

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

VINICIUS DORIGONI

**BIOENGENHARIA DE FITOMICROBIOMA NA MODULAÇÃO DA PLASTICIDADE
FENOTÍPICA DE *Cucumis sativum***

FRANCISCO BELTRÃO

2021

VINICIUS DORIGONI

**BIOENGENHARIA DE FITOMICROBIOMA NA MODULAÇÃO DA PLASTICIDADE
FENOTÍPICA DE *Cucumis sativum***

**BIOENGINEERING OF PHYTMICROBIOMA IN THE MODULATION OF THE
PHENOTYPIC PLASTICITY OF *Cucumis sativum***

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Análise e Tecnologia
Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Orientador: Prof. Dr. Eder da Costa dos Santos.

Coorientador: Prof. Dr. Ronan Carlos Colombo.

FRANCISCO BELTRÃO

2021



Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos.

Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



VINICIUS DORIGONI

**BIOENGENHARIA DE FITOMICROBIOMA NA MODULAÇÃO DA PLASTICIDADE FENOTÍPICA DE
CUCUMIS SATIVUM**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Meio Ambiente.

Data de aprovação: 17 de Junho de 2021

Prof Eder Da Costa Dos Santos, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Luciano Lucchetta, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Rafael Borges Da Silva Valadares, Doutorado - Universidade Vale do Rio Doce (Univale)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 17/06/2021.

AGRADECIMENTOS

A conclusão dessa pesquisa foi um desafio, a sua realização aconteceu em um dos períodos mais difíceis já passados durante toda a minha jornada, até aqui vivida; inúmeros fatores fizeram com que a caminhada fosse árdua, até chegar o dia da celebração e da conquista. Sem o apoio de todos citados abaixo, esta pesquisa não teria sido finalizada; agradeço pela paciência, companheirismo, e auxílio de qualquer forma, mas que me ajudaram a concluir essa fase muito importante da minha vida.

Ao meu orientador e amigo professor Dr. Eder da Costa dos Santos, pelo apoio e incentivos, e por ser um guia nesta etapa, por trazer tranquilidade nos momentos difíceis e orientações.

Ao amigo, Franklin Ângelo Krukoski, por compartilhar seu conhecimento em estatística, pela mentoria e pelo apoio nas interpretações dos dados.

Ao Sr. Moacir Baldissarelli, por confiar na ideia do projeto e por liberar o espaço físico da sua empresa para a aplicação e condução do trabalho.

A minha família pelo apoio em momentos onde houve dúvidas e aflições.

Ao meu coorientador, professor Ronan Carlos Colombo, por compartilhar suas ideias e pela parceria em desbravar esse assunto e visto oportunidades na pesquisa e pela amizade feita.

Aos colegas, amigos pessoas que de uma forma ou de outra, cruzaram o meu caminho, que com palavras incentivaram e me apoiaram, me ofereceram companhia, carinho e conselhos, obviamente também pelos momentos de alegria e, por acreditarem na minha capacidade.

“Não existe vento favorável à quem não sabe onde deseja ir. “

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O crescimento vegetal está diretamente relacionado com a ciclagem de nutrientes e ação dos microrganismos existentes no solo, na rizosfera e na filosfera das plantas. A interação que ocorre entre um conjunto de microrganismos e a plantas é caracterizada como fitomicrobiota, que, se associada a planta hospedeira pode acarretar em alteração nos seres holobiontes. Essas associações podem acarretar em mudanças no perfil do fitomicrobioma que se traduzem em respostas fisiológicas no perfil da planta, que podem ser positivas ou negativas, dependendo dos grupos microbianos consorciado e dos nutrientes disponíveis no solo e originados nestas interações. Este referido trabalho propôs-se a avaliar se a aplicação de consórcio microbiano confeccionado *in vitro* acarreta na modificação na microbiota de plantas cultivadas da espécie *Cucumis sativum* em ambiente controlado. O experimento *in loco* foi realizado em ambiente controlado e protegido, onde as plantas foram transplantadas em vasos para o seu desenvolvimento e aplicação controlada do consórcio microbiano. A implantação do estudo ocorreu em cinco tratamentos, sendo estes: controle, solo estéril, e, realizada a aplicação do consorcio microbiano na filosfera, rizosfera, filosfera mais rizosfera.

Palavras Chave: fitomicrobioma; microrganismos; bioengenharia; microbiota; *Cucumis sativum*.

