie não estava presente ou não foi capaz de manifestar sua patogenicidade. Para *Streptomyces* também há diversos trabalhos que mostram os seus efeitos benéficos quando inoculadas em plantas de milho, como o aumento da eficiência do fitomanejo de solos contaminados com hidrocarbonetos (BAUNCE et al., 2019) e metais pesados (AL-

HUQAIL; EL-BONDKLY, 2021), biocontrole de fungos e bactérias fitopatogênicas (BOUKAEW et al., 2019; BOUKAEW; PETLAMUL; PRASERTSAN, 2020; AL-HUQAIL; EL-BONDKLY, 2021; TRAN et al., 2021), solubilização de P (MOHAMMED, 2020), tolerância a seca (WARRAD et al., 2020), estresse salino (NOZARE et al., 2021), produção de AIA e FBN (WAHYUDI et al., 2019).

O gênero *Bradyrhizobium* também esteve presente nas amostras avaliadas nos dois modelos, porém não apresentando significância nas variáveis analisadas. Cavalcanti et al. (2020) observaram que *Bradyrhizobium* spp. isolados de raiz de milho promoveu a solubilização de fosfato tricálcico em meio sólido, e o desempenho no campo da estirpe *Bradyrhizobium* sp. ESA 114 foi comparável ao da cepa comercial de *Azospirillum brasilense* Ab-V5, apresentando os mesmos rendimentos de grãos, e rendimentos maiores que o controle absoluto e que o tratamento não inoculado com adubo nitrogenado. Outros gêneros de bactérias promotoras de crescimento de plantas também foram observados, mas em menores proporções, como *Pseudomonas* (RANA et al., 2021), *Acinetobacter* (ABBAS et al., 2020), *Enterobacter*, *Staphylococcus* (CHINAKWE; MBEREDE; NGUMAH, 2019), *Enterococcus* (MELLO et al., 2020) e *Paenibacillus* (ABDEL LATEF et al., 2020; LI; LI; CHEN, 2021). Foi identificado também a presença do gênero *Ralstonia*, para o qual há relatos de espécie fitopatogênica (*Ralstonia solanacearum*), causadora da murcha bacteriana em diversas espécies de plantas, como tomate (LING et al., 2020), batata (UWAMAHORO et al., 2020), banana (RAMÍREZ; NEUMAN; RAMÍREZ, 2020) e fumo (AHMED et al., 2022). Não há relatos na literatura de problemas causados por essa espécie em milho. Para todos os gêneros foi observada maior predominância na raiz (Figura 4), que pode ser atribuída à maior deposição de diferentes compostos excretados pelas plantas nesse tecido (PHILIPPOT et al., 2013).

Para a ocorrência dos filos nos diferentes tecidos das plantas foi verificado uma maior presença de OTUs no colmo (65 OTUs), a raiz (54 OTUs) apresentou uma maior diversidade de gêneros (Figura 6). Em ambos os compartimentos da planta, houve a predominância dos filos Proteobacteria, Actinobacteria e Firmicutes, sendo observados ainda, porém em menores proporções, Chloroflexi e Cyanobacteria, além de Bacteroidetes, sendo este presente apenas no compartimento raiz. Esses achados corroboram trabalho desenvolvido por Correa-Galeote, Bedmar e Arone (2018), que também verificaram presença dos filos Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Acidobacteria, Chloroflexi e Cyanobacteria (em ordem decrescente de predominância) dentro de raízes de plantas de milho.

Nas redes de coocorrência é possível observar as interações entre os indivíduos que compõem as comunidades bacterianas avaliadas. No geral, o gênero *Leifsonia* foi o que mais predominou em todos os cenários avaliados, apresentando várias interações negativas quando presente no compartimento colmo nas plantas cultivadas em Serra Talhada (Figura 8) e uma interação negativa no compartimento raiz de plantas cultivadas em Araripina (Figura 9). Mesmo estando presente em todas as análises, as plantas de milho não mostraram nenhum sinal de doença causada por espécies do gênero *Leifsonia*. No entanto, esse gênero teve mais influência negativa em relação aos outros gêneros presentes no colmo, sendo necessário mais estudos para avaliar os efeitos dessas interações. Por outro lado, alguns estudos mostram os efeitos benéficos da *Leifsonia* sp. na promoção de crescimento de plantas de milho, promovendo aumento da biomassa seca da parte aérea e de raiz, além de aumento do diâmetro do caule (CERQUEIRA et al., 2015).

