

UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

**Microrganismos em solos de *Vitis labrusca* L. e prospecção de um
isolado de *Paenarthobacter* como promotor de crescimento de plantas**

ANA LUISA GAYGER

Passo Fundo
2021

ANA LUISA GAYGER

Microrganismos em solos de *Vitis labrusca* L. e prospecção de um isolado de *Paenarthobacter* como promotor de crescimento de plantas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Agronomia.

Orientador:

Prof^o Dr^o Edson Campanhola Bortoluzzi

Coorientadora:

Prof^a Dr^a Fabiana Tonial

Passo Fundo
2021

CIP – Catalogação na Publicação

G286m Gayger, Ana Luisa

Microrganismos em solos de *Vitis labrusca* L. e prospecção de um isolado de *Paenarthobacter* como promotor de crescimento de plantas / Ana Luisa Gayger. – 2021.

72 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi.

Coorientadora: Profa. Dra. Fabiana Tonial.

Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, 2021.

1. Videira - Solo. 2. Micro-organismos do solo.
3. Crescimento (Plantas). 4. Paenarthobacter. I. Bortoluzzi, Edson Campanhola, orientador. II. Tonial, Fabiana, coorientadora. III. Título.

CDU: 634.8

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO



A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação.

“Microrganismos em solos de *Vitis labrusca* L. e prospecção de um isolado de *Paenarthobacter* como promotor de crescimento de plantas”

Elaborada por

Ana Luisa Gayger

Como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em
Agronomia – Produção e Proteção de Plantas

Aprovada em: 30/04/2021
Pela Comissão Examinadora



Dr. Edson Campanhola Bortoluzzi
Presidente da Comissão Examinadora
Orientador



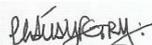
Dra. Tanise Sausen
Examinador – URI - Erechim



Dra. Fabiana Tonial
Coorientadora – UPF



Dr. Alexandre Augusto Nienow
Coord. Prog. Pós-Graduação em Agronomia



Dra. Cláudia Petry
Examinador – UPF



Dr. Eraldo Lourenso Zanella
Diretor FAMV

DEDICATÓRIA

À minha mãe e meu pai por todo o esforço de uma vida para que esse sonho um dia torna-se realidade. À minha irmã que forneceu um apoio valioso durante a longa jornada. Agradeço ao meu noivo Rômulo Pavan e filho Pietro pelo amor, convívio, grande apoio e compreensão da minha ausência em tempos alegres e tristes da nossa família.

À toda a minha família.

AGRADECIMENTOS

Com o passar do tempo estou mais certa que tenho sorte de ter encontrado pessoas maravilhosas no meu caminho por isso a palavra que mais quero escrever é GRATIDÃO!

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte dessa trajetória nesses últimos dois anos de pós-graduação, as lições aprendidas, as oportunidades que as pessoas e instituições me proporcionaram e a paciência de todos que fizeram parte para chegar até aqui.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha família, em especial minha querida mãe (Salete Gayger), meu pai (Clovis Luis Gayger), minha irmã (Claudia Regina Gayger), meus avós e minha sogra (Luisa Balbinot Pavan) e meu sogro (Pedro Primo Pavan) por toda força e incentivo para continuar nesse sonho por mim desejado desde a graduação.

Eu também gostaria de agradecer meu noivo, Romulo Miguel Balbinot Pavan, pelo amor, carinho, companheirismo, pelo inestimável apoio que me deu nesses quase sete anos de convívio, pela sua bondade e por tudo o que representa para mim e também para minha maior alegria de vida meu filho Pietro Miguel Pavan.

Muito especialmente, desejo agradecer a minha orientadora Fabiana Tonial, pela amizade, convivência, prestatividade, foco, paciência, dedicação e profissionalismo. Gostaria de agradecer os seus ensinamentos e orientação passados ao longo desses 2 anos, os quais com certeza contribuíram no desenvolvimento desse trabalho e na minha formação acadêmica e pessoal.

A professora Tanise Sausen por me receber no Laboratório Ecosis, pela excelente orientação e pelo agradável convívio.

Ao professor Edson Campanhola Bortoluzzi pelo auxílio no desenvolvimento do projeto.

Ao professor Diovane Freire Moterle pela ajuda na escolha das áreas de estudo e coleta das amostras de solo.

Aos colegas de laboratório Francine Falcão de Macedo Nava, Talita Mar e Cristhian Teixeira.

Aos colegas de sala, Grazielle, Renata, Monique, Tais e Luis pelo convívio e amizade.

Agradeço especialmente a Monique D'Agostini pelo apoio e sugestões para realização da dissertação.

Ao programa de pós-graduação de Agronomia da UPF pela oportunidade de realizar esse mestrado.

A universidade Uri Erechim pela infraestrutura e ambiente de trabalho.

A todos os funcionários da UPF e URI que de alguma forma ajudaram na realização desse projeto.

A CAPES, pela bolsa concedida.

A todos que de uma forma contribuíram para realização desse trabalho.

“Não importa o que aconteça, continue a nadar.”

(WALTERS, GRAHAM; PROCURANDO NEMO, 2003).

RESUMO

GAYGER, Ana Luisa. Microrganismos em solos de *Vitis labrusca* L. e prospecção de um isolado de *Paenarthrobacter* como promotor de crescimento de plantas. 70 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2021.

A filosfera da videira abriga leveduras, fungos filamentosos e bactérias que modulam substancialmente a saúde da planta e o crescimento e produção de uvas. Esses microrganismos podem ser provenientes do solo da vinha do ar, de precipitações, transportados por vetores animais (abelhas, insetos e pássaros). A diversidade e a composição bacteriana do solo estão associadas à localização geográfica do vinhedo também pelas influências significativas das propriedades físicoquímicas do solo, como textura, pH, temperatura, umidade, reservas de carbono e de nitrogênio. A manipulação bem-sucedida de comunidades microbianas contribui para melhorar o crescimento e a produção das plantas e também manter a fertilidade do solo. Com a perspectiva da importância dos microrganismos como um componente indispensável da agricultura sustentável, o presente estudo buscou (i) avaliar microbiota de áreas de *Vitis Labrusca* L. a partir das variações espaciais e temporais e (ii) selecionar e identificar um microrganismo com potencial para promoção de crescimento de planta. Para cada área de videira e fragmento florestal foram coletadas amostras individuais de solo em cinco pontos (nos quatro vértices e no centro) na camada de 0 a 10 cm utilizando trado de caneca com capacidade de 100 cm³, sendo assim obtidas amostras de solo compostas. Foi realizada a análise química do solo e o isolamento dos microrganismos em batata dextrose ágar (BDA) e ágar Mueller-Hinton (MH). A partir dos microrganismos obtidos, o isolado mais abundante, predominante, de crescimento rápido e com maior capacidade de sobrevivência a longo período (6 meses) em temperatura baixa (4°C) foi selecionado. O isolado bacteriano A1 foi identificado como *Paenarthrobacter* pela análise da sequência da região gênica rDNA 16S. Os ensaios de prospecção incluíram: solubilização de fósforo, solubilização de zinco, capacidade de inibição de fungo fitopatogênico in vitro, capacidade de germinação em sementes de milho e soja, experimentos em vasos com milho e soja. A partir de amostras de solo de cultivo de videira com diferentes anos de existência e de uma área nativa foi isolado e identificado o *Paenarthrobacter* A1. Esse microrganismo predominou em todas as amostras avaliadas, sendo mais incidente na área de um cultivo de 120 anos. O microrganismo prospectado apresenta potencial como bactéria promotora de crescimento de plantas por ser capaz de solubilizar fosfato e zinco, promover o aumento em massa fresca parte aérea (MFPA), massa seca parte aérea (MSPA), massa seca total (MST) e altura da planta de soja e de milho e o aumento de massa fresca de raiz (MFR) e massa seca de raiz (MSR) para o milho.

Palavras-chave: 1. *Paenarthrobacter*. 2. Solubilização de fosfato. 3. Microrganismo. 4. *Zea mays*. 5. *Glycine max*.

ABSTRACT

GAYGER, Ana Luisa. Microorganisms in soils of *Vitis labrusca* L. and prospection of a *Paenarthrobacter* locus as plant growth promoter. 70 f. Dissertation (Masters in Agronomy) - University of Passo Fundo, Passo Fundo, 2021

The phyllosphere of the vine harbors yeasts, filamentous fungi and bacteria that modulate plant health and the growth and production of grapes. These microorganisms can come from the soil of the vine from the air, from precipitation, transported by vector animals (bees, insects and birds). The diversity and bacterial composition of the soil are associated with the geographic location of the vineyard also due to influences belonging to the physical properties linked to the soil, such as texture, pH, temperature, moisture, carbon and nitrogen reserves. Well-defined manipulation of microbial communities contributes to improving plant growth and production and also maintaining soil fertility, an indispensable component of sustainable agriculture, the present study sought to (i) evaluate the microbiota of *Vitis Labrusca L.* areas from spatial and temporal variations and (ii) select and identify a microorganism with potential to promote plant growth. at c five points (on the four vertices and in the center) in the layer from 0 to 10 cm using t mug rack with a capacity of 100 cm³, thus prior to soil composites. Chemical analysis of soil and isolation of microorganisms on potato dextrose agar (BDA) and Mueller-Hinton agar (MH) were performed. From the microorganisms obtained, the most abundant, predominant, fast-growing isolate with the greatest capacity for long-term survival (6 months) at low temperature (4°C) was selected. The bacterial isolate A1 was identified as *Paenarthrobacter* by analyzing the sequence of the 16S rDNA gene region. Prospective tests included: phosphorus solubilization, zinc solubilization, in vitro phytopathogenic fungus inhibition capacity, germination capacity in corn and soybean seeds, experiments in pots with corn and soybean. From vine cultivation soil samples with different years of existence and from a native area, *Paenarthrobacter* A1 was isolated and identified. This microorganism predominated in all samples evaluated, being more frequent in the area of a 120-year cultivation. The prospected microorganism has potential as a plant growth-promoting bacterium as it is able to solubilize phosphate and zinc, promote the increase in aerial part fresh mass (MFPA), aerial part dry mass (MSPA), total dry mass (MST) and height of the soybean and corn plant and the increase in root fresh mass (MFR) and root dry mass (MSR) for corn.

Key words: 1. *Paenarthrobacter*. 2. phosphorus solubilization. 3. microorganism. 4. *Zea mays*.. 5. *Glycine max*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 <i>Importância dos microrganismos na ciclagem de nutriente</i>	16
2.2 <i>Prospecção de microrganismos do solo</i>	20
2.3 <i>Paenarthrobacter</i>	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 <i>Local da coleta</i>	27
3.1.1 <i>Característica das amostras</i>	28
3.1.2 <i>Procedimento de coleta</i>	29
3.2 <i>Análise química do solo</i>	29
3.3 <i>Isolamento dos microrganismos do solo</i>	30
3.4 <i>Seleção do microrganismo a ser prospectado</i>	31
3.5 <i>Caracterização do isolado selecionado</i>	31
3.6 <i>Identificação do isolado AI: Procedimento para amplificação da região gênica rDNA 16S e sequenciamento</i>	31
3.6.1 <i>Preparo da amostra</i>	31
3.6.2 <i>Extração de DNA</i>	32
3.6.3 <i>Quantificação do DNA</i>	32
3.6.4 <i>Técnica da PCR</i>	32
3.6.5 <i>Eletroforese em gel de agarose</i>	33
3.6.6 <i>Técnica de sequenciamento</i>	34
3.7 <i>Capacidade de solubilização de fosfato do isolado AI</i>	34
3.8 <i>Capacidade de solubilização de zinco do isolado AI</i>	35
3.9 <i>Capacidade de inibição de fungo fitopatogênico in vitro do isolado AI</i>	35
3.10 <i>Avaliação da capacidade de promoção de germinação de sementes de soja e de milho pelo isolado AI</i>	36
3.11 <i>Experimento em vasos com solo</i>	37
3.12 <i>Análise estatística</i>	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 <i>Análise química do Solo</i>	39
4.2 <i>Análise dos microrganismos do solo</i>	41
4.3 <i>Isolamento dos microrganismos e seleção do microrganismo a ser prospectado</i>	41
4.4 <i>Identificação do isolado AI</i>	45
4.5 <i>Prospecção do isolado AI</i>	45
4.6 <i>Capacidade de solubilização de fosfato</i>	46
4.7 <i>Capacidade de solubilização de zinco</i>	47

<i>4.8 Capacidade de inibição de fungo fitopatogênico in vitro</i>	48
<i>4.9 Avaliação da capacidade de promoção de germinação de sementes de soja e de milho pelo isolado A1</i>	48
<i>4.10 Experimentos em vasos com solo</i>	50
5. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXOS	70

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 50 anos, a utilização de fertilizantes químicos, manejo químico de pragas, métodos de irrigação e o desenvolvimento de variedades híbridas aumentaram a produtividade das culturas. No entanto, nas últimas décadas, a sustentabilidade da produção global de alimentos tem sido prejudicada gradativamente devido à redução da água disponível, à degradação do solo e da urbanização e o aumento da incidência de doenças e pragas. Além disso, outros fatores ambientais, como altas temperaturas e altas concentrações de dióxido de carbono causadas pela mudança climática global, representam uma ameaça crescente para a agricultura de hoje. Nessas circunstâncias, para atender à crescente demanda por alimentos, a ciência precisa continuar inovando, introduzindo tecnologias que aumentem a produtividade agrícola e tenham menores impactos negativos sobre o meio ambiente e a saúde humana. A agricultura mundial deve se desenvolver de uma forma mais sustentável e ecológica.

A filosfera da videira abriga leveduras, fungos filamentosos e bactérias que modulam substancialmente a saúde da planta e o crescimento e produção de uvas (BARATA et al., 2012; GILBERT et al., 2014). Esses microrganismos podem ser provenientes do solo da vinha (MORRISONWHITTLE; GODDARD, 2018; ZARRAONAINDIA et al., 2015), do ar, de precipitações, transportados por vetores animais (abelhas, insetos e pássaros) (FRANCESCA et al., 2012; GODDARD et al., 2010), ou residentes de ambientes próximos (KNIGHT; GODDARD, 2015; MORRISON-WHITTLE; GODDARD, 2018). Os micróbios associados à videira e transferidos para o mosto têm uma influência profunda na composição, sabor e qualidade da uva (BARATA et al., 2012).

A diversidade e a composição bacteriana do solo estão associadas à localização geográfica do vinhedo também pelas influências significativas das propriedades físicoquímicas do solo, como textura, pH, temperatura, umidade, reservas de carbono e

de nitrogênio (BURNS et al., 2015; ZARRAONAINDIA et al., 2015). A maioria dos táxons dominantes, como Proteobacteria, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes e Firmicutes, mostram maior abundância relativa em solos com menores teores de carbono ou nitrogênio, enquanto a abundância de actinobactérias nesses ambientes tende a ser negativa (BURNS et al., 2015).

O aproveitamento das funções do microbioma no contexto da produção agrícola tem grande potencial para fornecer soluções para os principais desafios atuais relacionados à segurança alimentar, degradação da terra e produção de safras (ROYAL AGRICULTURAL SOCIETY OF NSW, 2017; NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES AND MEDICINE, 2018). A interação dos microrganismos com as plantas, particularmente aqueles que habitam a rizosfera, inclui funções essenciais, como o fornecimento de nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre e micronutrientes (DOBEREINER, 1961; SCHMALENBERGER et al., 2008; STEWART, 1973) e retenção de água (LEHTO; ZWIAZEK, 2011). Com isso, o microbioma afeta o crescimento e/ou desenvolvimento da planta em vários estágios, incluindo germinação, morfogênese, floração, tendo, conseqüentemente, impacto na produtividade (MAYAK et al., 2004; WEYENS et al., 2009). Dada a contribuição substancial do microbioma para a aptidão de seu hospedeiro (ZILBER-ROSENBERG; ROSENBERG, 2008), conhecer e aplicar esses microrganismos pode ser a chave para o desdobramento de diversas restrições agrícolas e para alcançar o aumento da produtividade de forma sustentável.

A manipulação bem-sucedida de comunidades microbianas contribui para melhorar o crescimento e a produção das plantas e também manter a fertilidade do solo. Com a perspectiva da importância dos microrganismos como um componente indispensável da agricultura sustentável, o presente estudo buscou (i) avaliar microbiota de solos de *Vitis Labrusca L.* e fragmentos florestais a partir das variações espaciais e temporais e (ii) selecionar e identificar um microrganismo com potencial para promoção de crescimento de planta. Para isso, foram obtidos fungos e bactérias presentes em solos com cultivo de videira em diferentes condições e dentre eles, prospectado o isolado com

maior potencial biotecnológico como promotor de crescimento para as culturas de soja e milho. Nossos resultados destacam a importância de considerar a prospecção de microrganismos de solos de videira, principalmente pelas práticas de manejo e a alta aplicação de cobre desses solos onde resultou em um microrganismo prospectado altamente resistente a distúrbios ecológicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Nesta revisão serão apresentados conceitos relacionados a importância dos microrganismos na ciclagem de nutriente, interação microbiota - planta - solo - ambiente. Em seguida será abordado sobre promoção de crescimento de plantas e a influência microbiana, dinâmica do fósforo na cultura de soja e milho, potencial biotecnológico: Uso de inoculantes microbianos na agricultura e informações sobre a bactéria *Paenarthrobacter*.