ABSTRACT

Plant growth is directly related to nutrient cycling and the action of microorganisms in the soil, rhizosphere and phyllosphere of plants. The interaction that occurs between a group of microorganisms and plants is characterized as phytomicrobiota, if associated with the host plant can cause changes in the holobionts. These associations can lead to changes in the phytomicrobiome profile resulting in physiological responses in the plant profile, which can be positive or negative, it depends on the intercropped microbial groups and the nutrients available in the soil, and the ones originated in these interactions. This work aimed to evaluate if the application of microbial consortium made *in vitro* causes changes in the microbiota of cultivated plants of the species *Cucumis sativum* in a controlled environment. The *In loco* experiment was carried out in a controlled and protected environment, where the plants were transplanted in pots for their development and controlled application of the microbial consortium. The implementation of the study has taken place in five treatments, namely: control, sterile soil, and the application of the microbial consortium in the phyllosphere, rhizosphere, phyllosphere and rhizosphere combined was carried out.

Key Words: phytomicrobiome; microorganisms; bioengineering; microbiota; *Cucumis sativum*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Interações do Fitobioma	21
Figura 2 - Local de instalação dos ensaios.....	26
Figura 3 - Foto área e geolocalização do Viveiro Baldissarelli.	27
Figura 4 - Geolocalização do local de amostragem do solo.	28
Figura 5 - Local da amostragem do solo utilizado para o isolamento de microrganismos.....	29
Figura 6 - Semeadura para efetuar o Teste de Germinação	30
Figura 7 – Condições de cultivo para o teste de emergência	31
Figura 8 - Controle de crescimento das mudas e verificação de desenvolvimento ..	31
Figura 9 – Disposição dos vasos no túnel plástico.	33
Figura 10 – Separação e seleção de plântulas de pepino e aplicação do inóculo....	34
Figura 11 – Re-inoculações das plantas na parte aérea e raiz.....	35
Figura 12 – Medição de plantas	35
Figura 13 - Desenvolvimento das plantas e ataque de pulgões	35
Figura 14 - Plantas em desenvolvimento e planta do ensaio A perecendo	36
Figura 15 - Planta perecida, planta apresentando frutos e folhas amareladas e plantas com frutos.....	36
Figura 16 - Plantas perecendo, coleta de massa seca e frutos	36
Figura 17 - Quantificação da matéria seca (A) e frutos (B).....	37
Figura 18 - Quantificação do Solo dos ensaios	38
Figura 19 – Distribuição das medidas de altura das plântulas.....	42
Figura 20 - Distribuição das medidas da altura das plantas de pepino cultivadas em ambiente protegido.....	43
Figura 21 - Distribuição das medidas do diâmetro das plantas de pepino cultivadas em ambiente protegido.....	44
Figura 22 - Distribuição das medidas do peso dos frutos de pepino cultivados em ambiente protegido.....	48
Figura 23 - Distribuição das medidas do diâmetro dos frutos de pepino cultivados em ambiente protegido.....	51
Figura 24 - Distribuição das medidas do comprimento dos frutos de pepino cultivados em ambiente protegido.....	52

Figura 25 - Distribuição das medidas de massa seca das plantas cultivadas em ambiente protegido.....53

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos sobre a sinalização e interações químicas moduladas pela rizomicrobiota	17
Quadro 2 - Estudos de distintos compartimentos do fitomicrobioma	17
Quadro 3 - Distribuição dos tratamentos e repetições no arranjo experimental.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Emergência de plântulas no tratamento controle.....	40
Tabela 2 - Emergência de plântulas no tratamento inoculado.	40
Tabela 3 - Emergência de plântulas no tratamento solução de inoculação estéril....	40
Tabela 4 - Altura das plântulas emergidas.....	41
Tabela 5 - Altura das plantas de pepino (cm.planta ⁻¹) no ensaio em ambiente protegido em total de dias.....	42
Tabela 6 - Diâmetro das plantas de pepino ao longo do período de cultivo.....	43
Tabela 7 - Peso dos frutos de pepino cultivado em ambiente protegido.....	48
Tabela 8 - Diâmetro dos frutos de pepino cultivado em ambiente protegido.	50
Tabela 9 - Comprimento dos frutos de pepino cultivado em ambiente protegido.	52
Tabela 10 - Massa seca das plantas cultivadas em ambiente protegido.	53
Tabela 11 - Análise do solo realizada após o cultivo da cultura do pepino.....	54
Tabela 12 - Análise do solo realizada após o cultivo da cultura do pepino (continuação).....	54
Tabela 13 - Sequencial do ensaio implantado de forma heterogênea no ambiente controlado.....	63
Tabela 14 - Crescimento das plantas - Controle.....	67
Tabela 15 - Crescimento das plantas - Estéril	68
Tabela 16 - Crescimento das plantas - Filosfera.....	69
Tabela 17 - Crescimento das plantas - Rizosfera	70
Tabela 18 - Crescimento das plantas - Rizosfera e Filosfera.....	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	12
2.1	Objetivo geral	12
2.2	Objetivos específicos	12
3	JUSTIFICATIVA	13
4	REVISÃO DA LITERATURA	15
4.1	Evolução e inter-relações mutualísticas	15
4.1.1	Microbioma e Fitomicrobioma	15
4.1.2	Fitomicrobiota	18
4.1.3	Fitobioma	21
4.1.4	Bioengenharia de fitomicrobioma	22
4.1.5	Pepino (<i>Cucumis sativum</i>)	23
5	MATERIAIS E MÉTODOS	26
5.1	Localização e descrição da área experimental	26
5.1.1	Caracterização do Cultivo <i>in loco</i>	26
5.2	Isolamento de microorganismos	28
5.3	Teste de emergência e avaliação do potencial de patogenicidade do consórcio microbiano	30
5.4	Ensaio a campo	32
5.5	Quantificação da massa seca e frutos	37
5.6	Análise de solo	37
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
6.1	Teste de emergência e potencial de patogenicidade do inóculo	39
6.2	Análises fitobiométricas	42
7	CONCLUSÕES	55
	REFERÊNCIAS	56