Por meio do cladograma apresentado na Figura 11, é possível observar os diferentes filos de bactérias endofíticas que estão mais enriquecidos nos compartimentos avaliados para o Modelo I. Nota-se que a predominância dos filos é distinta nesses compartimentos. Na raiz, a predominância é dos filos Actinobacteria, Delta e Betaproteobacteria, enquanto que no colmo a predominância é dos filos Firmicutes e Gamaproteobacteria, sendo este último também presente no compartimento raiz. Quando a avaliação é feita comparando os genótipos do milho (Modelo I), observam-se poucas diferenças dentro de cada compartimento (Figura 12). Na raiz, para o genótipo BRS 4105, a predominância é dos filos Hydrogenophilalia e Clostridia; para o genótipo BR 5036, é do filo Proteobacteria; e para o genótipo BR 5037, é do filo Bacteroidetes. Para esse compartimento, não houve diferenças significativas observadas para o genótipo BRS 4107. Para o colmo, apenas o genótipo BR 5037 apresentou diferença significativa, com predominância do filo Betaproteobacteria. Para a comparação entre locais em que o milho foi cultivado, considerando apenas o compartimento raiz (Modelo II), observa-se que em Serra Talhada há a predominância de bactérias pertencentes ao filo Proteobacteria, enquanto que em Araripina a predominância é dos filos Firmicutes, Cyanobacteria e Bacteria (Figura 13). Mais uma vez, esse resultado sugere, que o ambiente está condicionando a comunidade de bactérias endofíticas nesses genótipos, como já relatado anteriormente. Quando se comparam os genótipos de milho, não são observadas diferenças significativas, principalmente quando cultivados em Araripina (Figura 14). Já em Serra Talhada, observou-se a predominância do filo Betaproteobacteria no genótipo BR 5036, e dos filos Bacteroidetes e Thermoleophilia para o genótipo BR 5037.

4.5 CONCLUSÃO

Os gêneros de bactérias endofíticas de maior ocorrência em raízes e colmos de milho são *Leifsonia*, *Bacillus*, *Klebsiella* e *Streptomyces*, independentemente do genótipo da planta ou das condições edafoclimáticas do local de cultivo.

A composição da comunidade de bactérias endofíticas diferem entre os compartimentos raiz e colmo, tendo a raiz maior diversidade, provavelmente devido aos compostos excretados por ela.

A microbiota nativa tem grande influência na composição das comunidades de bactérias endofíticas em plantas de milho.

As comunidades de bactérias endofíticas de plantas de milho não inoculadas abrigam gêneros com relatos de capacidade de promoção de crescimento de plantas, como produção de fitohormônios, supressão de fitopatógenos, tolerância a fatores abióticos, solubilização de nutrientes e FBN.

O genótipo do milho não tem influência significativa sobre a composição das comunidades de bactérias endofíticas em suas raízes e colmos.

REFERENCIAS

- ABBAS, S.; JAVED, M. T.; SHAHID, M.; HUSSAIN, I.; HAIDER, M. Z.; CHAUDHARY, H. J.; TANWIR, K.; MAQSOOD, A. *Acinetobacter* sp. SG-5 inoculation alleviates cadmium toxicity in differentially Cd tolerant maize cultivars as deciphered by improved physio-biochemical attributes, antioxidants and nutrient physiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 155, p. 815-827, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.024>
- ABDEL LATEF, A. A. H.; ZAID, A.; ABO-BAKER, A. B. A. E.; SALEM, W.; ABU ALHMAD, M. F. Mitigation of Copper Stress in Maize by Inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus circulans*. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1-18, 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9111513>
- ABEDINZADEH, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 20, e00305, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00305>
- AHMED, W.; YANG, J.; TAN, Y.; MUNIR, S.; LIU, Q.; ZHANG, J.; JI, G.; ZHAO, Z. *Ralstonia solanacearum*, a deadly pathogen: Revisiting the bacterial wilt biocontrol practices in tobacco and other *Solanaceae*. **Rhizosphere**, v. 21, 100479, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2022.100479>
- AL-HUQAIL, A. A.; EL-BONDKLY, A. M. A. Improvement of *Zea mays* L. growth parameters under chromium and arsenic stress by the heavy metal-resistant *Streptomyces* sp. NRC21696. **International Journal of Environmental Science and Technology**, 2021. <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03532-7>
- ALIBRANDI, P.; SCHNELL, S.; PEROTTO, S.; CARDINALE, M. Diversity and Structure of the Endophytic Bacterial Communities Associated With Three Terrestrial Orchid Species as Revealed by 16S rRNA Gene Metabarcoding. **Frontiers in Microbiology**. V. 11, p. 1-18, 604964, 2020. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.604964>
- AMPLICON, P. C. R.; CLEAN-Up, P. C. R.; INDEX, P. C. R. **16s metagenomic sequencing library preparation**. Illumina.com, 2013. https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
- ANDRADE, L. F.; SOUZA, G. L. O. D.; NIETSCHKE, S.; XAVIER, A. A.; COSTA, M. R.; CARDOSO, A. M. S.; PEREIRA, M. C. T.; PEREIRA, D. F. G. S. Analysis of the Abilities of Endophytic Bacteria Associated with Banana Tree Roots to Promote Plant Growth. **Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 27–34, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12275-014-3019-2>
- ANDREOTE, F. D.; GUMIERE, T.; DURRER, A. Exploring interactions of plant microbiomes. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 6, p. 528–539, 2014. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0195>