2.1 Importância dos microrganismos na ciclagem de nutriente

Devido ao crescimento populacional a produção contínua de alimentos e de energia é um desafio cada vez maior (EDGERTON, 2009; RAY et al., 2013); o rendimento das safras precisa ser maior, mais sustentável e mais eficiente. A produtividade não é apenas o crescimento das plantas por hectare no campo. Também é definido por aptidão, produção de alimentos e desenvolvimento saudável das plantas (BOYER, 1982; EDGERTON, 2009). Embora os microrganismos do solo estejam associados a doenças das plantas e perdas de produtividade, inúmeras espécies de bactérias e fungos são benéficas para as plantas impactando na produtividade positivamente (PÉREZ-GARCÍA et al., 2011; VAN DER HEIJDEN et al., 2008; VENKATESHWARAN et al., 2013).

As comunidades microbianas do solo desempenham papéis fundamentais no funcionamento do ecossistema, especialmente porque a mineralização de material orgânico mediada por microrganismos contribui com uma grande parte dos nutrientes disponíveis para o crescimento das plantas (CLEVELAND et al., 2013) e ajudam a reduzir as perdas de nutrientes dos ecossistemas por lixiviação ou oclusão por ligação permanente em sumidouros geoquímicos (por exemplo, alumínio ou óxidos de ferro) (ARAÚJO et al., 2015). Como tal, o pool de nutrientes microbianos é importante devido à sua taxa de turnover comparativamente alta, o que aumenta a probabilidade de absorção da planta (SCHIMMEL; BENNETT, 2004).

Considerando a influência no estado nutricional das plantas, os microrganismos da rizosfera têm a capacidade de fixar nitrogênio, obter ferro por meio de sideróforos e

aumentar a biodisponibilidade do fósforo (HARDOIM et al., 2018). Além disso, a introdução de uma bactéria simbiótica na rizosfera também pode impactar na saúde das plantas por auxiliar na absorção de nutrientes que são importantes para o processo de fotossíntese e a assimilação de óxido de carbono (DOURADO et al., 2013). Endófitos de raiz podem produzir fitohormônios na forma de auxinas, bem como de giberelinas que têm função de promoção de crescimento de plantas como, por exemplo, raízes e parte aérea (BABALOLA, 2010). As interações microbianas com as plantas na rizosfera ou no tecido vegetal também têm o potencial de aumentar o desenvolvimento das plantas ao liberar fitormônios, remediar poluentes e aumentar a tolerância ao estresse biótico e abiótico (MENDES et al., 2013).

No ambiente as plantas vivem em interação com diferentes microrganismos, como resultado disso, esses organismos podem proteger as plantas hospedeiras contra invasores, fornecer nutrientes a elas, entre outros efeitos benéficos para o sistema (BEHERA et al., 2014). Essas relações resultam em impactos positivos no desenvolvimento vegetal e podem influenciar até no desenvolvimento da biomassa das plantas abaixo do solo, desempenhando papel significativo na sustentação das plantas e absorção de água e nutrientes.

Existem mecanismos usados para explicar a escolha da diversidade microbiana das plantas em solo rizosférico, teoricamente, a montagem da comunidade começa com a colonização aleatória e desregulada de táxons de locais próximos (isto é, mecanismos neutros), um mecanismo que continua ao longo da vida das raízes; enquanto a dinâmica ordenada (montagem do microbioma) ocorre por meio de seleção (ou seja, mecanismos baseados em nicho) quando (i) os exsudatos promovem taxa copiotrófica de crescimento rápido, (ii) sinais de raiz atraem simbiontes ou patógenos específicos, (iii) aumento da competição devido a recursos limitados a disponibilidade leva à classificação de espécies e (iv) a predação seleciona para características microbianas específicas entre os membros do microbioma (CHEN et al., 2020). Mendes et al. (2014) relataram que a soja escolhe um grupo microbiano particular na rizosfera com base em características funcionais que podem ser úteis para a planta em relação à absorção de nutrientes e aumento do crescimento. Esta habilidade de seleção da planta de soja pode ser explicada por hipóteses baseadas em nicho, mostrando a forte habilidade da planta

em determinar a riqueza e abundância de microrganismos na rizosfera e outras mudanças ecológicas como matéria orgânica, temperatura, cobertura vegetal que influenciam a diversidade microbiana.

O feijão comum cultivado em solo agrícola abrigou mais microrganismos exclusivos do que o feijão cultivado em solo nativo. Para o solo agrícola, as práticas de manejo (fertilização, adição de matéria orgânica) são os condutores mais prováveis das diferenças observadas na distribuição da abundância das espécies, enquanto os fatores edáficos, em particular o baixo pH, são as pressões de seleção mais prováveis para o solo nativo (PÉREZ - JARAMILLO et al., 2019).

Alguns microrganismos são promotores de crescimento vegetal, sendo os representantes identificados dentro de uma diversidade de gêneros, como *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Azospirillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* e outros. As bactérias são importantes por desempenhar funções como produção de reguladores de crescimento de plantas, solubilizadores de fósforo, biofertilizantes e elicitores de tolerância a estresses abióticos e bióticos (BHATTACHARYYA; JHA, 2012; YANG; KLOEPPER; RYU, 2009).

As características do solo exercem impactos substanciais na estrutura e na diversidade da comunidade microbiana (LAUBER et al., 2008; RASCHE et al., 2011; RICHTER et al., 2018). Uma ampla gama de variáveis edáficas, como pH, textura, umidade, temperatura, carbono orgânico e conteúdo de nutrientes foram reconhecidos por influenciar na composição e na diversidade das comunidades microbianas do solo (BROCKETT et al., 2012; COOKSON et al., 2007; ROUSK et al., 2010).

Dentre essas variáveis, o pH é considerado o principal preditor de composição e diversidade da comunidade bacteriana no solo (FIERER, JACKSON, 2006; ROUSK et al., 2010; ZHALNINA et al., 2015). A textura do solo, particularmente o conteúdo de argila e silte, está intimamente relacionado ao estoque de carbono orgânico do solo (SAUSEN et al., 2014) e à disponibilidade de nutrientes, e é um fator chave da composição e diversidade da comunidade microbiana (HANSEL et al., 2008; KALLENBACH et al., 2016). O microbioma edáfico também pode ser afetado pelo conteúdo de nutrientes do solo (KOYAMA et al., 2014), a adição de fertilizantes nitrogenados e fosfatados, por exemplo, aumenta as razões de ácidos graxos que

possibilitam o seu desenvolvimento como por exemplo grau de saturação dos ácidos graxos presentes na membrana (DONG et al., 2015) e altera a diversidade microbiana (LEFF et al., 2015).

Os microrganismos podem ser distribuídos por forças físicas, como o ar e o vento (ZHU et al., 2017) e a sua incorporação em nuvens e precipitação aumenta a dispersão em longas distâncias (HAMILTON; LENTON, 1998). Por isso, o clima, fator ambiental importante para a produção de uva, também exerce influência na incidência microbiana. A microbiota do mosto de uva apresenta padrões de distribuição regional que são significativamente condicionados pelos ambientes locais (como temperatura e precipitação). Por exemplo, temperaturas máximas estão negativamente associadas com a presença de *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* e *Leuconostocaceae* (BOKULICH et al., 2014). A chuva e a umidade correlacionam-se positivamente com *Hanseniasporae* e *Metschnikowia*, e negativamente com *Torulaspora*, *Saccharomyces* e *Meyerozyma* (JARA et al., 2016).

A diversidade e a composição bacteriana do solo estão associadas à localização geográfica do vinhedo também pelas influências significativas das propriedades físico-químicas do solo, como textura, pH, temperatura, umidade, reservas de carbono e de nitrogênio (BURNS et al., 2015; ZARRAONAINDIA et al., 2015). A maioria dos táxons dominantes, como *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gemmatimonadetes* e *Firmicutes*, mostram maior abundância relativa em solos com menores teores de carbono ou nitrogênio, enquanto a abundância de actinobactérias nesses ambientes tende a ser negativa (BURNS et al., 2015).

Capacidades metabólicas microbianas enriquecidas em raízes de videira em comparação com solos incluíram características previamente identificadas como favorecendo o movimento ou atração de bactérias em direção a exsudatos de raiz (VASSILEV et al., 2015) e genes que codificam o metabolismo de macro e micronutrientes (K, S, P e Fe), bem como tolerância ao estresse de plantas e resistência a metais pesados. A aquisição de fósforo é um fator de virulência conhecido e uma potencial assinatura de crescimento vegetal, uma vez que bactérias não patogênicas produtoras de sideróforos reduzem a disponibilidade de fósforo, restringindo o

crescimento da planta, portanto, pode beneficiar a planta para aumentar a produção de sideróforos na raiz e na zona da raiz.

A localização de taxa bacteriana associada ao vinhedo tem implicações para os viticultores que acreditam que a "terra" confere uma qualidade única ao vinho específico para aquele local de cultivo, chamado de terroir. Esses resultados sugerem que a biogeografia local da microbiota do solo também pode ter uma influência indireta (VASSILEV et al., 2015). Assim levando em conta uma microbiota a ser estudada para promoção de crescimento planta por suas características espaciais e temporais.

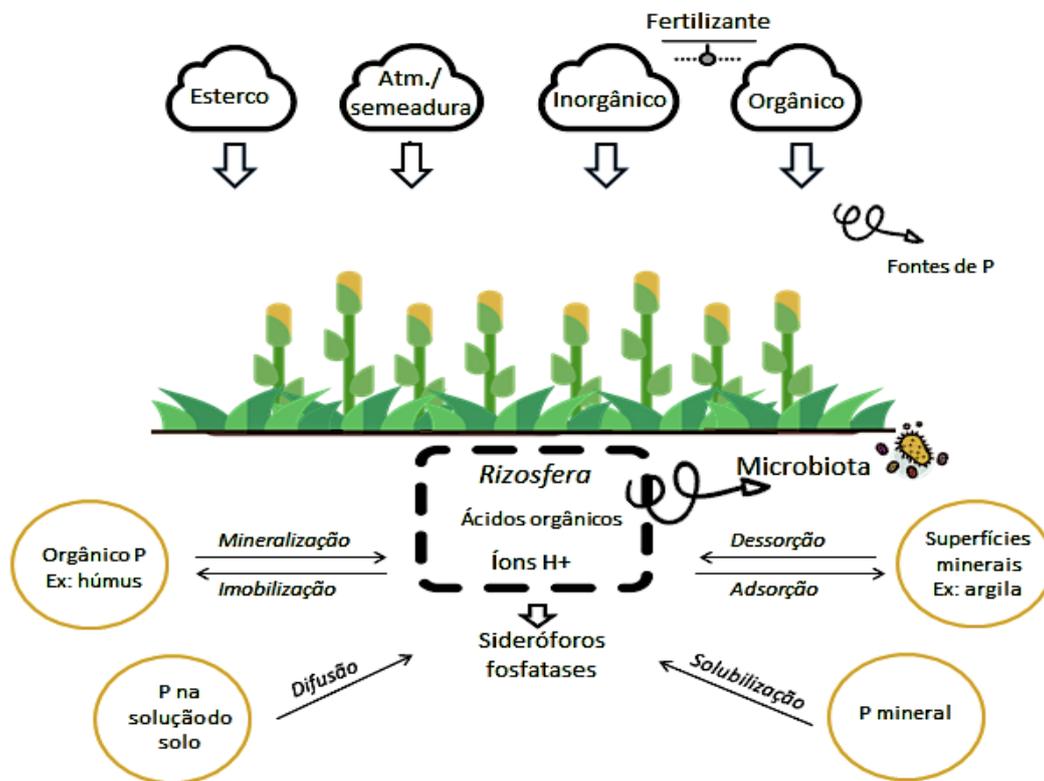
2.2 Prospecção de microrganismos do solo

A alta demanda por fertilizantes é consequência da necessidade de expansão na produção de alimentos (KHAN et al., 2007). A aplicação de fertilizantes é uma atividade rotineira na produção agrícola para promover o crescimento da cultura e aumentar a produtividade. O papel do fósforo nas plantas está relacionado a processos bioquímicos básicos: fotossíntese, produção de energia, transdução e resistência a doenças (KHAN et al., 2014). Milho e soja são as culturas que mais recebem fertilizantes fosfatados (WITHERS et al., 2018).

O fósforo (P) é considerado um macronutriente essencial e, dependendo de sua disponibilidade, pode influenciar no crescimento das plantas devido às suas propriedades estruturais, funcionais e metabólicas (STAUFFER; SULEWSKI 2004). Esse elemento é encontrado em solos nas formas orgânica e inorgânica (Figura 1). Apesar dos grandes estoques de fósforo em terras agrícolas, a sua disponibilidade para as plantas é influenciada por processos biogeoquímicos (MARTINAZZO et al., 2007). O P é aplicado ao solo na forma de fertilizantes fosfatados. Cerca de 5 a 30% dos fertilizantes fosfatados aplicados aos solos são aproveitados pelas plantas e uma parte significativa é reduzida por reações físico-químicas no sistema (TROLOVE et al., 2003). O fósforo é o segundo nutriente mais importante para o crescimento das plantas, sendo nitrogênio o primeiro. Esse elemento é essencial em todos os sistemas vivos. As plantas adquirem fósforo da solução do solo na forma de ânion fosfato (Figura 1). É o elemento menos móvel na planta e no solo em comparação com outros macronutrientes.

Os microrganismos presentes no solo podem desempenhar um papel importante no aumento da disponibilidade de nutrientes para as plantas. Bactérias e fungos são capazes de mineralizar fosfatos orgânicos e solubilizar fosfatos inorgânicos. A solubilização do fosfato pode ser obtida por meio de vários mecanismos, como hidrólise ou processos envolvendo enzimas como fosfatases. As fosfatases produzem ácidos orgânicos e inorgânicos e ocorre a redução do pH, formação de dióxido de carbono e redução enzimática de metais (BASHAN et al., 2017) (Figura 1).

Figura 1. Esquema mostrando as várias entradas de fósforo no solo e a complexa dinâmica de P dentro do solo, flechas azuis representam a entrada de fósforo no solo, flechas pretas representam a dinâmica de P no solo



Fonte: Autora, 2020.

O fornecimento de P para as plantas por meio de insumos biológicos é uma alternativa sustentável e viável, já que o P solúvel é liberado a partir de reações de solubilização de fosfatos insolúveis envolvendo diversos microrganismos (MARSCHNER; DELL, 1994). Muitos estudos sobre microrganismos evidenciam a

capacidade desses como solubilizadores de fosfato (PSM) e demonstram tanto aumento no rendimento das plantas quanto aumento na absorção de fósforo através de experimentos em vasos e em condições de campo.

No estudo de Bononi (2020), isolados de *Trichoderma* foram capazes de solubilizar o fosfato, esses fungos produziram diferentes ácidos orgânicos durante o processo de solubilização e as cepas apresentaram respostas positivas na promoção do crescimento da soja de 2,1% para 41,1%. Também foi concluído por Qin (2011) que a inoculação de rizóbio pode aumentar a aquisição de P na soja, especialmente em solos onde Ca-P é a fonte primária de P, o mecanismo primário para a solubilização de P mediada por rizóbio parece ser via remobilização de Pi de raízes noduladas através da acidificação rizosférica. *Aerococcus* sp., *Aspergillus terreus*, *Aspergillus* sp. (SRINIVASAN et al., 2012) são capazes de solubilizar o fosfato em diferentes concentrações de NaCl. Os benefícios de adotar o manejo microbiano da rizosfera em um contexto de produção agrícola sustentável incluem o aumento da biodisponibilidade de fosfato, estímulo do crescimento das raízes e dos brotos, melhorando comprimento da raiz e do rebento, aumento no peso dos rebentos frescos e secos, e melhoria dos rendimentos de grãos e de matéria seca (RODRÍGUEZ; FRAGA, 2002).

A aplicação de microrganismos como inoculante é uma abordagem promissora para auxiliar na produção agrícola; essas aplicações têm contribuído para o crescimento de várias espécies de culturas. O sucesso dessa tecnologia é resultado da melhora no desenvolvimento da planta induzido por microrganismos promotores do crescimento que podem estimular a produção de hormônios vegetais, fixar N₂, produzir amônia, solubilizar fosfato mineral e outros nutrientes essenciais e controlar microrganismos fitopatogênicos (TANK; SARAF, 2003).