APÊNDICE A – Sequencial do ensaio	62
APÊNDICE B - Desenvolvimento das plantas	65

1 INTRODUÇÃO

É notório que os primeiros seres fotossintetizantes de nosso planeta foram microrganismos, os quais foram imprescindíveis para a oxigenação da atmosfera e para a evolução das células vegetais como as conhecemos. Neste contexto, plantas e suas comunidades microbianas, associadas e mutualistas, vem interagindo em processo de co-evolução por milhares de anos.

O resultado destas interações, apesar de serem pouco exploradas, é majoritariamente positiva e benéfica para as plantas. Logo, todos os tecidos das plantas, sejam internos ou externos, abrigam uma grande diversidade e quantidade de microrganismos de diferentes taxas, tais como fungos, bactérias e arqueas.

Cada tecido que serve como um nicho ao desenvolvimento de microrganismos específicos, têm sido explorados de maneira isolada, e são designados conforme o compartimento colonizado, em: rizosfera (região da raiz), filosfera (parte aérea geral) e endosfera (parte interna dos tecidos) (Vorholt, 2012). Os mecanismos pelos quais a planta controla a estruturação das comunidades microbianas na filosfera não são conhecidos; é possível que a estruturação das comunidades seja modulada pela interação de vários fatores ambientais promovendo alterações na abundância relativa das populações microbianas em diferentes espécies (Berdugo, 2016). A compreensão da interação entre genótipo da planta e os genótipos dos microrganismos das comunidades (Kim et al., 2012), assim como a identificação de genes vegetais essenciais para a organização das comunidades microbianas na filosfera, são fundamentais para o manejo da microbiota na folha para o aumento da produção vegetal (Muller; Ruppel, 2014). As plantas vivem em estreita associação com comunidades microbianas complexas e diversas que constituem a microbiota, cujos membros têm efeitos benéficos sobre o crescimento do mesmo (Philippot et al., 2013). Segundo o próprio (Philippot et al., 2013) Microbiota vegetal é o conjunto de microrganismos associados às plantas: Fitomicrobiota. Fitomicrobiota + Planta (Hospedeiro): Entidade Holobionte-Funcional.

A fitomicrobiota, as plantas e esses microrganismos associados, não, apenas aqueles que colonizam sua parte superficial, mas também a parte interna os endófitos, eles interagem uns com os outros formando um conjunto de espécies que é muitas vezes referido como "holobionte". Compreender e aproveitar essas interações para a produção sustentável de alimentos, combustível e fibra, para apoiar uma população

mundial crescente com uma oferta cada vez maior de alimento, com uma quantidade menor de terra, e, menos arável é o desafio para as gerações futuras (López, 2021).

A importância da microbiota associada às plantas ganhou ênfase em 1904, quando Lorenz Hiltner cunhou o termo rizosfera pela primeira vez, e reportou em sua pesquisa a importância dos microrganismos no crescimento e proteção das plantas contra patógenos. Cujas hipóteses defendia que a resistência das plantas dependia da diversidade de microrganismos na rizosfera (Hartmann, Rothballer & Schmid, 2008).

A partir de então, os estudos focados na relação planta-microrganismo ganharam destaque, resultando no melhor entendimento nas inter-relações ecológicas entre as espécies envolvidas, ao passo que na atualidade o conceito de holobiontes está bem estabelecido e na vanguarda do conhecimento.

Assim, holobiontes são entidades biológicas compostas por um hospedeiro e seus microrganismos simbióticos, formando uma unidade evolutiva única, integrada por relações genéticas (meta epigenética) e metabólicas, de tal forma a promover a adaptação ambiental à homeostase fisiológica. A “conversa cruzada” entre as espécies presentes no holobionte, mediada por compostos químicos, tais como micro RNAs, tem potencial para modificar o epigenoma do hospedeiro.

Neste contexto, fica evidente que a plasticidade fenotípica observada em espécies eucarióticas superiores, tais como nas plantas, não deve ser atribuída exclusiva e intrinsecamente ao indivíduo enquanto espécie, mas também pela microbiota que a acompanha (Vandenkoornhuyse et al., 2015).