- BAOUNE, H.; APARICIO, J. D.; ACUÑA, A.; EL HADJ-KHELIL, A. O.; SANCHEZ, L.; POLTI, M. A.; ALVAREZ, A. Effectiveness of the *Zea mays*-*Streptomyces* association for the phytoremediation of petroleum hydrocarbons impacted soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 184, 109591, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109591>
- BERG, G.; RYBAKOVA, D.; GRUBE, M.; KÖBERL, M. The plant microbiome explored: implications for experimental botany. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 4, p. 995–1002, 2015. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv466>
- BOUKAEW, S.; PETLAMUL, W.; PHITTHAYAPHINANT, P.; PRASERTSAN, P. Potential use of *Streptomyces mycarofaciens* SS-2-243 as a biofumigant to protect maize seeds against two aflatoxin producing fungi. **Pathol European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 489–503, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01782-3>
- BOUKAEW, S.; PETLAMUL, W.; PRASERTSAN, P. Efficacy of *Streptomyces philanthi* RL-1-178 culture filtrate against growth and aflatoxin B1 production by two aflatoxigenic fungi on maize seeds. **Pathol European Journal of Plant Pathology**, v. 156, p. 1041–1051, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-01955-5>
- BULGARELLI, D.; GARRIDO-OTER, R.; MÜNCH, P. C.; WEIMAN, A.; DRÖGE, J.; PAN, Y.; McHARDY, A. C.; SCHULZE-LEFERT, P. Structure and Function of the Bacterial Root Microbiota in Wild and Domesticated Barley. **Cell Host & Microbe**, v. 17, n. 3, p. 392–403, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.01.011>
- CASTRO-MORETTI F, R.; COCURON, J. C.; CIA, M. C.; CATALDI, T. R.; LABATE, C. A.; ALONSO, A. P.; CAMARGO, L. E. A. Targeted Metabolic Profiles of the Leaves and Xylem Sap of Two Sugarcane Genotypes Infected with the Vascular Bacterial Pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Metabolites**. V. 12, n. 4, p. 1-17, 234, 2021. <https://doi.org/10.3390/metabo11040234>
- CAVALCANTI, M. I. P.; NASCIMENTO, R. C.; RODRIGUES, D. R.; ESCOBAR, I. E. C.; FRAIZ, A. C. R.; de SOUZA, A. P.; de FREITAS, A. D. S.; NÓBREGA, R. S. A.; FERNANDES-JÚNIOR, P. I. Maize growth and yield promoting endophytes isolated into a legume root nodule by a cross-over approach. **Rhizosphere**, 00211, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2020.100211>
- CERQUEIRA, W. F.; MORAIS, J.S.; MIRANDA, J. S. M, E. D.; SANTOS, A. F.J. Rizobactérias do semiárido na promoção de crescimento de plantas de milho (*Zea mays* L.). **Cadernos Macambira**, v. 1, p. 26, 2015.
- CHINAKWE, E.; MBEREDE, C.; NGUMAH, C. Plant growth promoting rhizobacteria from local and hybrid maize (*Zea mays*) varieties. **Annals. Food Science and Technology**. V. 20, 2019.
- CORREA-GALEOTE, D.; BEDMAR, E.J.; ARONE, G.J. Maize Endophytic Bacterial Diversity as Affected by Soil Cultivation History. **Frontiers Microbiology**. v. 9, n. 484, 2018. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00484>

De AQUINO, J. P. A.; MACEDO JUNIOR, F. B.; ANTUNES, J. E. L.; FIGUEIREDO, M. V. B.; ALCÂNTARA NETO, F.; de ARAUJO, A. S. F. Plant growth-promoting endophytic bacteria on maize and sorghum. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 49, e56241, 2019.