Bactérias não patogênicas se associam às raízes das plantas e podem aumentar a tolerância das plantas a estresses abióticos (DIMKPA et al., 2009). Colonização de raízes por bactérias induzem a expressão de ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato-deaminase), que reduz o nível de etileno e confere resistência ao estresse, convertendo ACC em amônia e α -cetobutirato (GLICK et al., 1998). Além disso, as bactérias induzem resistência através do sistema de defesa das células vegetais que produzem diferentes antioxidantes, como superóxido dismutase, polifenol total, flavonas,

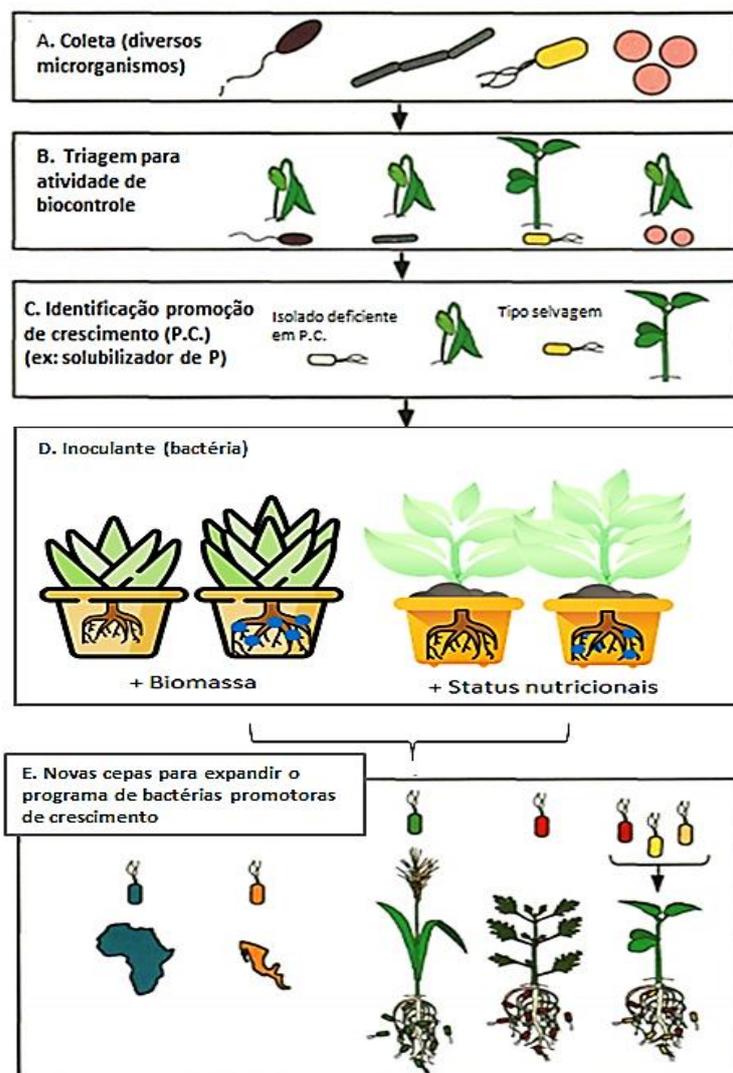
hormônios vegetais (KARTHIKEYAN et al., 2007). O aumento na resistência natural das plantas contra doenças induzido por inoculantes microbianos é uma alternativa para reduzir o uso de fungicidas e de pesticidas (MUELLER; SACHS, 2015).

Da mesma forma, fertilizantes de base microbiana (biofertilizantes) podem ser aplicados em sementes, nas plantas ou no solo promovendo a agricultura orgânica por substituir os fertilizantes químicos ou por aumentar a eficiência do uso de nutrientes inorgânicos, como o P. Os biofertilizantes potencializam o fornecimento de nutrientes às plantas por aproveitar a capacidade natural dos microrganismos em mineralizar, solubilizar e mobilizar nutrientes (MÄDER et al., 2002; QIU et al., 2012), com isso é possível reduzir os custos associados às aplicações frequentes de fertilizantes (SINGH, 2017).

Embora o uso de inoculantes microbianos na agricultura reduza muitos problemas associados às demandas da agricultura extensiva, seu sucesso enfrenta alguns desafios metodológicos, técnicos e teóricos importantes. A introdução de inoculantes microbianos em sistemas agrícolas deve superar os problemas de colonização e de manutenção dos microrganismos introduzidos no novo ambiente. Os mecanismos responsáveis pela diminuição do número e da atividade do inoculante incluem o estado fisiológico das células inoculantes, bem como as interações bióticas no solo (competição com microrganismos indígenas do solo), propriedades edáficas contextuais (textura, pH, temperatura, teor de umidade) e disponibilidade de substrato adequada (VAN VEEN et al., 1997).

As práticas agronômicas baseadas no uso intensivo de agroquímicos podem afetar diretamente e indiretamente, por meio de mudanças no microbioma indígena e no pH do solo, a eficácia dos inoculantes (TRIVEDI et al., 2017; SINGH; TRIVEDI, 2017). O sucesso dos bioinoculantes depende da capacidade desses microrganismos superar as condições desfavoráveis ou instáveis do solo, competir com sucesso com os microrganismos indígenas, contemplar as preferências de seleção de plantas e serem capazes de se estabelecer, proliferar e permanecer ativo. A produção de um inoculante microbiano demanda várias etapas (Figura 2) e sua efetividade depende do protocolo e do rigor em sua aplicação.

Figura 2. Esquema mostrando as etapas envolvidas na obtenção de um inoculante bacteriano capaz de promover o crescimento de plantas, incluindo o isolamento (A), seleção (B), identificação e prospecção do microrganismo (C e D)



Fonte: Adaptado de HANDELSMAN, 1996.

2.3 Paenarthrobacter

Paenarthrobacter é um gênero de bactéria Gram-positiva que inclui várias espécies bacterianas anteriormente incluídas no gênero *Arthrobacter* (BUSSE et al., 2016). As cepas de *Arthrobacter* foram selecionadas pela primeira vez em solos no século 19 (KOCH et al., 1995) e são bactérias aeróbias indígenas frequentemente isoladas de solos (HAGEDORN et al., 1975). Essas bactérias geralmente aparecem como bastonetes Gram-negativos em culturas mais jovens e como cocos Gram-positivos em culturas mais antigas. A alteração na morfogênese dessas bactérias tem sido associada com a sua capacidade de sobreviver a estresses, sendo que quando em estado semelhante a um cocóide apresenta-se mais estável. A transição para a forma de coco é dependente de manganês, e o acúmulo desse metal no citoplasma bacteriano foi relacionado à sobrevivência do estresse por radiação em *Deinococcus radiodurans* e outras bactérias (DALY et al., 2004). A base molecular para seu método distinto de crescimento não é conhecida. Devido à sua aparência pleomórfica e heterogênea, cepas de *Arthrobacter* foram originalmente agrupadas com *Corynebacteria*. No entanto, análises sistemáticas indicam que os membros do gênero *Arthrobacter* são taxonomicamente agrupadas com as *Micrococcaceae* pela alta composição de G+C (KEDDIE et al., 1981).

Arthrobacter sp. são encontradas em solos comuns e em ambientes extremos, como camada profunda do solo, gelo ártico, locais quimicamente contaminados e ambientes radioativos (FONG et al., 2001; FREDRICKSON et al., 2004). A prevalência ambiental de *Arthrobacter* pode ser explicada devido sua capacidade de sobreviver por longos períodos sob condições estressantes, como falta de nutrientes, mudanças de temperatura, radiação ionizante, radicais de oxigênio e produtos químicos tóxicos (BOYLEN, 1973). Esta notável capacidade de sobrevivência é evidenciada pela recuperação de isolados de *Arthrobacter* sp. em solos do deserto da Antártica

(CAMERON et al., 1971). Poucos estudos evidenciam a capacidade de *Paenarthrobacter* em promover o crescimento vegetal (GHASEMI et al., 2018; PARDO et al., 2017) e muitos evidenciam a capacidade de crescer na presença de metais pesados (OJEDA et al., 2017). Portanto, até que ponto esse gênero bacteriano “resistente” tem impacto no crescimento e na saúde das plantas?

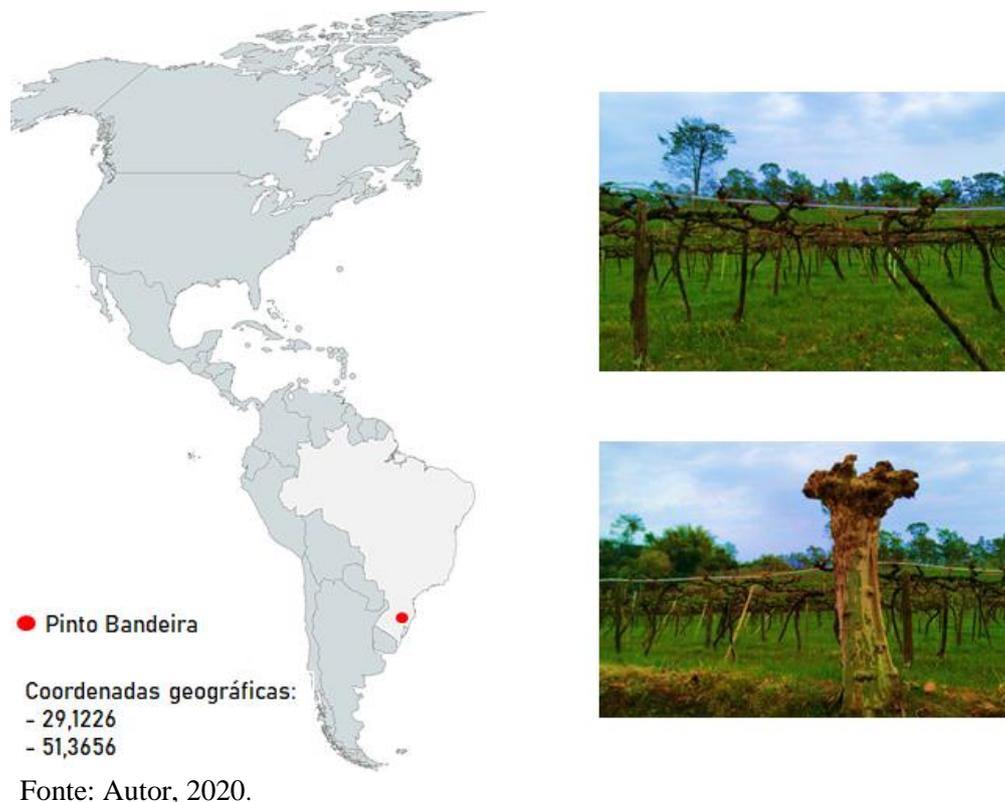
3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de virologia vegetal do departamento de Biotecnologia e Recursos Genéticos da Universidade de Passo Fundo (UPF) na cidade de Passo Fundo/RS, em conjunto com o laboratório de Ecologia e Sistemática Vegetal da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai (URI), na cidade de Erechim/RS Erechim/RS.

3.1 Local da coleta

A coleta de solo foi realizada no município de Pinto Bandeira, estado do Rio Grande do Sul, sul do Brasil. O clima da região é subtropical úmido, com temperatura média anual de 17,3 °C e precipitação média anual de 1700 mm. A geologia da região consiste predominantemente de rocha basáltica, mas rhyodacite é a rocha predominante no local do estudo, rochas de origem vulcânica que produzem horizontes rasos a pouco profundos. A topografia da região é relevo montanhoso com 20 a 30 % declive. No século XVIII, esta região foi ocupada por italianos imigrantes que cultivavam plantações como vinhas. Todas as amostras foram coletadas entre altitude 501 metros (1624,51 pés) e 566 metros (1802,85 pés) (Figura 3).

Figura 3. Local da coleta de solo: três áreas de videira e um fragmento de floresta nativa em Pinto Bandeira - RS, Brasil.



3.1.1 Característica das amostras

Foram selecionadas para o estudo quatro parcelas com características distintas: um vinhedo centenário com uma área de 1,3 ha cultivada desde 1890 sem substituir as vinhas; um vinhedo de 60 anos; um vinhedo de 12 anos com uma área de 2,0 ha; e uma área nativa. A variedade Isabel estava presente em todas as áreas de cultivo a 1,5 m entre a densidade de plantas e 3 m entre o espaçamento entre linhas no “tendão” sistema de colheita para produção de suco e vinho. A gestão das plantas foi em um sistema tradicional com poda, adubação e colheita. Nos históricos de todas as áreas com o cultivo de videira há evidências de uso de: Cercobini[®], Titanium e Curathane[®] (Tabela1).

Tabela 1. Tratamentos utilizados nas áreas de cultivo de videira

Princípio Ativo	Nome Comercial	Concentração
Tiofanato Metílico	Cercobini®	70g/ 100L
N, P, k, Ca, Mg, B, Cu, Mn, Zinco Aminoácidos	Titanium	5%, 8%, 5%, 1%, 0,6 , 0,04, 0,02%, 0,5%, 1%
Mancozeb + Cimoxanil	Curathane®	462 g/L , 63,4 g/L
Sulfato de cobre		990 g/kg

Fonte: Laboratório de análises.

3.1.2 Procedimento de coleta

Para cada parcela foram coletadas amostras individuais de solo em cinco pontos (subamostras com 1 kg de solo) na camada de 0 a 10 cm utilizando trado de caneca com capacidade de 100 cm³, sendo assim foram obtidas amostras de solo compostas. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, identificadas e encaminhadas ao Laboratório de Virologia da Universidade de Passo Fundo.

3.2 Análise química do solo

As análises químicas das amostras de solo foram realizadas pelo laboratório de solo da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). Localizado no Câmpus II, bairro Demoliner, RS 331, Km 02, Erechim. As análises realizadas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2. Análises químicas das áreas de videira e fragmento de floresta nativa

Análises químicas do solo

Acidez ativa e potencial

Análise de fósforo e potássio

Avaliação da matéria orgânica do solo

Avaliação da argila do solo

Análise de alumínio, cálcio, magnésio e manganês

Análise de zinco e cobre

Análise de boro

Análise de enxofre

Capacidade de troca de cátions

Fonte: Autora, 2021.

3.3 Isolamento dos microrganismos do solo

Foi preparada uma diluição decimal em série, adicionando-se 1 g de amostra de solo composta em frasco contendo 9 mL de solução salina esterilizada, com 0,85 % NaCl. Após a agitação da mistura por 2 minutos, foi preparada, a partir desta, as diluições 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4 pela transferência de (1000 uL) da suspensão mais concentrada para outro tudo de ensaio contendo 9 mL de solução salina. De cada diluição foi retirada uma alíquota de 100 uL com o auxílio e micropipeta e realizada a inoculação na superfície do meio solidificado, realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky. Foram utilizadas as placas referentes às diluições 10^3 e 10^4 para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) dos microrganismos, por essas apresentarem de 10 a 100 colônias por placa. Os meios de cultura utilizados foram batata dextrose ágar (BDA) para o isolamento de fungos e ágar Mueller-Hinton (MH) para o isolamento de bactérias. Para cada diluição da amostra foi realizado o plaqueamento em triplicata. As placas foram incubadas a 28 °C, durante 7 dias para bactérias e 15 dias para fungos, as UFC de fungos e de bactérias foram contadas diariamente. O ensaio seguiu o delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições combinando-se dois meios de cultura (BDA e ágar MH). 24 amostras de solos de 4

áreas distintas (videira 12 anos, videira 60 anos, videira 120 anos, área nativa) e duas diluições (10^3 e 10^4) em triplicatas, totalizando 288 placas.

3.4 Seleção do microrganismo a ser prospectado

Foi selecionado o isolado mais abundante, predominante, de crescimento rápido e com maior capacidade de sobrevivência a longo período (6 meses) em temperatura baixa (4 °C). Para controle dos ensaios de prospecção do isolado (A1) foram utilizados: a cepa ATCC6633 de *Bacillus subtilis* (BC1) e o isolado JUPF3 de *Bacillus* (BC2).

3.5 Caracterização do isolado selecionado

O isolado foi caracterizado macroscopicamente pela avaliação macroscópica da colônia crescida em ágar MH após 24 horas de incubação a 27 °C considerando os seguintes aspectos: coloração, tamanho, produção de muco, consistência da massa, forma da colônia, detalhes ópticos, borda da colônia, superfície da colônia.

Microscopicamente, o isolado foi classificado pela coloração de Gram em forma e característica tintorial.

3.6 Identificação do isolado A1: Procedimento para amplificação da região gênica rDNA 16S e sequenciamento

3.6.1 Preparo da amostra

Apartir da placa de cultura pura da bactéria em ágar MH foi selecionada uma colônia isolada para o preparo da suspensão de células. Em microtubo plástico foi preparada aproximadamente 1,0 mL de suspensão bacteriana em solução salina 0,85% e armazenada em geladeira até a extração de DNA.