Dada a complexidade destas metas simbióticas, não só a definição de holobionte foi estendida, mas, por sua vez, foram cunhados novos termos que constituem um vocabulário, e, um quadro mais amplo para se referir à biologia do hospedeiro à luz do microbioma. Um exemplo é o termo hologenoma, que se refere ao metagenoma resultante da soma do genoma do hospedeiro com os genomas microbianos, que constituem uma unidade biológica evolutiva única.

O presente estudo teve por objetivo avaliar as alterações biométricas no desenvolvimento de plantas de *Cucumis sativum*, cultivadas em vasos, e, em ambiente protegido, adicionadas de um consórcio microbiano, manipulado *in vitro*, e comparar as mudanças no fenótipo entre plantas bioengenheiradas e plantas controle, da espécie vegetal em questão.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o efeito da aplicação de um consórcio microbiano, manipulado *in vitro*, em plantas de *Cucumis sativum* cultivadas em ambiente protegido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar parâmetros biométricos durante o crescimento de plantas da espécie *Cucumis sativum* inoculadas com um consórcio microbiano;

Comparar as alterações fenotípicas qualitativas observáveis nos ensaios antes e após a aplicação dos tratamentos;

Quantificar a biomassa (planta e fruto) produzida e suas alterações antes e após a aplicação dos tratamentos.

3 JUSTIFICATIVA

As técnicas de bioengenharia têm sido utilizadas desde o Império Romano para controlar os problemas de erosão em taludes e margens de rios, em diferentes partes do mundo (Dos Santos Skrzyszowski, 2021), mas a sua aplicação ganhou e expandiu para diversas áreas de aplicação de acordo, como exemplo (Vasconcelos, 2018) evidenciou que a articulação entre os conhecimentos de bioengenharia e de processamento de alimentos é um caminho efetivo para a redução das perdas ao longo da cadeia produtiva de alimentos. Sabe-se que a atividade microbiana é a principal responsável pelas características apresentadas nos ecossistemas existentes no planeta.

A atividade antrópica com o passar dos séculos, foi a principal responsável pela aceleração abrupta das alterações dos ecossistemas existentes, ocasionando o rompimento da conectividade existente entre os seres hospedeiros e os microrganismos, isto acarretou em perturbações e alterações na microbiota dos ecossistemas, como exemplo desequilíbrio ambiental que vem sendo notado nos últimos séculos.

A engenharia de microbioma leva a planta a desenvolver benefícios desde antes da sua germinação até o seu término de produção, pode-se citar a melhoria das características das culturas, aprimoramento da produtividade, aquisição de resistência a doenças e pragas, resistência a excessos de períodos extremos de chuvas ou incidência solar. Estes atualmente são alguns fatores que quando não aplicados metodologias e sistemas de controle, acarretam em danos e perdas aos cultivares; Como resultado e na busca constante de melhoria destas ações, abre-se a oportunidade de aplicar a engenharia de microbioma para a melhoria da produção e desenvolvimento dos cultivares.

A microbiota ou microbioma, é responsável por manter o equilíbrio no meio onde há a existência de várias espécies de seres vivos, com isso, justifica-se a importância dos estudos relacionados a esta área.

A manipulação de microbioma de plantas e estudos relacionados ao transplante da microbiota, apresentam que estes podem acarretar no controle de doenças, aumento de produção agrícola, diminuição de insumos químicos e redução de emissões de gases de efeito estufa.

O presente estudo tem o objetivo, verificar e estudar o potencial desenvolvimento da espécie de pepino *Cucumis sativum*, com a interferência no genótipo das plantas com a aplicação de tratamentos diferentes áreas e áreas expostas a diferentes microbiomas, e verificar a interferência no fenótipo das plantas durante o seu desenvolvimento, em virtude do desenvolvimento e atividade microbiana nos diferentes ensaios.

Inserese aqui um tópico importante que é a produção em larga escala de produtos de fomento alimentar, com o apelo a redução do uso de defensivos agrícolas com práticas sustentáveis, reduzindo a degradação do solo e contaminação do meio ambiente.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 EVOLUÇÃO E INTER-RELAÇÕES MUTUALÍSTICAS

4.1.1 Microbioma e Fitomicrobioma

Desde o surgimento da vida, e, ao longo de milhares de milhões de anos de evolução, os microrganismos têm estado onipresentes e amplamente distribuídos em nosso planeta. Vivendo de forma livre ou associados a hospedeiros, o fato é que todos os seres vivos existentes na biosfera de hoje, são heranças evolutivas de organismos unicelulares primitivos. Ou seja, todos são arranjos filogenéticos promovidos a partir de adaptações em células microbianas.