De FREITAS, A. D. S.; SAMPAIO, E. V. S. B.; RAMOS, A. P. S.; BARBOSA, M. R. V.; LYRA, R. P.; ARAÚJO, E. L. Nitrogen isotopic patterns in tropical forests along a rainfall gradient in Northeast Brazil. **Plant Soil**, v. 391, p. 109–122, 2015.
<https://doi.org/10.1007/s11104-015-2417-5>

FAUST, K.; RAES, J. CoNet app: inference of biological association networks using Cytoscape. **F1000Research**, v. 5, n. 1519, 2016.

FIERER, N. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 10, p. 579–590, 2017.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>

GUO, Y.; HU, M.; LIU, L. L.; YAO, W.; ZHANG, M. Q. Activities of key enzymes in the C4 pathway and anatomy of sugarcane infected by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Journal of Applied Microbiology**, ISSN 1364-5072, 2019. <https://doi.org/10.1111/jam.14444>

HAMMER, R.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**. V. 4, p. 1-9, 2001.

HARDOIM, P. R.; Van OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2015.
<https://doi.org/10.1128/mnbr.00050-14>

HUANG, M.; HE, P.; MUNIR, S.; WU, Y.; LI, X.; HE, P.; HE, Y. Ecology and etiology of bacterial top rot in maize caused by *Klebsiella pneumoniae* KpC4. **Microbial Pathogenesis**, 103906, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103906>

JOUSSET, A.; BIENHOLD, C.; CHATZINOTAS, A.; GALLIEN, L.; GOBET, A.; KURM, V.; KÜSEL, K.; RILLIG, M. C.; RIVETT, D. W.; SALLES, J. F.; Van der HEIJDEN, M. G. A.; YOUSSEF, N. H.; ZHANG, X.; WEI, Z.; HOL, W. H. G. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. **The ISME Journal**, v. 11, n. 4, p. 853–862, 2017. <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.174>

KE, X.; FENG, S.; WANG, J.; LU, W.; ZHANG, W.; CHEN, M.; LIN, M. Effect of Inoculation with Nitrogen-fixing Bacterium *Pseudomonas stutzeri* A1501 on Maize Plant Growth and the Microbiome Indigenous to the Rhizosphere. **Systematic and Applied Microbiology**, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2018.10.010>

KUSALE, S. P.; ATTAR, Y. C.; SAYYED, R. Z.; El ENSHASY, H.; HANAPI, S. Z.; ILYAS, N.; ELGORBAN, A. M.; BAHKALI, A. H.; MARRAIKI, N. Inoculation of *Klebsiella variicola* Alleviated Salt Stress and Improved Growth and Nutrients in Wheat and Maize. **Agronomy**, v. 11, n. 5, 927, 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11050927>

LI, Y.; LI, Q.; CHEN, S. Diazotroph *Paenibacillus tritici* BJ-18 Drives the Variation in Bacterial, Diazotrophic and Fungal Communities in the Rhizosphere and Root/Shoot Endosphere of Maize. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, 1460, 2021. <https://doi.org/10.3390/ijms22031460>

LING, L.; HAN, X.; LI, X.; ZHANG, X.; WANG, H.; ZHANG, L.; CAO, P.; WU, Y.; WANG, X.; ZHAO, J.; XIANG, W. A *Streptomyces* sp. NEAU-HV9: Isolation, Identification, and Potential as a Biocontrol Agent against *Ralstonia Solanacearum* of Tomato Plants. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, 351, 2020. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030351>

LOBO, L. L. B.; SANTOS, R. M.; RIGOBELLO, E. C. Promotion of maize growth using endophytic bacteria under greenhouse and field conditions. **Australian Journal of Crop Science**, v. 13, n. 12, p. 2067-2074, 2019. <https://doi.org/10.21475/ajcs.19.13.12.p2077>