3.6.2 Extração de DNA

Para extração do material genético foi utilizado o Kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 14.000 x g por 2 min e o sobrenadante descartado. Na sequência foi adicionado 600 µL de “Nuclei Lysis Solution” e agitado em vortex por 3 seg, seguido de incubação a 65 °C por 15 min. Foi deixado esfriar por 5 min, adicionado 200 µL de “Protein Precipitation Solution” e agitado em vortex por 20 seg em alta velocidade. Foi realizada uma nova etapa de centrifugação a 14000 x g por 4 min e 700 µL do sobrenadante transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 600 µL de isopropanol (temperatura ambiente). Os tubos foram invertidos delicadamente até o DNA se tornar visível, o material foi centrifugado a 14000 x g por 3 min, o sobrenadante desprezado invertendo o tubo e, então, adicionado 600 µL de álcool 70 % (temperatura ambiente). O tubo foi invertido algumas vezes até desprender o pellet de DNA e centrifugado a 14000 x g por 2 min. Desprezou-se o álcool 70 % cuidadosamente, evitando que o pellet se desprende-se do fundo do microtubo. O tubo foi invertido em papel absorvente limpo e deixado secar por 15 min, foi adicionado 50 µL de “DNA Rehydration Solution”. O material foi incubado à 65 °C por 1 h e agitado levemente.

3.6.3 Quantificação do DNA

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop ThermoScientific® modelo 2000) com a determinação de absorbância a 260 nm e 280 nm. A amostra foi homogeneizada e quantificada duas vezes; para as variações maiores que 10% entre as duas leituras, realizou-se uma terceira leitura, sendo consideradas as duas leituras mais próximas para cálculo do valor médio, por média aritmética simples.

3.6.4 Técnica da PCR

O mix da reação foi preparado com os reagentes descritos nas Tabelas 3 e 4, distribuído em microtubos (0,2 mL) com a amostra, do mesmo modo foi preparado o

negativo (branco do mix). As amostras foram submetidas às seguintes condições de amplificação no termociclador:

- 1 ciclo – 94 °C 2 min;
- 40 ciclos – 95 °C 15 s, 63 °C 30 s, 72 °C 1 min e 30 s;
- 1 ciclo – 72 °C 5 min.

Tabela 3. Lista de reagentes e volumes utilizados para técnica de PCR

Reagentes	Volume (µL)
Água ultrapura	9,88
Tampão	1,50
MgCl ₂	0,60
dNTPs	0,30
8F	0,30
1492R	0,30
Enzima Taq Polymerase	0,12
Amostra	2,00
Mix	13,00
Total	15,00

Fonte: Adaptado de Agrônômica – Laboratório de diagnóstico fitossanitário e consultoria, 2020.

Tabela 4. Sequência de primers utilizados na amplificação do DNA bacteriano

Primer	Tipo de amostra	Sequência	Produto
8F	Bactéria	5' GAAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	1500 pb
1492 R		5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'	

Fonte: Adaptado de Agrônômica – Laboratório de diagnóstico fitossanitário e consultoria, 2020.

3.6.5 Eletroforese em gel de agarose

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1 %) com tampão TBE 0,5x. Foi aplicado aproximadamente 0,6 µL de corante Blue Green Loading Dye em 5 µL do produto da reação. Foi utilizado o marcador de peso molecular Ladder 1 Kb Plus (1,5 µL de marcador + 0,6 µL de corante), a cuba foi fechada e a voltagem ajustada para 90 V e tempo de 80 minutos, para migração do produto da PCR/RT-PCR. Os produtos da eletroforese foram visualizados em transluminador equipado com luz ultravioleta.

3.6.6 Técnica de sequenciamento

A purificação do produto da PCR foi realizada conforme a bula do Kit de purificação ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega). Além do kit, foi necessário um banho-maria a 50-65 °C e isopropanol 100%. A concentração do produto da PCR foi realizada em Nanodrop, sendo indicado o sequenciamento para amostras com 30 a 60 ng. A qualidade das sequências foi analisada no programa Mega Software. A sequência consenso foi comparada com outras disponíveis em bancos de dados disponíveis utilizando a ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local (Blastn). O banco de dados utilizado para a análise de sequências foi a National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.7 Capacidade de solubilização de fosfato do isolado A1

Foram preparadas suspensões bacterianas em solução fisiológica a partir do isolado A1 e dos controles BC1 e BC2, ajustadas a uma densidade óptica de 1,0 em 600nm, aproximadamente 10^8 células/mL. Os inóculos bacterianos foram depositados com uma pipeta de 1µL sobre o meio sólido Pikovskaya (PVK), meio de dissolução de fósforo orgânico. As placas foram incubadas a 28 °C e examinadas periodicamente em intervalos de 24 horas por 10 dias. Os ensaios seguiram o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições e três tratamentos. A avaliação da solubilização de P foi feita por medição, com o auxílio de uma régua, do diâmetro do halo translúcido que se formou em torno da colônia bacteriana e o diâmetro da colônia. O índice de solubilização (SI) foi calculado da seguinte forma:

$$SI = \frac{\text{Diâmetro da zona de liberação}}{\text{Diâmetro da colônia}}$$

3.8 Capacidade de solubilização de zinco do isolado A1

Foram preparadas suspensões bacterianas em solução fisiológica a partir do isolado A1 e dos controles BC1 e BC2, ajustadas a uma densidade óptica de 1,0 em 600nm, aproximadamente 10^8 células/mL. Os inóculos bacterianos foram depositados com uma pipeta 1µL em placas de Petri com meio de cultura sólido contendo 10 g/L de glicose, 1 g/L de sulfato de amônio, 0,2 g/L de cloreto de potássio, 0,1 g/L de fosfato dipotássio, 0,2 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado, 1 g/L de óxido de zinco, 15 g/L de ágar, 1 L de água destilada (pH 7,0) e incubadas a 30 °C e examinadas periodicamente em intervalos de 24 horas por 10 dias. Os ensaios seguiram o delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições e três tratamentos. A avaliação da solubilização de zinco foi feita por medição, com o auxílio de uma régua, do diâmetro do halo translúcido que se formou em torno da colônia bacteriana.

3.9 Capacidade de inibição de fungo fitopatogênico *in vitro* do isolado A1

A avaliação do potencial de antagonismo do isolado A1 foi realizada por uma adaptação do método de pareamento de culturas qualitativo descrito por Romeiro (2007). Para tanto, foram preparadas placas de petri contendo meio BDA com crescimento dos fungos fitopatogênicos *Fusarium* e *Colletotrichum* por 10 dias e do possível antagonista (isolado A1). Depois de obtido um crescimento satisfatório dos microrganismos, em outras placas de BDA, foi depositado um disco (0,5 cm de diâmetro) de micélio do fungo no centro da placa contendo meio BDA. Com o auxílio de uma alça de platina, foi transferido para a mesma placa contendo o fitopatógeno, o isolado bacteriano A1 em dois pontos equidistantes na borda da placa. As placas foram incubadas a 27 °C e examinadas periodicamente em intervalos de 24 horas através da tomada de duas medidas em eixos ortogonais da colônia do fitopatógeno até que o patógeno atingisse as bordas da placa de controle. O fitopatógeno *Fusarium* teve seu crescimento mensurado por até 120 horas e o *Colletotrichum* por até 96 horas. Os ensaios seguiram o delineamento inteiramente casualizado com dois tratamentos e cinco repetições.

3.10 Avaliação da capacidade de promoção de germinação de sementes de soja e de milho pelo isolado A1

O teste de germinação foi conduzido conforme as Regras para Análise de Sementes (RAS) para cada tratamento: testemunha sem inóculo, tratamento com isolado BC1 e tratamento com o isolado A1. Foram preparadas suspensões bacterianas em solução fisiológica do isolado A1 e do controle BC1 a uma concentração de 5×10^9 UFC/mL. Os inoculantes foram depositados em sacos plásticos, onde se acondicionou também as sementes de milho ou de soja e, posteriormente, realizada a agitação dos sacos plásticos por 1 minuto, atingindo cobertura homogênea sobre as sementes. Para o teste de germinação, 50 sementes tratadas foram dispostas em uma folha de papel germitest umedecida com água destilada em quantidade duas vezes a do peso do papel e, posteriormente, coberta com mais uma folha de papel germitest, da mesma forma umedecida e depois enrolada. Cada parcela foi constituída de 5 rolos, embrulhadas posteriormente em um único rolo, totalizando 250 sementes por parcela. Foram dispostas na posição vertical dentro de germinador com temperatura constante de 25 °C por 7 dias. As avaliações foram realizadas no terceiro, quarto e quinto dia depois de inseridas no germinador para determinação da porcentagem de plântulas normais, anormais e mortas nas avaliações inicial e final. As plântulas que desenvolveram todas as estruturas essenciais do embrião foram classificadas como normais, segundo critérios indicados nas Regras para Análise de Sementes. Foram classificadas dentro das plântulas anormais as deformadas (que podem ter sofrido algum dano mecânico e/ou genético) e as deterioradas (atacadas por algum patógeno com sinais de infecção visíveis); as sementes que não apresentaram nenhum sinal de germinação foram consideradas mortas, segundo critérios das Regras de Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009). Para o teste de crescimento de plântulas, procedeu-se a leitura do comprimento de raiz (CP) e comprimento da parte aérea (CPA) das plântulas normais, por meio de uma régua com metragem em centímetros aferidos no sétimo dia depois de colocadas no germinador. Para a testemunha o mesmo protocolo foi utilizado, porém sem a adição do inóculo microbiano. Os ensaios seguiram o delineamento experimental inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições (50 sementes cada tratamento).

3.11 Experimento em vasos com solo

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Universidade de Passo Fundo entre os meses de novembro a dezembro de 2020. Sementes de soja e de milho foram desinfestadas por imersão durante 30 segundos em álcool 96° GL e dois minutos em peróxido de hidrogênio P.A., sendo posteriormente lavadas por dez vezes em água destilada esterilizada. Foram preparadas suspensões bacterianas em solução fisiológica do isolado A1 e do controle BC1 a uma concentração de 5×10^9 UFC/mL. Os inoculantes foram depositados em sacos plásticos, onde se acondicionou também as sementes de milho ou de soja e, posteriormente, realizada a agitação dos sacos plásticos por 1 minuto, atingindo cobertura homogênea sobre as sementes. Foram semeadas cinco sementes por vaso com solo não estéril com posterior desbaste para duas plantas aos 7 dias após a emergência das plântulas. A semeadura foi realizada em novembro de 2020. No momento do plantio, cada semente foi inoculada com 1 mL de suspensão bacteriana. Todas as sementes foram posteriormente cobertas com uma camada de aproximadamente 1 cm de terra. As avaliações foram realizadas em plantas coletadas aos 20 dias após o plantio. Para avaliação da massa seca, a parte aérea e as raízes foram acondicionadas separadamente em sacos de papel, postas a secar em estufa de circulação forçada a 65 °C até atingirem massa constante e pesadas em balança de precisão para determinação do peso de matéria seca. Após a obtenção dos dados de massa seca parte aérea e massa seca raiz foi realizado o cálculo de massa seca total:

$$MST = \textit{Massa seca parte aérea} + \textit{massa seca raiz}$$

Para a testemunha o mesmo protocolo foi utilizado, porém sem a adição do inóculo microbiano. Os ensaios seguiram o delineamento inteiramente casualizado, com dez repetições e três tratamentos.

3.12 Análise estatística

Para as análises estatísticas utilizou-se o software R versão 4.0.3 (R Core Team, 2020). Para análise química do solo foi realizado o estudo descritivo (summary). Usando os dados edáficos normalizados, foi realizada a análise de componentes principais (PCA) foi usado para agrupar as amostras. Para avaliar o isolamento dos microrganismos do solo, capacidade de solubilização de fósforo e zinco, capacidade de inibição de fungo fitopatogênico, capacidade de promoção de germinação de sementes e diferença entre culturas com inoculação foi efetuada análise descritiva (summary), ANOVA one-way, seguida de teste tukey a posteriori ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item são apresentados resultados de caracterização das amostras de solo obtidas das quatro áreas em estudo: área com 12, com 60 e com 120 anos de cultivo de videira e uma área de fragmento de floresta nativa a coleta do solo foi realizada na profundidade de 0-10 cm em um ano agrícola (2019).

4.1 Análise química do solo

As avaliações químicas das amostras resultaram nos dados expostos na Tabela 5 e no Anexo 1. Observa-se que os percentuais das faixas de pH nos solos cultivados com videira, estão enquadrados nas classes média e alta. Os solos de 12 anos, 120 anos e fragmento de floresta nativa estão na classe média (pH 5,5 a 6,0) e o solo de 60 anos na classe alta (pH > 6,0). Os resultados para saturação com bases mostram que solos de 12 anos e área nativa apresentaram classe média (65 -80) e 60 anos e 120 encontrados na faixa alta (> 80). Os dados obtidos também mostraram que o teor de argila dos solos se enquadra nas classes texturais 4 e 3, onde solos de fragmento de floresta nativa apresentou argila ≤ 20 % e cultivo de videira 12, 60 e 120 anos apresentou faixa 21-40. Assim como o teor de argila, a matéria orgânica (MO) também apresenta comportamento diferenciado entre os locais. Por exemplo, área de cultivo de 12 anos apresentou classe de matéria orgânica média e para cultivo de videira 60, 120 anos e fragmento de floresta nativa apresentaram matéria orgânica alta (> 5,0 %). A distribuição percentual de P nas amostras se concentrou predominante nas classes baixa, média e muito alta, o solo de cultivo de videira apresentou % de P muito alta (102,5 cmolc/Kg^{-1}), sendo esse 7,1 vezes maior que fragmento de floresta nativa. Um comportamento semelhante ocorreu para as dosagens de cobre.

Tabela 5. Características químicas determinadas em amostras coletadas na camada de 0-10 cm de profundidade de solos com diferentes anos de cultivo de videira e de solo de uma área nativa. Passo Fundo, 2019

Faixa de pH	Classe	Cultivo de videira			Área
		12 anos	60 anos	120 anos	Nativa
.....%					
5,5 - 6,0	Média	100	0	100	100
> 6,0	Alta	0	100	0	0
Faixa de saturação com bases (%)					
65-80	Média	100	0	0	100
>80	Alta	0	100	100	0
Faixa de argila (%)					
≤ 20	4	0	0	0	100
21-40	3	100	100	100	0
Faixa de matéria orgânica (%)					
2,6 - 5,0	Média	100	0	0	0
>5,0	Alta	0	100	100	100
Distribuição de fósforo (%)					
	Muito baixa	0	0	0	0
	Baixa	0	100	0	100
	Média	100	0	0	0
	Muito alta	0	0	100	0
Distribuição de potássio (%)					
	Alta	0	100	0	0
	Muito alta	100	0	100	100
Faixa de Ca (cmolc kg⁻¹)					
> 4,0	Alta	100	100	100	100
Faixa de Mg (cmolc kg⁻¹)					
> 1,0	Alta	100	100	100	100
Faixa Cu (mg kg⁻¹)					
0,2 - 0,4	Média	0	0	0	100
> 0,4	Alta	100	100	100	0

Fonte: Autora, 2019.

Legenda: 12 anos - cultivo de videira 12 anos; 60 anos - cultivo de videira 60 anos; 120 anos - cultivo de videira 120 anos; Nativa - área nativa.

Nota: Amostras coletadas em Pinto Bandeira, RS, agosto 2019. O pH do solo foi classificado em quatro faixas (≤5,0, 5,1-5,4, 5,5-6,0 e ≥6,0). Os valores de saturação com bases foram agrupados nas faixas 80%. Os teores de cálcio foram agrupados nas faixas ≤2,0, 2,1-4,0 e >4,0 cmolc/Kg⁻¹ e de magnésio nas faixas ≤0,5, 0,6-1,0 e >1,0 cmolc/kg⁻¹. Os teores de matéria orgânica do solo foram agrupados nas faixas ≤2,5, 2,6-5,0 e >5,0%. Os valores percentuais de argila foram classificados nas faixas ≤20, 21-40, 41-60 e ≥60%, correspondendo às classes texturais 4 a 1, respectivamente. Os teores de fósforo foram classificados primeiramente em quatro faixas de acordo com as classes texturais e, após, foram agrupados em cinco classes de disponibilidade (muito baixo, baixo, médio, alto e muito alto). Os teores de potássio foram agrupados primeiramente em três faixas de acordo com as classes de CTC pH7 (>15,0, 5,1-15,0 e ≤5,0 cmolc/Kg⁻¹) e, posteriormente, em cinco classes.