Sem dúvida, todas as modificações metabólicas, de células a tecidos complexos, que permitiram a adaptação às mais diversas condições ambientais, e que, continuam evoluindo de tal forma a garantir a persistência e a resiliência das espécies na Terra, estão inter-relacionadas a coexistência de múltiplas espécies de distintos taxa. Embora não sendo consenso, habitamos um planeta que é basicamente microbiano, dominado pela onipresença de comunidades microbianas, seja relativo em biomassa ou em diversidade genética. Estas comunidades microbianas, quando associadas a um hospedeiro, são conhecidas como microbiomas, e podem existir persistentemente em hospedeiros vivos, como humanos, animais e plantas, bem como no solo, oceanos e ar (Foo, Ji & Ling, Hua & Seng Lee, Yung & Wook Chang, Matthew, 2017).

Os primeiros estudos relacionados a co-evolução de inter-espécies foram conduzidos com foco no microbioma humano, o qual revelou uma enorme dependência do metabolismo antropogênico por substâncias sintetizadas exclusivamente pelo metabolismo microbiano. Desde então, se tem clareza da importância do microbioma humano em modificar o metabolismo do hospedeiro no que tange a antagonismo de patógenos, produção de antibióticos e hormônios, biossíntese de vitaminas e outras substâncias que ainda não se sabe o papel fisiológico.

Assim, o corpo humano pode ser considerado um superorganismo, um ser holobionte, o qual abriga cerca de 10 vezes mais células microbianas do que as células somáticas do próprio corpo. Um estudo realizado com a microbiota intestinal humana, demonstrou que há cerca de 3,3 milhões de genes microbianos somente no

intestino humano, sendo que isso representa 150 vezes mais genes microbianos do que no próprio genoma humano. Este estudo ainda revelou que somente a diversidade bacteriana é composta por aproximadamente 1000 espécies não redundantes e endêmicas do intestino, sendo a maioria pertencente aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes* (Wang, Zhu, Li, 2010). As comunidades microbianas variam em toda a paisagem e em solos florestais, mas a previsão de sua biomassa e composição é um desafio difícil devido ao grande número de variáveis que influenciam sua comunidade estruturas (Santos et al., 2014).

Muito embora estudos focados em microbioma tenham começado e avançado predominantemente na área médica humana, o que se observa é que esse tema vem ganhando força nas mais distintas áreas do conhecimento, com destaque para o entendimento do microbioma de plantas (Fitomicrobioma).

O fitomicrobioma pode ser descrito como a comunidade microbiana total associada a dada uma planta, sob uma determinada condição ambiental, e em um dado momento. Isso porquê a estrutura funcional destas comunidades é altamente dinâmica no que se refere a diversidade genética, e seus indicadores de riqueza e equitabilidade.

Neste contexto, os primeiros estudos relacionados a influência de comunidades microbianas associadas às plantas, começou com a exploração da região da rizosfera de leguminosas, e revelou um sofisticado e intrincado sistema de sinalização e modulação entre a planta e os microrganismos (Otto, et al, 2020), dando início a uma miríade de novos estudos. Apesar disso, a grande maioria dos estudos têm focado no microbioma de tecidos específicos de plantas, tais como rizosfera, filosfera (que compreende dermosfera, anterosfera e filoplano) e endosfera. O foco dos estudos em fitomicrobioma são bastante variados, indo da pesquisa básica sobre a ecologia destas comunidades microbianas ao papel destas na fitossanidade e produção agrícola.

Do ponto de vista de produção agrícola o que se sabe de concreto é que muitas destas comunidades microbianas são categorizadas como promotoras de crescimento de plantas e antagonistas de fitopatógenos, e desta forma, possuem potencial biotecnológico agrícola.

Estudos têm confirmado esse potencial biotecnológico por deciframos sinais moleculares e compostos bioquímicos que atuam em mecanismos de sinalização que favorecem inúmeras espécies vegetais prosperarem em ambientes pouco favoráveis

a manutenção da vida. No quadro 1 é mostrado estudos sobre o papel do rizomicrobiota na sinalização e interações químicas na rizosfera de várias plantas agrícolas.

Quadro 1 - Estudos sobre a sinalização e interações químicas moduladas pela rizomicrobiota

Espécie de planta	Microrganismo	Sinalizador químico	Técnica empregada	Referências
Tomate	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomate</i>	Benzotiadiazol	RT-PCR	5
Feijão	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	N-acil-homoserina-lactonas (AHLs)	RT-PCR, Fluorescência, Microscopia	6
Arroz	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1-hidroxifenazina, piocianina, ácido lahorenóico, pioquelina, ramnolipídio	Espectrometria de massas	8
Batata	<i>Pseudomonas</i> sp. LBUM223	Fenazina	qPCR e análise RT-qPCR	12
Girassol	<i>Glomus</i> sp.	Benzotiadiazol	-	14
Lotus japonicus	<i>Gigaspora margarita</i>	Estrigolactona	Análise espectroscópica	17

Fonte: Autoria própria (2020).