LUNDBERG, D. S.; LEBEIS, S. L.; PAREDES, S. H.; YOURSTONE, S.; GEHRING, J.; MALFATTI, S.; TREMBLAY, J.; ENGELBREKTSON, A.; KUNIN, V.; del RIO, T. G.; EDGAR, R. C.; EICKHORST, T.; LEY, R. E.; HUGENHOLTZ, P.; TRINGE, S. G.; DANGL, J. L. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. **Nature**, v. 488, n. 7409, p. 86–90, 2012. <https://doi.org/10.1038/nature11237>

MAGURRAN, A. E.; HENDERSON, P. A. Explaining the excess of rare species in natural species abundance distributions. **Nature**, v. 422, n. 6933, p. 714–716, 2003. <https://doi.org/10.1038/nature01547>

MALLON, C. A.; POLY, F.; Le ROUX, X.; MARRING, I.; Van ELSAS, J. D.; SALLES, J. F. Resource pulses can alleviate the biodiversity–invasion relationship in soil microbial communities. **Ecology**, v. 96, n. 4, p. 915–926, 2015. <https://doi.org/10.1890/14-1001.1>

MARAG, P. S.; SUMAN, A. Growth stage and tissue specific colonization of endophytic bacteria having plant growth promoting traits in hybrid and composite maize (*Zea mays* L.). **Microbiological Research**, v. 214, p. 101–113, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.05.016>

MELLO, L. P. S.; SANTOS, A. C.; SANTOS, R. M.; KANDASAMY, S.; LAZAROVITS, G.; RIGOBELLO, E. C. Application of the bacterial strains “*Ruminobacter amylophilus*, *Fibrobacter succinogenes* and *Enterococcus faecium*” for growth promotion in maize and soybean plants. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 12, p. 2020–2027, 2020. <https://doi.org/10.3316/informit.801329580090940>

MITTER, B.; PFAFFENBICHLER, N.; FLAVELL, R.; COMPANT, S.; ANTONIELLI, L.; PETRIC, A.; BERNINGER, T.; NAVEED, M.; SHEIBANI-TEZERJI, R.; Von MALTZAHN, G.; SESSITSCH, A. A New Approach to Modify Plant Microbiomes and Traits by Introducing Beneficial Bacteria at Flowering into Progeny Seeds. **Frontiers Microbiology**, v. 8, n. 11, 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00011>

MOE, L. A. Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. **American Journal of Botany**, v. 100, n. 9, p. 1692–1705, 2013. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300033>

MOHAMMED, A. F. Influence of *Streptomyces* sp. Kp109810 on Solubilization of Inorganic Phosphate and Growth of Maize (*Zea mays* L.). **Journal of Applied Plant Protection**, v. 9, n. 1, p. 17-24, 2020. <https://doi.org/10.21608/japp.2020.130644>

MOWAFY, A. M.; FAWZY, M. M.; GEBREIL, A.; ELSAYED, A. Endophytic *Bacillus*, *Enterobacter*, and *Klebsiella* enhance the growth and yield of maize. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science*, v. 71, n. 4, p. 237–246, 2021. <https://doi.org/10.1080/09064710.2021.1880621>

MUGIASTUTI, E.; SUPRAYIGI; TININGSIH, N. P.; SOESANTO, L. Short Communication: Isolation and characterization of the endophytic bacteria, and their potential as maize diseases control. **Biodiversitas**, v. 21, n. 5, 2020. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210506>

NOZARI, R. M.; ORTOLAN, F.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. *Streptomyces* spp. enhance vegetative growth of maize plants under saline stress. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 52, p. 1371–1383, 2021. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00480-9>

PHILIPPOT, L.; RAAIJMAKERS, J. M.; LEMANCEAU, P.; Van der PUTTEN, W. H. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 789–799, 2013. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>

QUECINE, M. C.; SILVA, T. M.; CARVALHO, G.; SAITO, S.; MONDIN, M.; TEIXEIRA-SILVA, N. S.; CAMARGO, L. E. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B. A stable *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. **Plant Pathology**, v. 65, p. 154–162, 2016. <https://doi.org/10.1111/ppa.12397>