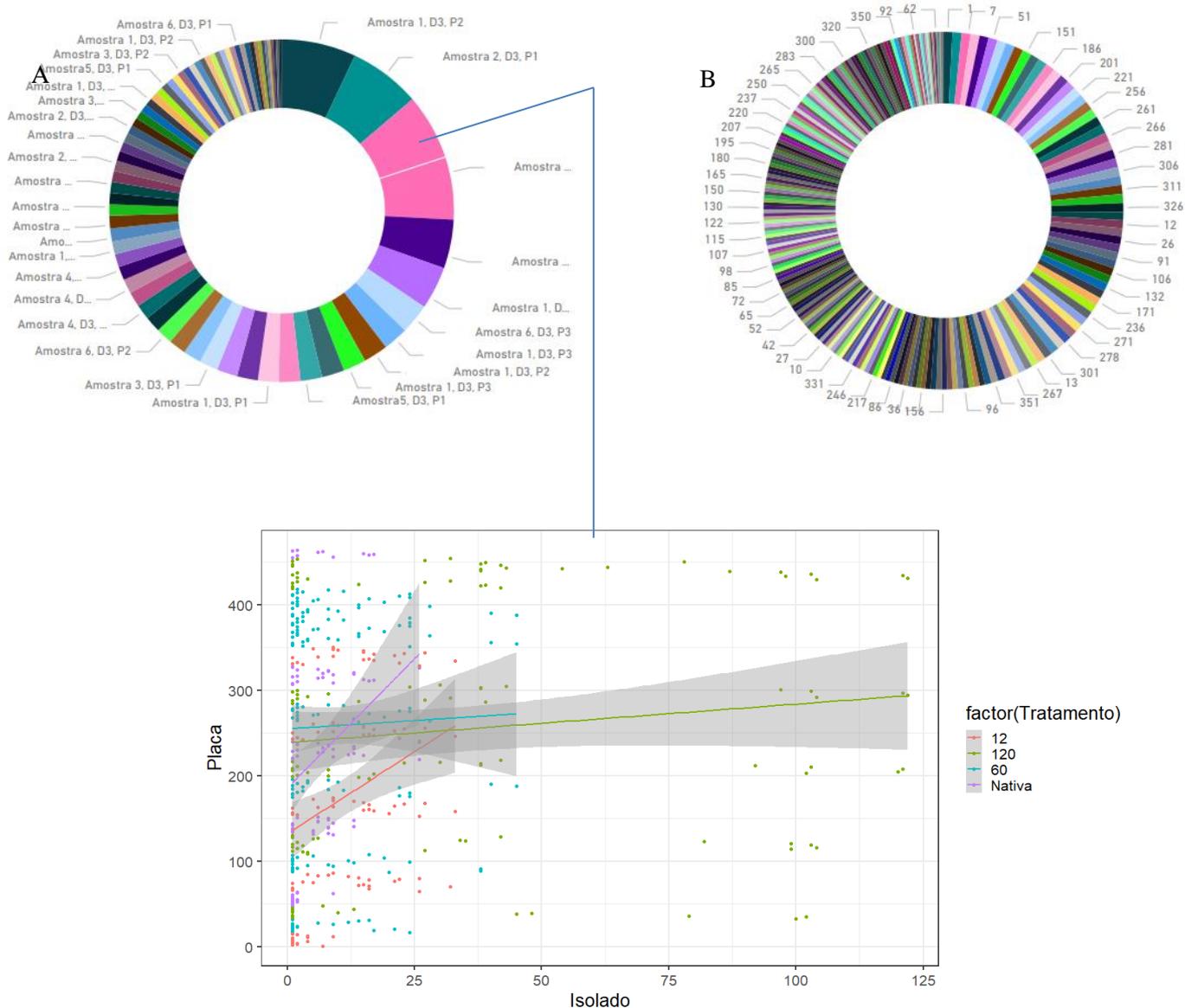
4.2 Análise dos microrganismos do solo

Neste item são apresentados os resultados referentes aos microrganismos obtidos a partir de solos com cultivo de videira com 12, 60 e 120 anos e de uma área de fragmento de floresta nativa. Um isolado bacteriano foi prospectado e identificado através da amplificação e sequenciamento da região gênica rDNA 16S.

4.3 Isolamento dos microrganismos e seleção do microrganismo a ser prospectado

Para explorar os mecanismos de montagem microbiana e sua distribuição e abundância, estudamos solos de *Vitis labrusca* L. (videira) e fragmento de floresta nativa. Em termos de área, a metacomunidade a abundância de bactérias e fungos foram maiores em solos de videira (7.900 colônias) do que em áreas de fragmento de floresta nativa (4.800 colônias). Além disso, as análises de características macroscópicas iguais entre as colônias sugeriram que área de fragmento de floresta nativa ($130 \pm 1,9$) possui uma maior diversidade quando comparamos com a área de videira ($64 \pm 1,3$) (Figura 4). Além disso, encontramos um microrganismo com características macroscopicamente igual, altamente abundante nas áreas de videira quando comparamos com fragmento de floresta nativa. Esse microrganismo estava 60% mais abundante na área de videira centenária (120 anos) (Figura 4). Esse microrganismo possuía as seguintes características: Colônias brancas, lisas, de tamanho médio, produtoras de muco, com bordas regulares, aspecto cremoso e crescimento rápido (24 horas) em ágar Mueller-Hinton, que, quando submetidas à coloração de Gram, apresentavam bastonetes Gram-positivos (Figura 5). Pela dominância, uma das colônias com essa característica foi nomeada como A1 e selecionada da área de videira centenária (120 anos) para prospecção.

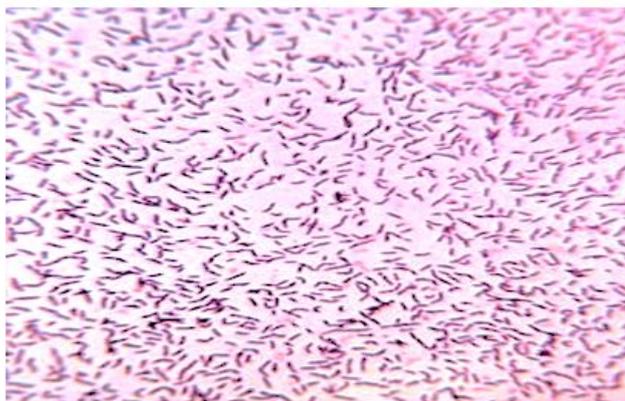
Figura 4. Microbioma de solo de videira e fragmento de floresta nativa. A- Abundância e diversidade de área de videira; B- Abundância e diversidade de área de fragmento de floresta nativa. Passo Fundo, 2020



Fonte: Autora, 2020

Nota: Microbioma do solo de videira. A) Abundância e diversidade área de videira B) Abundância e diversidade área de fragmento de floresta nativa. As diferentes porções do gráfico de pizza representam os filos bacterianos e fungicos que fazem parte do microbioma da videira e área de fragmento de floresta nativa. Os tamanhos das diferentes porções do gráfico representam a contribuição de cada filo para a abundância relativa total. O gráfico de regressão representa a abundância relativa do gênero selecionado para prospecção (*Paenarthrobacter*) por idade das videiras e fragmento de floresta nativa. A cor verde foi atribuída à videira centenária (120 anos), rosa para videira 12 anos, azul videira 60 anos e roxo fragmento de floresta nativa.

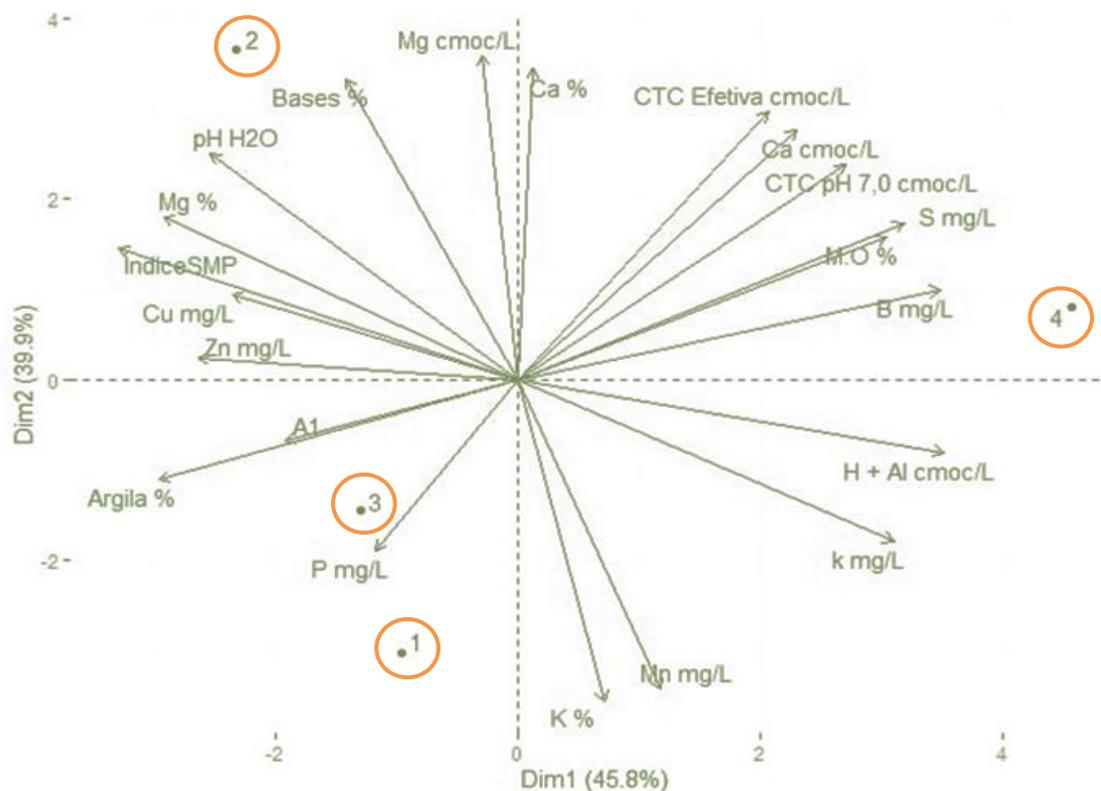
Figura 5. Caracterização microscópica do isolado selecionado para prospecção. Passo Fundo, 2019



Fonte: Autora, 2019.

A análise de componente principal (PCA) reduziu as 23 variáveis originais (MO, V%, SB, CTC, pH, argila, areia, silte, H+Al, m%, Ca, Mg, K, P, S, Cu, Mn, Mg, Zn, Fe e B) para 21 componentes principais que representaram 85,7 % da variação total dos dados. As variáveis que mais se destacaram no complexo de relações do solo foram Cu, P e H+Al, Mg e Al. Claramente, a área de fragmento de floresta nativa foi separada das demais, verificamos que, dentre as quatro áreas estudadas, a área nativa possui parâmetros mais elevados de K mg/L, M.O. %, Ca cmoc/L, CTC efetiva cmolc/L, CTC Ph 7,0 cmolc/L, H+Al cmolc/L, Smg/L no solo. Verificamos que a colonização bacteriana foi superior no solo de videira centenária (120 anos) com quantidade elevada de fósforo e cobre (Figura 6).

Figura 6. Análise de componente principal (PCA) amostras de solo de cultivo de videira e área nativa. Passo Fundo, 2019



Fonte: Autora, 2019.

- Legenda: 1- Cultivo de videira por 60 anos.
 2 - Cultivo de videira por 12 anos.
 3- Cultivo de videira por 120 anos.
 4- Área nativa.

Nota: Amostras coletadas em Pinto Bandeira, RS, agosto 2019. A1: Isolado bacteriano, Argila %: porcentagem de argila, pH/H₂O: acidez do solo, Índice SMP : correção de acidez do solo, P mg/L: fósforo, K mg/L: Potássio, M.O.% : Porcentagem de matéria orgânica, Al cmol c/L: alumínio, Ca cmol c/L: cálcio, Mg cmol c/L: magnésio, CTC efetiva cmol c/L: troca de cátions efetiva, CTC pH 7,0: troca de cátions pH 7,0, H+Al cmol c/L: acidez potencial, Bases%: porcentagem de bases, Al%: porcentagem de alumínio, K%: porcentagem de potássio, Ca%: porcentagem de cálcio, Mg%: porcentagem de magnésio, S mg/L: enxofre, Zn mg/L: zinco, Cu mg/L : cobre, B mg/L: boro, Mn mg/L: manganês.

4.4 Identificação do isolado A1

O sequenciamento de parte do gene rDNA 16S do isolado A1 resultou na seguinte sequência consenso contendo 733pb:

```
CGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCATGCTT
TCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTT
CCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCT
ACTGCACTCTAGTCTGCCCGTACCCACTGCAGAACCGGAGTTGAGCCCCGGT
CTTTCACAGCAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATT
CCGGATAACGCTTGCGCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAG
CCGGCGCTTCTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTACTGAAAGA
GGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCT
TTCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCC
GTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCTACCCGTCGT
CGCCTTGGTAGGCCATTACCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCGAGTCCAT
CCAAAACCACAAAAGCTTTCCACCACCATGACATGCGCCAGATGGTCGTAT
CCGGTATTAGACCCAGTTTCCCAGGCTTATCCCAGAGTCAAGGGCAGGTTAC
TCACGTGTTACTCACCCGTTTCGCCACTAATCCCCCAGCAAGCTGGGATCATC
GTTTCGAC
```

Comparando os dados obtidos para o isolado A1 com as sequências depositadas no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o microrganismo selecionado nesse estudo apresentou 100 % de identidade com bactérias do gênero *Paenarthrobacter*.

4.5 Prospecção do isolado A1

Neste item são apresentados os resultados de capacidade de solubilização de fosfato e zinco, inibição de fungo fitopatogênico *in vitro*, promoção de germinação de sementes de soja e de milho e experimentos em vasos com solo utilizando o isolado A1 como inoculante.

4.6 Capacidade de solubilização de fosfato

O isolado A1 produziu ao redor da colônia uma zona amarela clara em meio Pikovaskaya indicando ser positivo para P-solubilização com índice de solubilização (5.66) significativamente ($p < 0,001$) superior ao índice das testemunhas BC1 (5.15) e BC2 (4.64). A atividade de solubilização de P seguiu um caminho polinomial durante o período de incubação de 7 dias com aumento até o 6º dia. O diâmetro da colônia e a zona de halo do isolado A1 e da testemunha BC1 não diferiram estatisticamente, porém eles foram significativamente menores para a testemunha BC2 (Tabela 6).

Tabela 6. Teste de comparação de médias para capacidade de solubilização de fosfato do isolado A1, BC1 e BC2. Passo Fundo, 2020

Isolado	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo (cm)	índice de solubilização de fosfato(PSI)
A1	1.54±0.073 a	6.33±0.425 a	5.66±0.345 a
BC1	1.71±0.027 a	5.90±0.4256 a	5.15±0.256 b
BC2	1.14±0.239 b	3.95±0.597 b	4.64±0.245 c
CV%	9.8	9.06	5.55

Fonte: Autora, 2020.

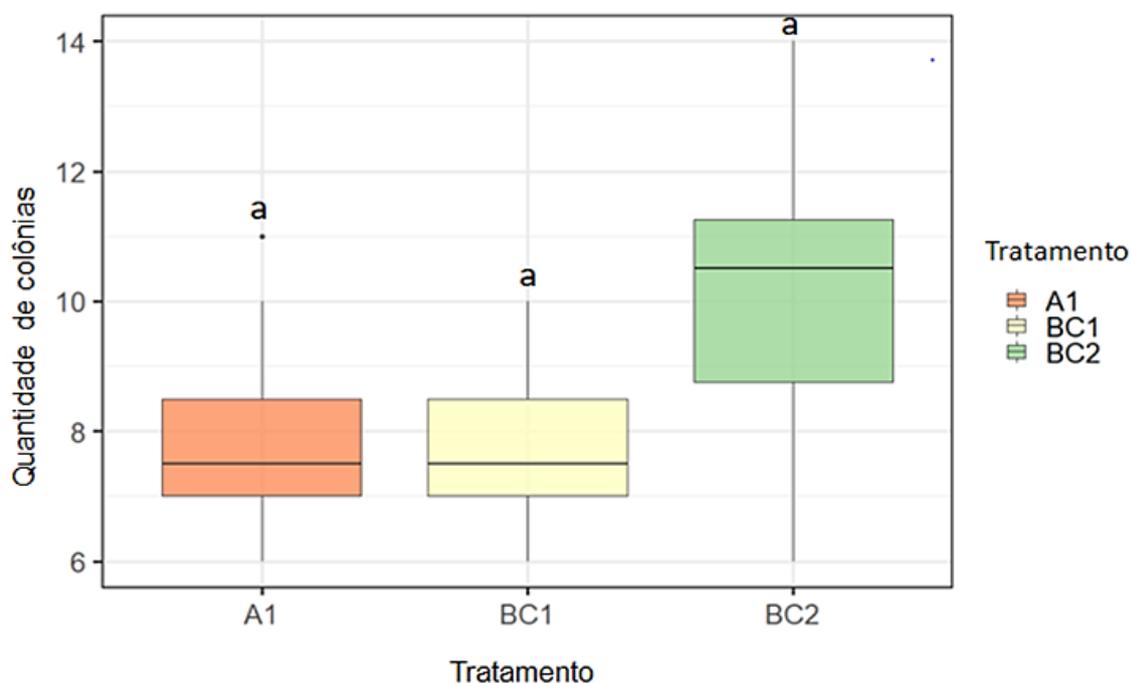
Legenda: A1 - Isolado *Paenarthrobacter*.
BC1 - Isolado *Bacillus subtilis*.
BC2 - Isolado *Bacillus* (J3 UPF).