Não obstante, como mencionado anteriormente, o fitomicrobioma é amplamente distribuído e específico a cada tecido, e dinâmico, de acordo com estágio de desenvolvimento da planta, e por este motivo muitos estudos relativos à ecologia do fitomicrobioma tenham sido realizados no quadro 2.

Quadro 2 - Estudos de distintos compartimentos do fitomicrobioma

Compartimento	Espécie de planta	Método de estudo	Estrutura da comunidade	Referência
Rizomicrobioma (Rizosfera)	Alface	Pirossequenciamento	Comunidades bacterianas (<i>Sphingomonas</i> , <i>Rhizobium</i> ; <i>Pseudomonas</i> e <i>Variovorax</i>)	36
Rizomicrobioma (Rizosfera)	Milho	Pirossequenciamento	Diversidade bacteriana (<i>Proteobacterias</i> e <i>Actinobacterias</i>)	37
Filomicrobioma (Filosfera)	Alface	Pirossequenciamento	Diversidade bacteriana	38

			(Enterobacteriaceae e Famílias Moraxellaceae)	
Endomicrobioma (Endosfera)	Milho transgênico	DGGE	Comunidades endofíticas (bactérias, arqueas e fungos)	44

Fonte: Autoria própria (2020).

Muito embora as plantas sejam “controladas” por inúmeros fatores, relacionados à fisiologia e estado nutricional, em escala temporal e espacial, a atividade rizosférica é dependente da taxa fotossintética. Ou seja, dependente da parte aérea, que implica no mecanismo de fixação do carbono e conseqüentemente na capacidade de produção exsudatos. Seguindo esta lógica, os exsudatos possuem papel crucial no estabelecimento da colonização microbiana da raiz e solo adjacente, por meio da produção de substâncias químicas. Esta sinalização química na forma de exsudatos tem papel imprescindível na composição da comunidade microbiana rizosférica e, conseqüentemente, na capacidade de resposta da planta às condições ambientais.

Muitas espécies microbianas secretam compostos químicos extracelulares, tais como enzimas, fito hormônios, ácidos orgânicos, entre outros. E estes compostos acabam por ativar o sistema imune das plantas. Essa intrincada rede de cooperação entre planta e microbiota envolve um complexo sistema de sensor de quórum (*Quorum sensing*) que implica na “composição” de distintos metafenótipos (fenótipo da comunidade microbiana) e, conseqüentemente no fenótipo da planta.

Contudo, ainda existem muitas perguntas em aberto relativo ao potencial de se utilizar o conhecimento à cerca das inter-relações em benefício da segurança alimentar e a sustentabilidade dos sistemas de produção agrícola.

4.1.2 Fitomicrobiota

Estudos relativos ao papel metafisiológico desempenhado pelas comunidades microbianas associadas às plantas têm despertado o interesse biotecnológico à agricultura. Há evidências científicas consideráveis na literatura de que microrganismos mutualísticos podem alterar a taxa crescimento e a morfologia vegetal, bem como, maximizar a disponibilidade de nutrientes e promover o antagonismo de patógenos às plantas (Venkatachalam, et al., 2014). Como resultado da interação biológica, se formam redes complexas de protocooperação, que são

estabelecidas e reguladas por competição, predação, patogênese, mutualismo, em função de comunicação química constituída por uma gama diversa de moléculas de sinalização (Leach et al., 2017).

Tais evidências, comprovam que as comunidades microbianas podem afetar, tanto positivamente quanto negativamente, a resiliência vegetal, e, conseqüentemente os sistemas de produção agrícola, e por esta razão o tema está em alta (Berg et al., 2013; Bulgarelli et al., 2013; Mendes et al., 2014).

Além da importância para a planta, sabe-se que comunidades microbianas, como as que se fazem presente na rizosfera, são imprescindíveis para os ecossistemas terrestres, uma vez que catalisam processos biogeoquímicos singulares que são fundamentais à ciclagem de nutrientes na biosfera (Berg et al., 2014).

Não obstante, estudos focados no entendimento das inter-relações bioquímicas e fisiológicas do fitomicrobioma que impactam o fenótipo da planta hospedeira ainda são muito limitados e, quase completamente desconhecidos. Majoritariamente, estudos têm sido conduzidos para determinar como os atributos bióticos no solo, tais como, biomassa, diversidade, atividade enzimática e taxa de respiração microbiana, podem servir para o monitoramento do impacto ambiental decorrente das práticas agrícolas (Epelde et al., 2014; Ferreira et al., 2010; Ferreira; Wendland; Didonet, 2011).