RAMÍREZ, M.; NEUMAN, B. W.; RAMÍREZ, C. A. Bacteriophages as promising agents for the biological control of Moko disease (*Ralstonia solanacearum*) of banana. **Biological Control**, v. 149, 104238, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104238>

RANA, K. L.; KOUR, D.; KAUR, T.; DEVI, R.; YADAV, A.; YADAV, A. N. Bioprospecting of endophytic bacteria from the Indian Himalayas and their role in plant growth promotion of maize (*Zea mays* L.). **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 0, n. 00, p. 1-10, 2021. <https://doi.org/10.7324/JABB.2019.70103>

RIBEIRO, V. P.; MARRIEL, I. E.; SOUSA, S. M.; LANA, U. G. P.; MATTOS, B. B.; OLIVEIRA, C. A.; GOMES, E. A. Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 40–46 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.06.005>

ROESCH, L. F. W.; PASSAGLIA, L. M. P.; BENTO, F. M.; TRIPLETT, E. W.; CAMARGO, F. A. O. Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** [online], v. 31, n. 6, p. 1367-1380, 2007. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832007000600015>

SACHS, J. L.; SKOPHAMMER, R. G.; REGUS, J. U. Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, p. 10800–10807, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100304108>

SANTOS, L. F.; OLIVARES, F. L. Plant microbiome structure and benefits for sustainable agriculture. **Current Plant Biology**, v. 26, 100198, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.cpb.2021.100198>

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C. J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; Van HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537–7541, 2009.

SEGATA, N.; IZARD, J.; WALDRON, L.; GEVERS, D.; MIROPOLSKY, L.; GARRETT, W. S.; HUTTENHOWER, C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. **Genome Biology**, v. 12, n. 6, 2011.

SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N. S.; WANG, J. T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks. **Genome Research**, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003.

SILVA, F. C.; SILVA, M. M.; LIBADI, P. L. Aplicação de nitrogênio no cultivo de milho, sob sistema plantio direto: efeitos na qualidade física do solo e características agrônômicas. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, p. 3513-3528, 2013.

<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Sup1p3513>

STEHFEST, E.; BOUWMAN, L. N₂O and NO emission from agricultural fields and soils under natural vegetation: summarizing available measurement data and modeling of global annual emissions. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, v. 74, p. 207–228, 2006.

<https://doi.org/10.1007/s10705-006-9000-7>

TILMAN, D.; BALZER, C.; HILL, J.; BEFORT, B. L. Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 108, n. 50, p. 20260-20264, 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116437108>

TOJU, H.; PEAY, K. G.; YAMAMICHI, M.; NARISAWA, K.; HIRUMA, K.; NAITO, K.; FUKUDA, S.; USHIO, M.; NAKAOKA, S.; ONODA, Y.; YOSHIDA, K.; SCHLAEPPI, K.; BAI, Y.; SUGIURA, R.; ICHIHASHI, Y.; MINAMISAWA, K.; KIERS, E. T. Core microbiomes for sustainable agroecosystems. **Nature Plants**, v. 4, n. 5, p. 247–257, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0139-4>

TRAN, T. M.; AMEYE, M.; DEVLIEGHERE, F.; SAEGEGR, S. D.; EECKHOUT, M.; AUDENAERT, K. *Streptomyces* Strains Promote Plant Growth and Induce Resistance Against *Fusarium verticillioides* via Transient Regulation of Auxin Signaling and Archetypal Defense Pathways in Maize Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, n. 755733, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.755733>

TURNER, T. R.; JAMES, E. K.; POOLE, P. S. The plant microbiome. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. 1-10, 2013. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-209>

ULLAH, A.; MUSHTAQ, H.; FAHAD, S. H.; HAKIM, S. A.; CHAUDHARY, H. J. Plant Growth Promoting Potential of Bacterial Endophytes in Novel Association with *Olea ferruginea* and *Withania coagulans*. **Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 119–127, 2017. <https://doi.org/10.1134/S0026261717010155>

UWAMAHORO, F.; BERLIN, A.; BUCAGU, C.; BYLUND, H.; YUEN, J. *Ralstonia solanacearum* causing potato bacterial wilt: Host range and cultivars' susceptibility in Rwanda. **Plant Pathology**, v. 69, n. 559-568, 2020. <https://doi.org/10.1111/ppa.13140>