Nota: Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância $p < 0,0001$.

4.7 Capacidade de solubilização de zinco

O isolado A1 foi capaz de solubilizar zinco produzindo uma zona de halo clara no meio de cultivo específico para essa caracterização que media entre 1,2 e 3,9 cm. Não houve diferença estatística significativa entre as bactérias avaliadas na capacidade de solubilizar zinco ($p > 0,05$) (Figura 7).

Figura 7. Teste de comparação de médias para capacidade de solubilização de zinco do isolado A1, BC1 e BC2. Passo Fundo, 2020



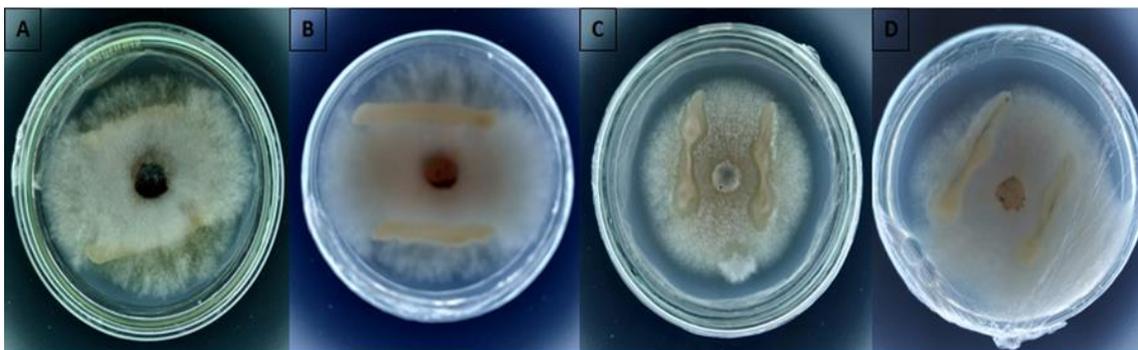
Fonte: Autora, 2010.

Legenda: A1: Tratamento com isolado A1 (*Paenarthrobacter*).
BC1: tratamento com isolado BC1 (*Bacillus subtilis*).
BC2: tratamento com isolado BC2 (J3 UPF)

4.8 Capacidade de inibição de fungo fitopatogênico *in vitro*

O isolado de *Paenarthrobacter* A1 não apresentou ação antagonista sobre fungos dos gêneros *Fusarium* ou *Colletotrichum* (Figura 8).

Figura 8. Ensaio de pareamento entre o fungo *Fusarium*, isolado A1 e o fungo *Colletotrichum* com o isolado A1 após 144 horas de confronto. Passo Fundo, 2019



Fonte: Autora, 2019.

Legendada: A - Verso da placa de Petri com confronto entre o fitopatogênico *Fusarium* (centro da placa) e isolado A1 (estrias distantes das bordas).
B - Reverso da placa de Petri com confronto entre o fitopatogênico *Fusarium* (centro da placa) e isolado A1 (estrias distantes das bordas).
C - Verso da placa de Petri com confronto entre o fitopatogênico *Colletotrichum* (centro da placa) e isolado A1 (estrias distantes das bordas).
D - Reverso da placa de Petri com confronto entre o fitopatogênico *Colletotrichum* (centro da placa) e isolado A1 (estrias distantes das bordas).

4.9 Avaliação da capacidade de promoção de germinação de sementes de soja e de milho pelo isolado A1

A porcentagem de germinação de semente de milho foi de 98 % com inoculação (tratamentos A1 e BC1) e de 97 % sem inoculação. Já a porcentagem de germinação de semente de soja foi de 99 % com inoculação (tratamentos A1 e BC1) e de 98 % sem inoculação. A média de germinação ficou acima da recomendada para as espécies (90 %) para todos os tratamentos e controles.

Na avaliação do comprimento parte aérea de plântulas de soja e de milho o tratamento contendo o isolado A1 foi significativamente maior quando comparado com o tratamento com *Bacillus* (BC1) e com controle sem inóculo de microrganismo ($p < 0,0001$) (Figura 9). O comprimento da raiz obtido no controle sem inóculo microbiano foi superior aos demais para plântula de soja e milho ($p < 0,0001$).

Figura 9. Avaliação da capacidade de germinação de sementes de soja e de milho pelo isolado. Passo Fundo, 2020



Fonte: Autora, 2019.

Legenda: 1: Plântula de milho:

A- Testemunha (sem inóculo)

B - Tratamento com o isolado BC1 (*Bacillus subtilis*)

C - Tratamento com o isolado A1 (*Paenarthrobacter*)

2: Plântula de soja:

A – Tratamento com o isolado A1 (*Paenarthrobacter*)

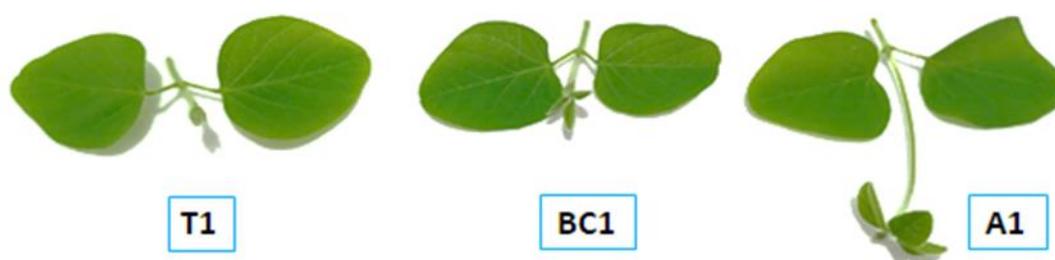
B – Testemunha (sem inóculo)

C – Tratamento com o isolado BC1 (*Bacillus subtilis*)

4.10 Experimentos em vasos com solo

A altura da planta de soja diferiu significativamente entre os tratamentos ($p < 0,0001$). Para o tratamento contendo o isolado A1 (23,45 cm \pm 0,45) as plantas foram mais altas do que as observadas nos tratamentos contendo o *Bacillus* BC1 (22,61 cm \pm 0,46) e sem o inóculo microbiano T1 (20,40 cm \pm 0,45) ($p < 0,0001$) (Figura 10).

Figura 10. Comparação da altura da planta de soja quando inoculado os microrganismos e sem o tratamento microbiano. Passo Fundo, 2020

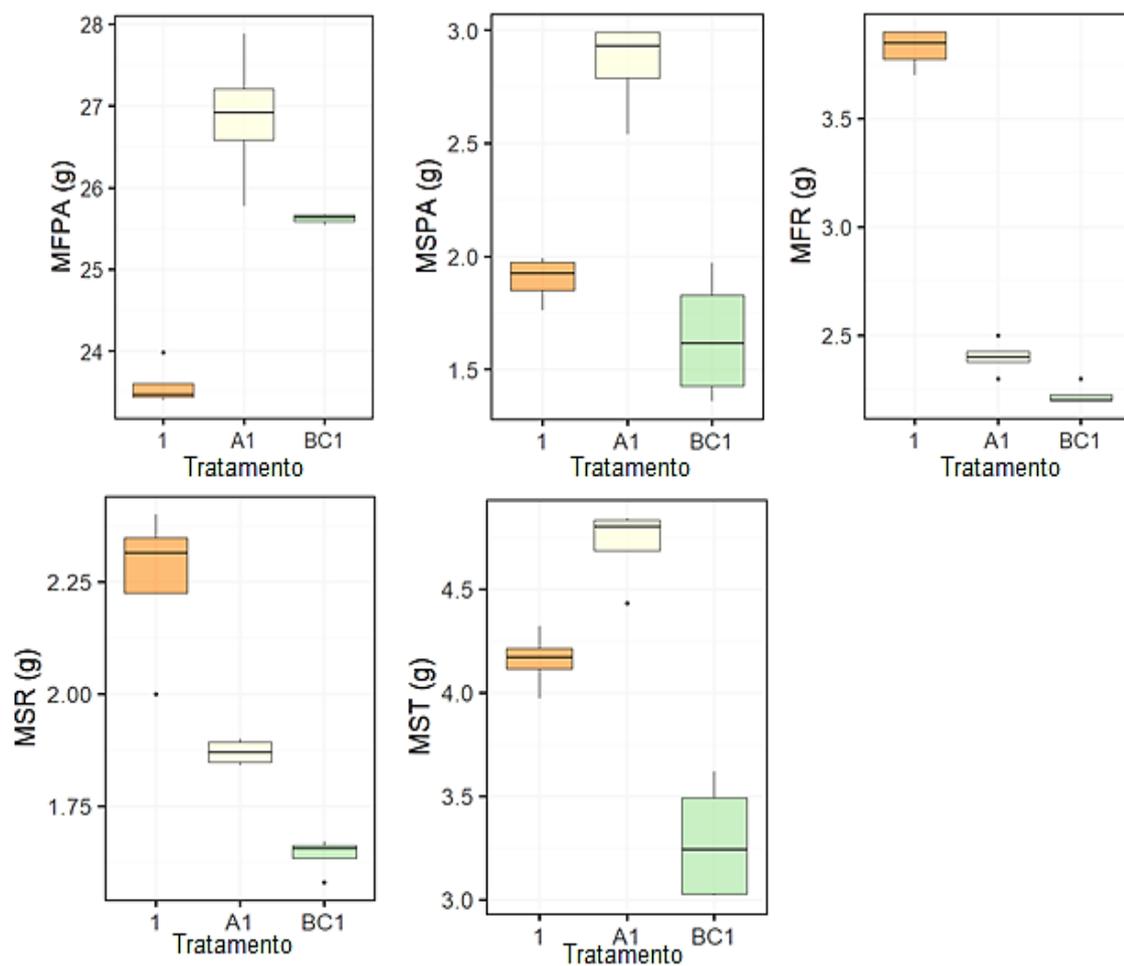


Fonte: Autora, 2020.

Legenda: T1: Testemunha (sem inóculo)
BC1: Tratamento com o isolado BC1 (*Bacillus subtilis*)
A1: Tratamento com o isolado A1 (*Paenarthrobacter*)

A quantidade de massa fresca da parte aérea (MFPA) da planta de soja para o tratamento com o isolado A1 (26,87 g \pm 0,20) foi significativamente superior ($p < 0,0001$) quando comparada aos tratamentos com *Bacillus* BC1 (25,61g \pm 0,32) e sem inóculo microbiano T1 (23,57g \pm 0,29). A quantidade de massa seca da parte aérea (MSPA) da planta de soja para o tratamento com o isolado A1 (2,84 g \pm 0,30) foi significativamente superior ($p < 0,0001$) quando comparada aos tratamentos com *Bacillus* BC1 (1,64 g \pm 0,33) e sem inóculo microbiano T1 (1,90 g \pm 0,41). As quantidades de massa fresca e seca das raízes de soja foram significativamente superiores ($p < 0,0001$) nos vasos sem inóculo microbiano (Figura 11).

Figura 11. Massa fresca e seca de parte aérea e de raiz de soja com inóculo bacteriano e sem a introdução de microrganismos em experimento em vasos. Passo Fundo, 2020



Fonte: Autora, 2020.

Não houve diferença significativa na porcentagem de germinação para as plantas de sojas entre os três tratamentos; em todos os vasos germinaram as 5 sementes. Portanto, o isolado A1 aumentou a massa fresca parte aérea (MFPA), a massa seca parte aérea (MSPA), a massa seca total (MST) e altura da planta de soja.

A altura da planta de milho diferiu significativamente entre os tratamentos ($p < 0,0001$), para o tratamento contendo o isolado A1 ($22,51 \text{ cm} \pm 0,12$) as plantas foram mais altas do que as observadas nos tratamentos contendo o *Bacillus* BC1 ($20,66 \pm 0,17$) e sem o inóculo microbiano T1 ($10,78 \pm 0,07$) ($p < 0,0001$) (Figura 12).

Figura 12. Comparação da altura da planta de milho quando inoculado os microrganismos e sem o tratamento microbiano. Passo Fundo, 2020

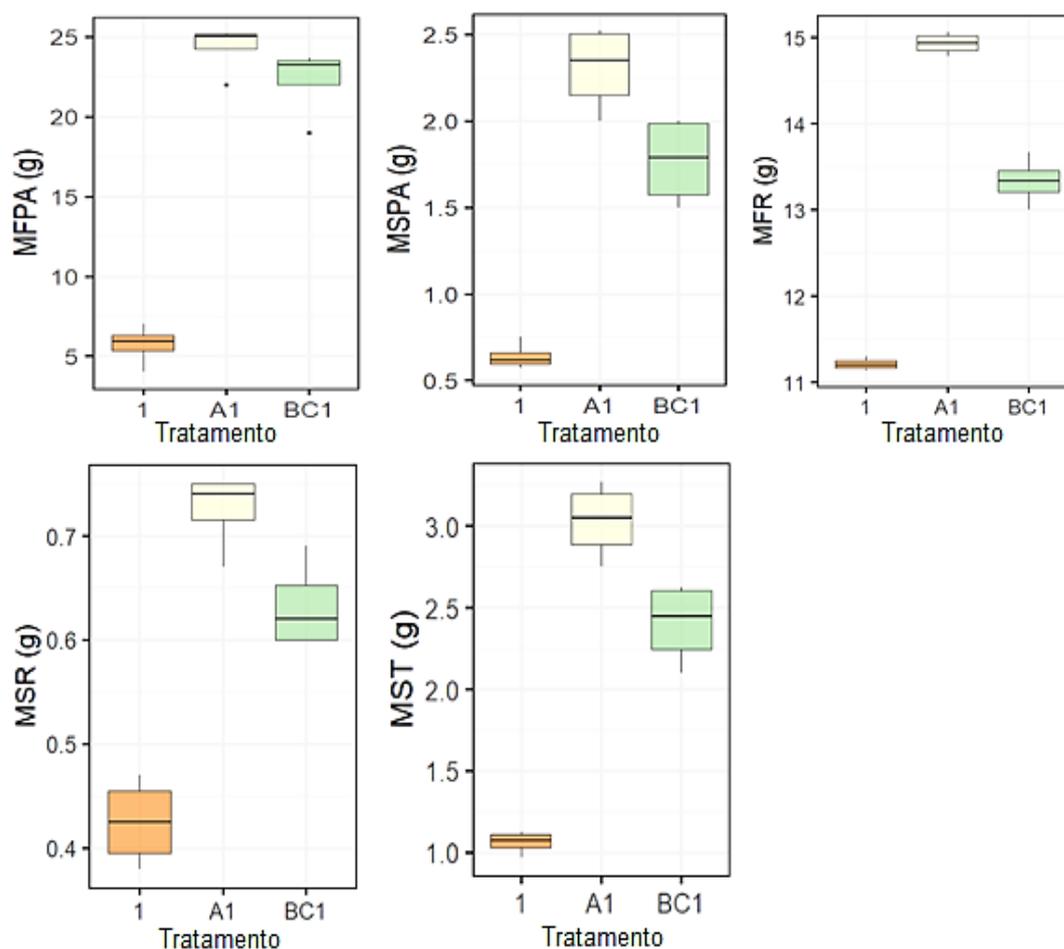


Fonte: Autora, 2020.

Legenda: T1: Testemunha (sem inóculo)
BC1: tratamento com o isolado BC1 (*Bacillus subtilis*)
A1: Tratamento com o isolado A1 (*Paenarthrobacter*)

A quantidade de massa fresca da parte aérea (MFPA) da planta de milho para o tratamento com o isolado A1 (25,04 g \pm 0,12) foi significativamente superior ($p < 0,0001$) quando comparada aos tratamentos com *Bacillus* BC1 (23,66 g \pm 0,15) e sem inóculo microbiano T1 (5,76 g \pm 0,36). A quantidade de massa seca da parte aérea (MSPA) da planta de milho para o tratamento com o isolado A1 (2,24 g \pm 0,30) foi significativamente superior ($p < 0,0001$) quando comparada aos tratamentos com *Bacillus* BC1 (1,64 g \pm 0,26) e sem inóculo microbiano T1 (0,63 g \pm 0,07). As quantidades de massa fresca e seca das raízes de milho foram significativamente superiores ($p < 0,0001$) nos vasos com tratamento com isolado A1 (Figura 13).

Figura 13. Massa fresca e seca de parte aérea e de raiz de milho com inóculo bacteriano e sem a introdução de microrganismos em experimento em vasos. Passo Fundo, 2020



Fonte: Autora, 2020.

Legenda: 1: Testemunha (sem inóculo)

A1: Tratamento com o isolado A1 (*Paenarthrobacter*)

BC1: tratamento com o isolado BC1 (*Bacillus subtilis*)

Nota: MFPA (g): massa fresca parte aérea, MSPA (g): massa seca parte aérea, MFR (g): massa fresca raiz, MSR (g): massa seca raiz, MST: massa seca total.