Desta forma, a ênfase tem sido abordagens indiretas, que enfatizam as comunidades microbianas como bioindicadores da degradação ambiental (em especial no solo), e, por conseguinte, à sanidade das plantas cultivadas. Embora seja inquestionável a relevância das pesquisas voltadas a sustentabilidade ambiental, existe uma enorme lacuna em termos de biologia intersistêmica, no que tange ao entendimento da meta-homeostase (ou disbiose) entre planta hospedeira e seu microbioma à luz da holossimbiose.

Atualmente, o melhor entendimento sobre inter-relações entre hospedeiros e microbiomas são de pesquisas médicas sobre microbioma humano. Se o padrão revelado em humanos se estender às plantas, é muito provável que boa parte do conteúdo genético no genoma das plantas tenha origem microbiana e tenha sido inserido por meio transferência horizontal (transformação, conjugação, transdução, agentes de transferência de genes). Caso isso seja comprovado, os tecidos vegetais devem possuir mais células microbianas que suas células somáticas, e conseqüentemente, centenas de vezes mais informações gênicas de origem

microbiana que das próprias células da planta. Considerando que os processos evolutivos são parcimoniosos, em cada ecossistema, incluindo as plantas, a homeostase celular impõe uma divisão de trabalho entre as espécies, para maximizar a utilização de recursos.

Em humanos, a serotonina, um neurotransmissor crítico para o funcionamento do cérebro, é produzido por células entero endócrinas presentes no intestino, as quais foi revelado que a produção deste hormônio é modulada em resposta ao metabolismo microbiano. Assim, se o microbioma não induz a produção suficiente, ou induz em excesso, a saúde do indivíduo é seriamente comprometida. Logo, esse é um exemplo evidente de como a microbiota colonizadora de um hospedeiro, pode, e, promove alterações fisiológicas em tecidos distintos de um espécime (Martin, et al. 2019).

Em analogia, a colonização das raízes de leguminosas por bactérias promotoras de crescimento em plantas (BPCP), especialmente às bactérias fixadoras nitrogênio (BFN), tais como do gênero *Azospirillum*, acabam por modular uma série de alterações fisiológicas no hospedeiro, que vão muito além da simples fixação e disponibilização do nitrogênio atmosférico. Embora se enfatize esse benefício, as BFNs também promovem a síntese de fitormônios, em particular ácido indol-3-acético.

Além desse fito hormônio, outras moléculas sinalizadoras são produzidas, das quais pode-se ressaltar o ácido jasmônico, o etileno, o ácido salicílico, que aumentam a tolerância a estresses bióticos e abióticos (Fukami, et al. 2018). Razão pela qual estas bactérias, que no passado eram classificados e designadas como BFN, atualmente são designadas por BPCP.

Como exemplo, existe evidências entre a colonização da rizosfera e o período de floração das plantas, sendo que quanto maior a diversidade e a abundância de espécies microbianas, maior a estabilidade desse estágio vegetativo. Em estudos envolvendo o transplante de microrganismos da rizosfera, entre espécies de plantas filogeneticamente relacionadas, como a *Arabidopsis thaliana* (*Erva-estrelada*) e *Brassica rapa* (Nabo), foram reportados a alteração no tempo de floração da planta receptora, que foram semelhantes ao observado na planta doadora (Panke-Buisse, Poole, Goodrich, Ley, & Kao-Kniffin, 2015).

Sendo assim, a manipulação do microbioma de plantas poderá levar ao desenvolvimento de tecnologias e práticas agrícolas como: controle de doenças (Andrews, 1992, Bloemberg & Lugtenberg, 2001), aumento da produção agrícola (De

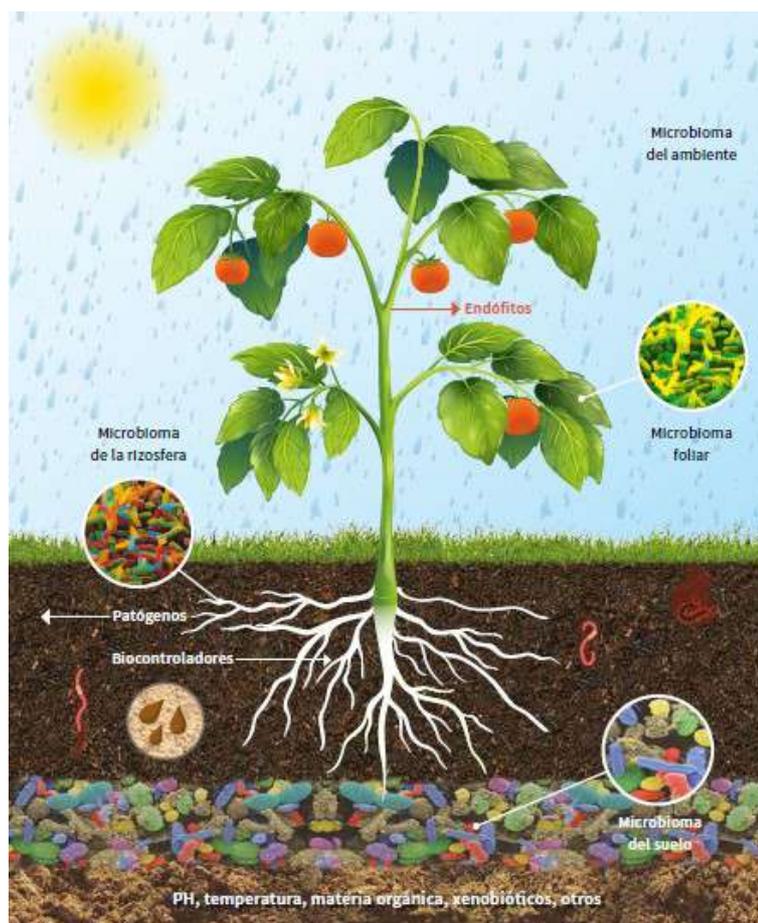
Bakker et al., 2012), diminuição do uso de insumos químicos (Adesemoye et al., 2008) e redução de emissões de gases de efeito estufa (Singh et al., 2010).