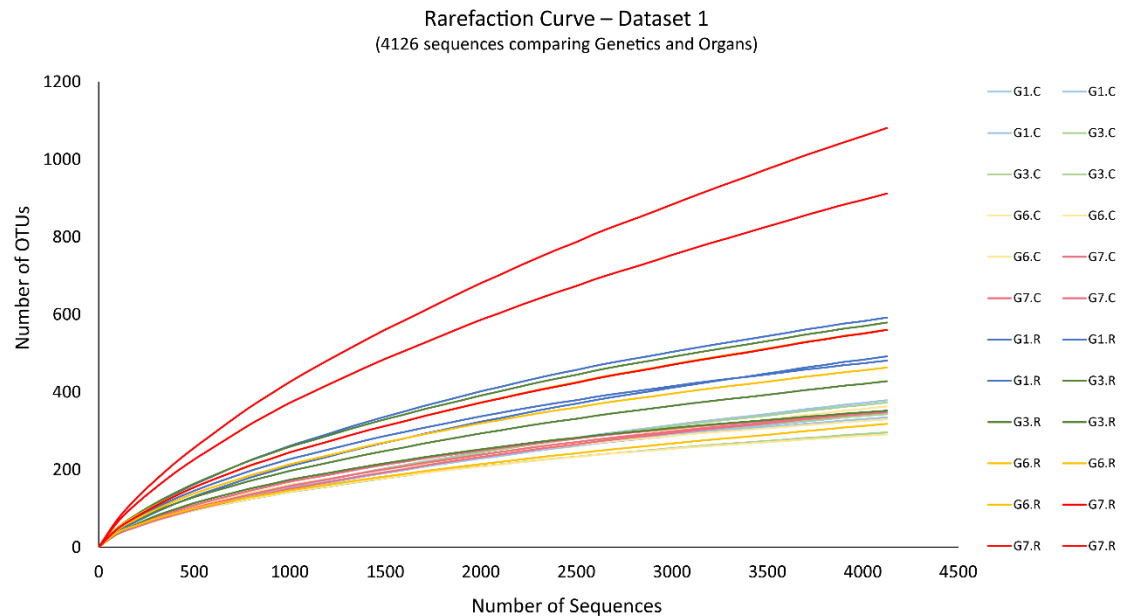
WAHYUDI, A. T.; PRIYANTO, J. A.; FIJRINA, H. N.; MARIASTUTI, H. D.; NAWANGSIH, A. A. *Streptomyces* spp. from rhizosphere soil of maize with potential as plant growth promoter. **Biodiversitas**, v. 20, n. 9, p. 2547-2553, 2019. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200916>

WARRAD, M.; HASSAN, Y. M.; MOHAMED, M. S. M.; HAGAGY, N.; AI-MAGHRABI, O. A.; SELIM, S.; SALEH, A. M.; ABDELGAWAD, H. A Bioactive Fraction from *Streptomyces* sp. Enhances Maize Tolerance against Drought Stress. **Journal Microbiology Biotechnol.** V. 30, n. 8, p. 1156–1168, 2020. <https://doi.org/10.4014/jmb.2003.03034>

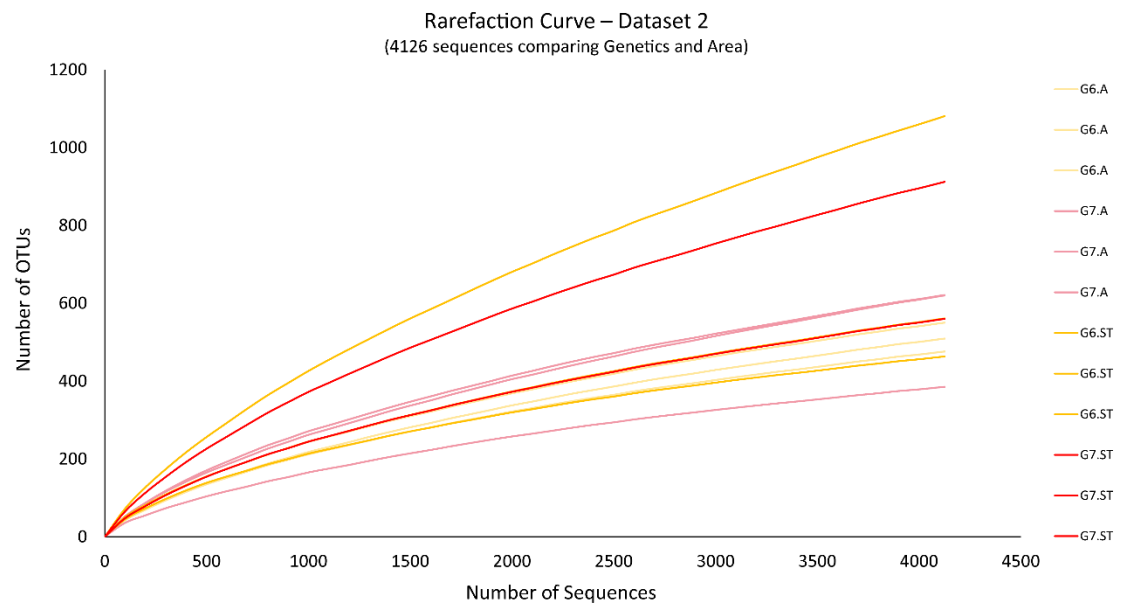
YANG, L.; YANG, K. Biological function of *Klebsiella variicola* and its effect on the rhizosphere soil of maize seedlings. **PeerJ**. n. 8, e9894, 2020. <https://doi.org/10.7717/peerj.9894>