Muitos estudos descreveram as consequências do uso da terra para a dinâmica microbiana (LAUBER et al., 2013). Nossos resultados mostraram que os parâmetros do solo são alterados de acordo com o uso do solo. É bem sabido que as práticas de manejo afetam a qualidade do solo e a dinâmica dos nutrientes (ALAM et al., 2013) e as comunidades microbianas respondem a essas mudanças (MENDES et al., 2015).

Nossos resultados apoiam fortemente a hipótese de que as comunidades microbianas de videira e fragmento de floresta nativa foram montadas de forma diferente. Neste estudo, mostramos que a abundância de bactérias e fungos foram maiores em solos de videira do que em áreas de fragmento de floresta nativa. Além disso, as análises de características macroscópicas iguais entre as colônias sugeriram que área de videiras possui uma menor diversidade quando comparamos com a área de fragmento de floresta nativa, sugerindo pressão de seleção.

Para o solo videira, as práticas de manejo (fertilização, adição de cobre) são os condutores mais prováveis das diferenças observadas na distribuição da abundância das espécies. Vários estudos têm mostrado que as transformações no meio ambiente devido à mudança do uso do solo têm efeito direto na comunidade microbiana do solo, por uma resposta de grupos microbianos específicos, que altera a estrutura, composição e diversidade (MENDES et al., 2015). Nossos resultados concordam com resultados anteriores, a videira abrigou uma microbiota exclusiva quando comparamos com fragmento de floresta nativa. Além disso, encontramos um gênero altamente abundante e resistente em área de videira (*Paenarthobacter*). É importante enfatizar que essa bactéria teve seu crescimento mais abundante em solo com alto teor de cobre e fósforo (videira 120 anos), sugerindo sua resistência a metais pesados e principalmente a cobre.

A filtragem ambiental é um fator determinante da montagem da comunidade (KRAFT et al., 2015) e demonstrou causar agrupamento filogenético em comunidades bacterianas (HORNER-DEVINE; BOHANNAN, 2006). Muitos estudos mostraram que o pH do solo, fósforo e salinidade podem influenciar os processos de montagem da comunidade bacteriana em vários ambientes (TRIPATHI et al., 2018) Aqui, mostramos que o cobre e o P do solo mediarão o equilíbrio entre a montagem estocástica e determinística para subcomunidades abundantes e diversas, respectivamente, em videira e área de fragmento florestal. Não é surpreendente que a utilização por exemplo de

fertilizantes no solo influencie a composição e diversidade da comunidade bacteriana em múltiplas escalas (JIAO et al., 2019) .

Esta conclusão é apoiada pela noção de que espécies abundantes ocupam um nicho diversificado, utilizam competitivamente uma variedade de recursos e se adaptam efetivamente ao meio ambiente (JIAO et al., 2017). Diversidades microbianas, entretanto, são restritas pela especificidade do habitat (JOUSSET et al., 2017) . Os micro-organismos presentes no solo interagem entre si de diversas formas, podendo apresentar relações positivas, neutras ou negativas (JOHANSSON et al., 2004). As dinâmicas das relações entre microrganismos e plantas podem ser benéficas, muitas das espécies isoladas podem ser também promotoras do crescimento vegetal.

Também não houve diferença significativa na porcentagem de germinação para as plantas de milho entre os três tratamentos; em todos os vasos germinaram as 5 sementes. Portanto, o isolado A1 aumentou a massa fresca parte aérea (MFPA), a massa seca parte aérea (MSPA), massa fresca raiz (MFR), massa seca raiz (MSR), massa seca total (MST) e altura da planta de milho. A maioria dos microrganismos do solo parece extremamente bem adaptada ao seu ambiente (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2003). Mas o metabolismo de diferentes microrganismos muda em resposta a diferentes condições ambientais dependendo de fatores como temperatura, pH, concentração de nutrientes e estrutura do solo. Observamos um microbioma cultivável distinto entre as áreas analisadas, mesmo nos ambientes com o mesmo cultivo e geograficamente próximos. Colônias com características semelhantes ao isolado A1 predominaram no solo de cultivo de videira centenária (120 anos), que teve maior relação com atributos de teor de argila e distribuição de fósforo. Evidenciando que o microbioma se diferencia em resposta ao uso e manejo do solo. Vários estudos vinculam a resposta fisiológica do hospedeiro ao estado de fosfato do solo com a presença de bactérias (CASTRILLO et al., 2017; KEMEN et al., 2018), estudos mostraram microbiomas bacterianos sutilmente diferentes em condições repletas de P (CASTRILLO et al., 2017), mas não em condições de depleção de P (FABIANSKA et al., 2018). A alteração de fósforo no solo provoca mudança na comunidade microbiana (FINKEL et al., 2019).

Os resultados obtidos mostram que é provável que o fósforo e a argila influenciaram na quantidade do isolado A1 no solo dentre uma gama de fatores. Isso

levanta a hipótese alternativa de que o isolado A1 se adapta a ambientes com quantidade elevada de P e argila e pobres de outros nutrientes. Variações no potencial de solubilização de fosfato por microrganismos têm sido observadas por vários autores (AZZIZ et al., 2012). Os microrganismos solubilizadores de fosfato podem ser classificados quanto ao seu índice de solubilização (SILVA FILHO; VIDOR, 2000), os isolados que apresentam índices menores que 2 são classificados como pouco solubilizadores e isolados com índices entre 2 e 3, como isolados de potencial médio, enquanto aqueles com índices maiores que 3, muito solubilizadores. Avaliamos o isolado A1 como solubilizador de fosfato apresentando índice de solubilização de 5,66 em meio Pikovskaya, portanto muito solubilizador.

A deficiência de fósforo (P) está entre os fatores de solo mais graves como limitante da produtividade de uma cultura. Uma estratégia proposta para aliviar esse estresse é apoiar as plantas com a inoculação de bactérias promotoras de crescimento (PGPR). É importante considerar que o desempenho de promoção do crescimento da bactéria será influenciado por fatores bióticos e abióticos no solo. O manejo das interações bactérias, solo e planta tem se mostrado uma ferramenta poderosa tendo em vista o potencial biotecnológico dessas interações, evidenciado pelo aumento da produtividade das culturas, redução dos custos de produção pela redução do volume de fertilizantes aplicados e uma melhor conservação dos recursos ambientais. Além disso, os inoculantes são compostos de bactérias benéficas que podem ajudar a planta a atender as suas demandas por nutrientes, com isso, essas bactérias aumentam o crescimento das plantas, ajudam na germinação das sementes, melhoram a massa fresca da parte aérea e também da massa seca total. A limitação de zinco pode ter ocorrência generalizada principalmente de problemas de deficiência em leguminosas e em cereais devido à baixa solubilidade do zinco inorgânico no solo (CAKMAK, 2008).

A transformação microbiana é um mecanismo importante para tornar a forma indisponível de zinco do solo disponível para planta para nutrição e promoção de crescimento. Em casa de vegetação, plantas de soja inoculadas com *Burkholderia sp.* apresentou a maior altura aérea, que foi 40 e 60% maior do que a do solo / semente não inoculado (FERNÁNDEZ et al., 2007), observamos no nosso trabalho inoculação com *Paenarthrobacter* na cultura da soja apresentou altura 114% maior que a testemunha.

No trabalho de Bononi (2020) a cepa de *Trichoderma spp.* apresentou respostas positiva na promoção do crescimento da soja de 2,1% para 41,1% (BONONI et al., 2020). Segundo o trabalho de Mehnaz (2006) *Gluconacetobacter* melhorou significativamente o peso da raiz das variedades de milho 18% e o peso da parte aérea 1,4 % comparado com testemunha sem inoculação. *Pseudomonas* promoveu significativamente o peso da raiz 20% e parte aérea 12%, *Azospirillum* aumentou 20% peso de raiz e 1,4% parte área comparado com testemunha (sem inoculação).

Verificamos no nosso trabalho aumento no peso de raiz 80% e parte área 49,4% e massa seca total 250% quando comparado com testemunha (sem inoculação). A baixa concentração de fósforo no solo reflete uma diminuição na produção de ATP e NADPH e na expressão de genes relacionados à fotossíntese (LAWLOR et al., 2002). Assim, essas diminuições são refletidas no desenvolvimento da planta. Por isso a eficiência dos microrganismos que auxiliam na disponibilidade de P no solo está correlacionada com sua capacidade tanto de promover o crescimento das plantas de outras formas quanto de controlar os fitopatógenos presentes no solo. Agentes de controle biológico com recursos para disponibilizar nutrientes às plantas estão cada vez mais sendo alvo de estudos. Nesse contexto, a cepa *Paenarthrobacter* pode ser promissora como promotora de crescimento de várias espécies de culturas auxiliando na disponibilidade de fósforo.

5. CONCLUSÕES

Dessa forma a partir de amostras de solo de cultivo de videira com diferentes anos de existência e de uma área nativa foi isolado e identificado o *Paenarthrobacter* A1. Esse microrganismo predominou em todas as amostras avaliadas, sendo mais incidente na área com maiores níveis de fósforo, de um cultivo de 120 anos.

O microrganismo prospectado apresenta potencial como bactéria promotora de crescimento de plantas por ser capaz de solubilizar fosfato e zinco, promover o aumento em massa fresca parte aérea (MFPA), massa seca parte aérea (MSPA), massa seca total (MST) e altura da planta de soja e de milho, além de promover o aumento de massa fresca de raiz (MFR) e massa seca de raiz (MSR) para o milho.

REFERÊNCIAS

AHUJA, I.; DE VOS, R. C.; BONES, A. M.; HALL, R. D. Plant molecular stress responses face climate change. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 12, p. 664-674, 2010.

ALTIERI, M. A. **Agroecology**: the science of sustainable agriculture. Boca Raton: CRC Press, 2018.

ARAÚJO, C. de; MARIA, L.; SAMPAIO, B.; VALADARES, E.; SOCORRO, M. Phosphorus desorption of Fe and Al oxides mediated by soil microorganisms. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 46, p. 633 – 640, 2015.

AZZIZ, G.; BAJSA, N.; HAGHJOU, T.; TAULÉ, C.; VALVERDE, Á.; IGUAL, J. M.; ARIAS, A. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop-pasture rotations in a no-tillage regime in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 320-326, 2012.

BABALOLA, O. O. Beneficial bacteria of agricultural importance. **Biotechnology letters**, v. 32, n. 11, p. 1559-1570, 2010.

BARATA A.; MALFEITO-FERREIRA M.; LOUREIRO V. The microbial ecology of wine grape berries. **Int. J. Food Microbiol**, v. 153, p. 243–259, 2012.

BARDGETT, R. D.; FREEMAN, C.; OSTLE, N. J. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. **The ISME Journal**, v. 2, n. 8, p. 805-814, 2008.

BASHAN, Y.; HUANG, P.; KLOEPPER, J. W.; DE-BASHAN, L. A proposal for avoiding fresh-weight measurements when reporting the effect of plant growth-promoting (rhizo) bacteria on growth promotion of plants. **Biology and Fertility of Soils**, v. 53, n. 1, p. 1, 2017.

BEBBER, D. P.; HOLMES, T.; GURR, S. J. The global spread of crop pests and pathogens. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, n. 12, p. 1398-1407, 2014.

BEHERA, B. C.; SINGDEVSACHAN, S. K.; MISHRA, R. R.; DUTTA, S. K.; THATOI, H. N. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove - a review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 97-110, 2014.

- BHATTACHARYYA, P. N.; JHA, D. K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. **World Journal Microbiology Biotechnology**, Dordrecht, v. 28, n. 4, p. 1327–1350, 2012.
- BONONI, L.; CHIARAMONTE, J. B.; PANSA, C. C.; MOITINHO, M. A.; MELO, I. S. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2020.
- BOYER, J. S. Plant productivity and the environment. **Science**, v. 218, p. 443 – 448, 1982.
- BROCKETT, B. F.; PRESCOTT, C. E.; GRAYSTON, S. J. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. **Soil biology and biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 9-20, 2012.
- BUSSE, H. J. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter* sensu lato, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 66, n. 1, p. 9-37, 2016.
- CAKMAK, I. Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification. **Plant and soil**, v. 302, n. 1, p. 1-17, 2008.
- CASTRILLO, G.; TEIXEIRA, P. J. P. L.; PAREDES, S. H.; LAW, T. F.; DE LORENZO, L.; FELTCHER, M. E.; DANGL, J. L. Root microbiota drive direct integration of phosphate stress and immunity. **Nature**, v. 543, n. 7646, p. 513-518, 2017.
- CERDÀ, A.; RODRIGO-COMINO, J.; GIMÉNEZ-MORERA, A.; KEESSTRA, S. D. An economic, perception and biophysical approach to the use of oat straw as mulch in Mediterranean rainfed agriculture land. **Ecological Engineering**, v. 108, p. 162-171, 2017.
- CHOUDHARY, M.; PANDAY, S. C.; MEENA, V. S.; SINGH, S.; YADAV, R. P.; MAHANTA, D; PATTANAYAK, A. Long-term effects of organic manure and inorganic fertilization on sustainability and chemical soil quality indicators of soybean-wheat cropping system in the Indian mid-Himalayas. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 257, p. 38-46, 2018.
- CLEVELAND, C. C.; HOULTON, B. Z.; SMITH, W. K.; MARKLEIN, A. R.; REED, S. C.; PARTON, W.; DEL GROSSO, S. J.; RUNNING, S. W. Patterns of new versus

recycled primary production in the terrestrial biosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 110, p. 12733 – 12737, 2013.

COOKSON, W. R.; OSMAN, M.; MARSCHNER, P.; ABAYE, D. A.; CLARK, I.; MURPHY, D. V.; WATSON, C. A. Controls on soil nitrogen cycling and microbial community composition across land use and incubation temperature. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 39, n. 3, p. 744-756, 2007.

DIMKPA, C.; WEINAND, T.; ASCH, F. Plant-rhizobacterium interactions relieve abiotic stress conditions. **Plant Cell Environ**, v. 32, p. 1682 – 1694, 2009.

DOBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. **Plant Soil**, v. 15, p. 211–216, 1961.

DONG, H.; ZENG, G.; TANG, L.; FAN, C.; ZHANG, C.; HE, X.; HE, Y. An overview on limitations of TiO₂-based particles for photocatalytic degradation of organic pollutants and the corresponding countermeasures. **Water research**, v. 79, p. 128-146, 2015.

DOURADO, M. N.; MARTINS, P. F.; QUECINE, M. C.; PIOTTO, F. A.; SOUZA, L. A.; FRANCO, M. R.; AZEVEDO, R. A. Burkholderia sp. SCMS54 reduces cadmium toxicity and promotes growth in tomato. **Annals of Applied Biology**, v. 163, n. 3, p. 494-507, 2013.

EDGERTON, M. D. Increased crop productivity to meet global feed, food and fuel needs. **Plant Physiol**, v. 149, p. 7 – 13, 2009.

ETESAMI, H.; EMAMI, S.; ALIKHANI, H. A. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects A review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 17, n. 4, p. 897-911, 2017.

FABIAŃSKA, I.; GERLACH, N.; ALMARIO, J.; BUCHER, M. Plant-mediated effects of soil phosphorus on the root-associated fungal microbiota in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist**, v. 221, n. 4, p. 2123-2137, 2018.

FERNÁNDEZ, L. A.; ZALBA, P.; GÓMEZ, M. A.; AND SAGARDOY, M. A. Phosphatesolubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. **Biology and Fertility of Soils**, v. 43, n. 6, p. 805-809, 2007.

FIERER, N.; JACKSON, R. B. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 3, p. 626-631, 2006.

FINKEL, O. M.; SALAS-GONZÁLEZ, I.; CASTRILLO, G.; SPAEPEN, S.; LAW, T. F.; JONES, C. D.; DANGL, J. L. The effects of soil phosphorous content on microbiota are driven by the plant phosphate starvation response. **BioRxiv**, p. 608133, 2019.

FRANCESCA, N.; CANALE, D. E.; SETTANNI, L.; MOSCHETTI, G. Dissemination of wine-related yeasts by migratory birds. *Environ. Microbiol. Rep*, v. 4, p. 105–112, 2012.

GILBERT, J. A.; VAN DER LELIE, D.; ZARRAONAINDIA, I. Microbial terroir for wine grapes. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 111, p. 5–6, 2014.

GLICK, B. R.; PENROSE, D. M.; LI, J. P. A model for the reduction of ethylene concentrations in plants by plant growth-promoting bacteria. **J. Theor. Biol**, v. 190, p. 63 – 68, 1998.

GODDARD, M. R.; ANFANG, N.; TANG, R.; GARDNER, R. C.; JUN, C. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. **Environ. Microbiol**, v. 12, p. 63–73, 2010.

HAGEDORN, C.; HOLT, J. G. A nutritional and taxonomic survey of *Arthrobacter* soil isolates. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 353-361, 1975.

HANSEL, C. M.; FENDORF, S.; JARDINE, P. M.; FRANCIS, C. A. Changes in bacterial and archaeal community structure and functional diversity along a geochemically variable soil profile. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 5, p. 1620-1633, 2008.

HARDOIM, P. R.; VAN OVERBEEK, L. S.; BERG, G.; PIRTTILÄ, A. M.; COMPANT, S.; CAMPISANO, A.; DÖRING, M.; SESSITSCH, A. The world hidden within plants: ecological and evolutionary considerations to define the functioning of microbial endophytes. **Microbiol. Mol. Biol**, v. 79, n. 3, p. 293–320, 2018

HORNER-DEVINE, M. C.; BOHANNAN, B. J.M. Phylogenetic clustering and overdispersion in bacterial Communities. **Ecology**, v. 87, n. 100, p.108, 2006.

JUMA, C. **The new harvest: agricultural innovation in Africa**. Oxford: Oxford University Press, 2015.

JIAO, S.; XU, Y.; ZHANG, J.; HAO, X.; LU, Y. Core microbiota in agricultural soils and their potential associations with nutrient cycling. **Msystems**, v. 4, n. 2, p. e00313-18, 2019.

JIAO, S.; CHEN, W.; WEI, G. Biogeography and ecological diversity patterns of rare and abundant bacteria in oil-contaminated soils. **Molecular Ecology**, v. 26, n.19, p. 5305-5317, 2017.

JOHANSSON, J. F.; PAUL, L. R.; FINLAY, R. D. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and its meaning for sustainable agriculture. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 48, n. 1, p. 1-13, 2004.

JOUSSET, A.; BIENHOLD, C.; CHATZINOTAS, A.; GALLIEN, L.; GOBET, A.; KURM, V.; HOL, W. G. Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. **The ISME Journal**, v. 11, n. 4, p. 853-862, 2017.

KALLENBACH, C. M.; FREY, S. D.; GRANDY, A. S. Direct evidence for microbial-derived soil organic matter formation and its ecophysiological controls. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2016.

KARTHIKEYAN, B.; JALEEL, C. A.; GOPI, R.; DEIVEEKASUNDARAM, M. Alterations in seedling vigour and antioxidant enzyme activities in *Catharanthus roseus* under seed priming with native diazotrophs. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, n. 7, p. 453-457, 2007.

KHAN, M.; ZAIDI, A. S.; AHMAD, E. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate– solubilizing microorganisms. In: **Phosphate Solubilizing Microorganisms**, p. 31-62, 2014.

KNIGHT, S.; GODDARD, M. R. Quantifying separation and similarity in a *Saccharomyces cerevisiae* metapopulation. **The ISME Journal**, v. 9, n. 2, p. 361-370, 2015.

KOCH, C.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E. Reclassification of *Micrococcus agilis* (Ali-Cohen 1889) to the genus *Arthrobacter* as *Arthrobacter agilis* comb. nov. and emendation of the genus *Arthrobacter*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 837-839, 1995.

KOCHIAN, L.V.; HOEKENGA, O. A.; PIÑEROS, M. A. How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorous efficiency. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 459-493, 2004.

KOYAMA, A.; WALLENSTEIN, M. D.; SIMPSON, R. T.; MOORE, J. C. Soil bacterial community composition altered by increased nutrient availability in Arctic tundra soils. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 516, 2014.

KRAFT, N. J.; ADLER, P. B.; GODOY, O.; JAMES, E. C.; FULLER, S.; LEVINE, J. M. Community assembly, coexistence and the environmental filtering metaphor. **Functional Ecology**, v. 29, n. 5, p. 592-599, 2015.

KURUPPU, P. U.; SCHNEIDER, R. W.; RUSSIN, J. S. Factors affecting soybean root colonization by *Calonectria ilicicola* and development of red crown rot following delayed planting. **Plant Disease**, v. 88, n. 6, p. 613-619, 2004.

- LAUBER, C. L.; STRICKLAND, M. S.; BRADFORD, M. A.; FIERER, N. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 2407-2415, 2008.
- LAUBER, C. L.; RAMIREZ, K. S.; AANDERUD, Z.; LENNON, J.; FIERER, N. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. **The ISME Journal**, v. 7, n. 8, p. 1641-1650, 2013.
- LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **To Plant. Cell Environ**, v. 25, p. 275-294, 2002.
- LEFF, J. W.; JONES, S. E.; PROBER, S. M.; BARBERÁN, A.; BORER, E. T.; FIRN, J. L.; FIERER, N. Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 35, p. 10967-10972, 2015.
- LEHTO, T.; ZWIAZEK, J. J. Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. **Mycorrhiza**, v. 21, p. 71-90, 2011.
- MÄDER, P.; FLIESSBACH, A.; DUBOIS, D.; GUNST, L.; FRIED, P.; NIGGLI, U. Soil fertility and biodiversity in organic farming. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1694-1697, 2002.
- MARSCHNER, H.; DELL, B. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. **Plant and Soil**, v. 159, p.89-102, 1994.
- MARTINAZZO, R.; SANTOS, D. R.; GATIBONI, L. C.; BRUNETTO, G.; KAMINSKI, J. Microbial phosphorus in the soil under no-tillage system in response to the addition of soluble phosphate. **Rev Bras Cienc Solo**, v. 31, p. 563-570, 2007.
- MAYAK, S.; TIROSH, T.; GLICK, B. R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 6, p. 565-572, 2004.
- MEHNAZ, S.; LAZAROVITS, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microbial Ecology**, v. 51, n. 3, p. 326-335, 2006.
- MENDES, L. W.; DE LIMA BROSSI, M. J.; KURAMAE, E. E.; TSAI, S. M. Land-use system shapes soil bacterial communities in Southeastern Amazon region. **Applied Soil Ecology**, v. 95, p. 151-160, 2015.

MENDES, L. W.; KURAMAE, E. E.; NAVARRETE, A. A.; VAN VEEN, J. A.; TSAI, S. M. Taxonomical and functional microbial community selection in soybean rhizosphere. **The ISME Journal**, v. 8, n. 8, p. 1577-1587, 2014.

MENDES, R.; GARBEVA, P.; RAAIJMAKERS, J. M. biobiome of the rhizosphere:: Significance of plant benef, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 5, p. 634-663, 2013.

MESSINA, M. J. Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n. 3, p. 439s-450s, 1999.

MORRISON-WHITTLE, P.; GODDARD, M. R. From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation. **Environ. Microbiol**, v. 20, p. 75-84, 2018.

MORRISON-WHITTLE, P.; GODDARD, M. R. From vineyard to winery: a source map of microbial diversity driving wine fermentation. **Environmental Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 75-84, 2018.

MUELLER, U. G.; SACHS, J. L. Engineering microbiomes to improve plant and animal health. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 10, p. 606-617, 2015.

PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; DE VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 187-193, 2011.

PÉREZ-JARAMILLO, JUAN, E. Deciphering rhizosphere microbiome assembly of wild and modern common bean (*Phaseolus vulgaris*) in native and agricultural soils from Colombia. **Microbiome**, v. 7, n. 1 p. 1-16, 2019.

RASCHE, F.; KNAPP, D.; KAISER, C.; KORANDA, M.; KITZLER, B.; ZECHMEISTER-BOLTENSTERN, S; SESSITSCH, A. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. **The ISME Journal**, v. 5, n. 3, p. 389-402, 2011.

RAY, D. K.; MUELLER, N. D.; WEST, P. C.; FOLEY, J. A. Yield trends are insufficient to double global crop production by 2050. **PloS One**, v. 8, n. 6, p. e66428, 2013.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R.; GONZALEZ, T.; BASHAN, Y. Genetic modifications of phosphate solubilizing bacteria to be used as agricultural inoculants. **International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization**, v. 1, p. 23-24, 2002.

ROUSK, J.; BÅÅTH, E.; BROOKES, P. C.; LAUBER, C. L.; LOZUPONE, C.; CAPORASO, J. G.; FIERER, N. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. **The ISME Journal**, v. 4, n. 10, p. 1340-1351, 2010.

ROYAL AGRICULTURAL SOCIETY OF NSW, 2017. **Annual Report**. 2017. Disponível em: https://www.rasnsw.com.au/globalassets/document-library/annual-report/2016/2017_Annual_Report. Acesso em: 10 set. 2019.

SALAM, M. A.; ALAM, M. K.; RASHID, M. H. Effects of different tillage practices and cropping patterns on soil physical properties and crop productivity. **Journal of Tropical Resources and Sustainable Sciences**, v. 1, n. 1, p. 51-61, 2013

SCHIMEL, J. P.; BENNETT, J. Nitrogen mineralization: challenges of a changing paradigm. **Ecology**, v. 85, p. 591 – 602, 2004.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Biotechnological prospects from metagenomics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 303-310, 2003.

SCHMALENBERGER, A.; HODGE, S.; BRYANT, A.; HAWKESFORD, M. J.; SINGH, B. K.; KERTESZ, M. A. The role of Variovorax and other Comamonadaceae in sulfur transformations by microbial wheat rhizosphere communities exposed to different sulfur fertilization regimes. **Environ. Microbiol**, v.10, p. 1486–1500, 2008.

SHARMA, S.; KUMAR, V.; TRIPATHI, R. B. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 90-95, 2011.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilization of phosphates by microorganisms in the presence of carbon sources. **Brazilian Journal of Soil Science**, v. 24, n. 2, p. 311-329, 2000.

SINGH, B. K.; BARDGETT, R. D.; SMITH, P.; REAY, D. S. Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 779-790, 2017.

SOUCHIE, E. L.; AZCÓN, R.; BAREA, J. M.; SAGGIN-JÚNIOR, O. J.; SILVA, E. M. R. D. Phosphate solubilization and synergism between P-solubilizing and arbuscular mycorrhizal fungi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 9, p. 1405-1411, 2006.

SRINIVASAN, R.; YANDIGERI, M. S.; KASHYAP, S.; ALAGAWADI, A. R. Effect of salt on survival and P-solubilization potential of phosphate solubilizing microorganisms from salt affected soils. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 4, p. 427-434, 2012.

STAUFFER, M. D.; SULEWSKI, G. Phosphorus essential for life In: **Phosphorus in Brazilian Agriculture**. Piracicaba: Potafós, p. 1-12, 2004.

- STEWART, W. Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms. **Ann. Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 283–316, 1973.
- TANK, N.; SARAF, M. Phosphate solubilization, exopolysaccharide production and indolacetic acid secretion by rhizobacteria isolated from *Trigonella graecum*. **Indian J. Microbiol.**, v. 4, p. 37 – 40, 2003.
- TRIPATHI, B. M.; STEGEN, J. C.; KIM, M.; DONG, K.; ADAMS, J. M.; LEE, Y. K. Soil pH mediates the balance between stochastic and deterministic assembly of bacteria. **The ISME Journal**, v. 12, n. 4, p.1 072-1083, 2018.
- TROLOVE, S. N.; HEDLEY, M. J.; KIRK, G. J. D.; BOLAN, N. S. Loganathan, P. Progress in selected areas of rhizosphere research on P acquisition. **Australian Journal of Soil Research**, p. 471–499, 2003.
- VAN DER HEIJDEN, M. G.; BARDGETT, R. D.; VAN STRAALLEN, N. M. (The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**, v. 11, n. 3, p. 296-310, 2008.
- VAN VEEN, J. Á.; VAN OVERBEEK.; L. S.; VAN ELSAS, J. D. Destination and activity micro-organisms introduced into the soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 2, p. 121-135, 1997.
- VENKATESHWARAN, M.; VOLKENING, J. D.; SUSSMAN, M. R.; ANÉ, J. M. Symbiosis and the social network of higher plants. **Curr Opin Plant Biol**, v. 16, p. 118–127, 2013.
- VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; LOPEZ, A.; MARTOS, V.; REYES, A.; MAKSIMOVIC, I.; EICHLER-LÖBERMANN, B.; MALUSÀ, E. Unexplored potential of some biotechnological techniques for the production and formulation of biofertilizers. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2015
- WAGG, C.; BENDER, S. F.; WIDMER, F.; VAN DER HEIJDEN, M. G. Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 14, p. 5266-5270, 2014.
- WEYENS, N.; VAN DER LELIE, D.; TAGHAVI, S.; VANGRONSVELD, J. (Phytoremediation: plant–endophyte partnerships take the challenge. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 248-254, 2009.
- WITHERS, P. J.; RODRIGUES, M.; SOLTANGHEISI, A.; DE CARVALHO, T. S.; GUILHERME, L. R.; BENITES, V. D. M.; PAVINATO, P. S. Transitions to sustainable management of phosphorus in Brazilian agriculture. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

YANG, J.; KLOEPPER, J. W.; RYU, C. M. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 1-4, 2009.

YOSE, F. B. Root. Excretions and their environmental effects. Influence on availability of phosphorus. In: WAISEL Y, ESHEL A, KAFKAFI U (Eds). **Plant roots. The hidden half**. New York: Dekker, p. 529–557, 1991.

ZARRAONAINDIA, I.; OWENS, S. M.; WEISENHORN, P.; WEST K.; HAMPTON-MARCELL, J.; LAX, S. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. **mBio**, v. 6, p. 27-14, 2015.

ZHALNINA, K.; DIAS, R.; DE QUADROS, P. D.; DAVIS-RICHARDSON, A.; CAMARGO, F. A.; CLARK, I. M.; TRIPLETT, E. W. Soil pH determines microbial diversity and composition in the park grass experiment. **Microbial ecology**, v. 69, n. 2, p. 395-406, 2015.

ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 5, p. 723-735, 2008.

ANEXOS

ANEXO I - Análise química do solo com cultivo de videira e área nativa

Parâmetros	12 anos	60 anos	120 anos	Nativa
Argila %	30	25	21	13
pH/H ₂ O	5,9	6,9	5,9	5,6
Índice SMP	6,1	6,6	6,1	5,6
P mg/kg ⁻¹	33,5	12,5	102,5	14,5
K mg/kg ⁻¹	285	106	285	416
M.O.%	3,4	5,8	6	10,1
Al cmolc kg ⁻¹	0	0	0	0
Ca cmolc kg ⁻¹	8,5	17,4	12,2	21,4
Mg cmolc kg ⁻¹	2,5	5,3	2,8	3,8
CTC efetiva cmolc kg ⁻¹	11,7	23	15,7	26,3
CTC pH 7,0 cmolc kg ⁻¹	15,6	25,2	19,6	33,2
H+Al cmolc kg ⁻¹	3,9	2,2	3,9	6,9
Bases%	75	91,3	80,1	79,2
Al%	0	0	0	0
k%	4,7	1,1	3,7	3,2
Ca%	54,4	69,1	62,2	64,5
Mg%	16	21,1	14,3	11,5
S mg kg ⁻¹	14,6	21,6	16,6	36
Zn mg kg ⁻¹	30	50,5	67,5	19,2
Cu mg kg ⁻¹	20,9	440	600	0,3
B mg kg ⁻¹	0,5	0,59	0,54	1,33
Mn mg kg ⁻¹	48	14	42	39

ANEXO II - Resultados da análise de componente principais (PCA)

Parâmetros	PC1	PC2	PC3	PC4
Argila %	-0.26300291	-0.10546255	-0.283755320	-0.09768069
pH/H ₂ O	-0.22527774	0.23841398	-0.108761814	0.21136271
Índice SMP	-0.29249620	0.13819329	-0.075855860	-0.10670720
P mg/kg ⁻¹	-0.10425064	-0.18021602	0.455684890	-0.09071935
K mg/kg ⁻¹	0.27605410	-0.17079317	0.086988681	-0.06660964
M.O.%	0.27057562	0.14930286	0.190722941	-0.13886616
Ca cmolc kg ⁻¹	0.20472470	0.26321501	0.073436882	-0.12899219
Mg cmolc kg ⁻¹	-0.02583504	0.34134898	-0.074740034	0.18669823
CTC efetiva cmolc kg ⁻¹	0.18381760	0.28205949	0.052117434	-0.06835283
CTC pH 7,0 cmolc kg ⁻¹	0.24088171	0.22687057	0.059396457	-0.12382784
H+Al cmolc kg ⁻¹	0.31299044	-0.07668248	0.054016722	0.08670782
Bases%	-0.12537890	0.31699460	0.046343462	-0.74202603
k%	0.06361271	-0.33824911	-0.025392301	-0.13073095
Ca%	0.01124164	0.32721241	0.183625407	0.47889726
Mg%	-0.25947028	0.17154316	-0.187887703	-0.05697479
S mg kg ⁻¹	0.28332486	0.16491512	0.007012522	-0.01072105
Zn mg kg ⁻¹	-0.23420785	0.02218594	0.395065243	0.13123046
Cu mg kg ⁻¹	-0.20847737	0.08941353	0.414260684	0.01229874
B mg kg ⁻¹	0.30998127	0.09495363	0.012810653	0.01783861
Mn mg kg ⁻¹	0.10525762	-0.32576417	0.035645631	-0.02142478

Nota: P - Fósforo, K - Potássio, M.O - Matéria orgânica, Ca - Cálcio, Mg - Magnésio, H+Al - Acidez potencial, S - Enxofre, Zn - Zinco, Cu - Cobre, B - Boro, Mn - Manganês.



PPGAgro
Programa de Pós-Graduação
em Agronomia