ZHU, K.; YUAN, D.; ZHANG, X.; YANG, L.; LI, Y. The physiological characteristics and associated gene expression of sugar cane inoculated with *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 1, p. 1–9, 2017. <https://doi.org/10.1111/jph.12659>

S1. Curva de rarefação para a Alfa Diversidade de bactérias endofíticas em diferentes genótipos e compartimentos de plantas milho cultivados em Serra Talhada, Pernambuco, Brazil (MODELO I).



S2. Curva de rarefação para a Alfa Diversidade de bactérias endofíticas em diferentes genótipos e compartimentos de plantas milho cultivados em Araripina e Serra Talhas de Pernambuco, Brazil (MODELO II).



5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o crescente aumento da população mundial a demanda pela produção de alimentos é cada vez maior, sendo necessário cada vez mais a aquisição de fertilizantes nitrogenados industrial, que conseqüentemente traz danos severos ao meio ambiente. Com isso, é cada vez mais urgente o desenvolvimento de tecnologias ecologicamente corretas na produção agrícola, e a utilização de micro-organismos endofíticos tem ganhado um papel de destaque na agricultura moderna, não só pela disponibilização de nitrogênio, mas também, pela capacidade de alguns endófitos em promover o crescimento de plantas.

Nesta pesquisa, as informações a respeito da FBN em plantas de milho e a identificação da comunidade endofítica presente em diferentes compartimentos de diferentes genótipos de milho, refutaram as hipóteses mostrando o efeito positivo da associação de bactérias endofíticas nativas do solo com plantas de milho cultivadas em diferentes condições edafoclimáticas, chegando as seguintes considerações:

1. Os genótipos de milho recomendados para maior produtividade para a região Nordeste do Brasil apresentam potencial para se beneficiar da FBN, o que pode refletir na redução da utilização de fertilizantes nitrogenados industriais pelos produtores. Porém, os %N_{dda} são impactados pelas condições edafoclimáticas e estresse hídrico.
2. A técnica da abundância natural do ¹⁵N, apesar de ser de utilização mais difícil em gramíneas que em leguminosas, pode indicar genótipos de milho com maior aptidão de se beneficiar da FBN, informação útil em programas de melhoramento vegetal da cultura.
3. Os gêneros de bactérias endofíticas de maior ocorrência em raízes e colmos de milho são *Leifsonia*, *Bacillus*, *Klebsiella* e *Streptomyces*, independentemente do genótipo da planta ou das condições edafoclimáticas do local de cultivo.
4. A composição da comunidade de bactérias endofíticas diferem entre os compartimentos raiz e colmo, tendo a raiz maior diversidade, provavelmente devido aos compostos excretados por ela.
5. A microbiota nativa tem grande influência na composição das comunidades de bactérias endofíticas em plantas de milho.
6. As comunidades de bactérias endofíticas de plantas de milho não inoculadas abrigam gêneros com relatos de capacidade de promoção de crescimento de plantas, como produção

de fitohormônios, supressão de fitopatógenos, tolerância a fatores abióticos, solubilização de nutrientes e FBN.

7. O genótipo do milho não tem influência significativa sobre a composição das comunidades de bactérias endofíticas em suas raízes e colmos.