4.1.3 Fitobioma

Fitobioma é denominado como o sistema formado por uma planta, seu ambiente, seu micro e seu macrorganismos associados. Esses organismos - que eles podem estar dentro, na superfície ou adjacentes plantas - incluem uma grande diversidade de microrganismos (vírus, bactérias, fungos, oomicetos e algas marinhas), animais (artrópodes, vermes, nematoides e roedores) e outras plantas (Baltrus, 2017).

Na figura 1, demonstra-se a interação do fitobioma com os fatores físico-químicos em seu entorno.

Figura 1 - Interações do Fitobioma



Fonte: Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. (Volumen 1, 2018).

4.1.4 Bioengenharia de fitomicrobioma

Propomos a definição de bioengenharia de fitomicrobioma (BF), como o conjunto de técnicas que possibilitem a alteração dirigida na colonização natural de plantas, visando potencializar o crescimento e a capacidade produtiva do alvo. Ou ainda, a modificação *in vitro* dos mecanismos de sinalização/reconhecimento de uma planta hospedeira, para o mesmo fim.

A BF pode ser alcançada pela modificação dirigida da estrutura de comunidades microbianas associadas às plantas, por meio da inoculação de espécimes ou consórcios (naturais ou geneticamente modificados), seja na rizosfera ou na filosfera (Epstein, 2019).

A manipulação do fitomicrobioma é uma ferramenta biotecnológica com potencial para modular mecanismos de defesa da planta a estresses bióticos e abióticos, e conseqüentemente, servirá para garantir a produção de alimentos a longo prazo, e ainda minimizar os danos ambientais de uma agricultura cada vez mais intensiva (Epstein, 2019).

Assim, é provável que estejamos diante do que poderá ser futuramente conhecido como “revolução microverde” (Fukami, et al. 2018), em referência a revolução verde, que foi um marco para agricultura no passado.

Apesar de utilizarmos amplamente os inoculantes microbianos na agricultura, já a bastante tempo, esses são bastante limitados no que diz respeito ao propósito fisiológico na planta.

Por este motivo, os objetivos agora são muito mais abrangentes pois buscam a modulação de mecanismos de tolerância a estresses bióticos e abióticos, que se estendem desde a absorção de nutrientes, defesa de patógenos à tolerância a eventos meteorológicos.

Vislumbra-se que a bioengenharia de fitomicrobioma possa explorar a capacidade microbiana de produzir e/ou induzir síntese de fitormônios e outros compostos bioativos que incluem auxinas (Spaepen e Vanderleyden 2015 em (Fukami, et al. 2018), citocininas (Tien e tal. 1979), giberilinas (Bottini et al. 1989), ácido abscísico (Cohen et al. 2008), etileno (Strzelczyk et al. 1994), ácido salicílico (Sahoo et al. 2004), entre outros.

Assim, empregando a BF objetiva-se que, fitomicrobiomas em desequilíbrio (por exemplo, a presença de patógenos) seja reequilibrada, e o ecossistema restaurado para o estado balanceado ou até mesmo melhorado, levando a fenótipos aprimorados.

Entre os desafios para o sucesso da BF está o cultivo da imensa maioria dos microrganismos que constituem o microbioma de uma dada espécie de planta. Considerando que, embora o fitomicrobioma represente um enorme reservatório de diversidade funcional, a cultura de células microbianas *in vitro* é extremamente limitado pelos métodos convencionais, que se reflete em subestimação celular em condições de laboratório. Todavia, atualmente isso pode ser contornado empregando-se a abordagem de cultivo microbiano de alto rendimento, conhecida como culturômica.

Abordagem proposta por Lagier et al. (2012) e, (Bakken et al. 2011), a culturômica, foi capaz de identificar 32.500 colônias distintas recuperadas de fezes humanas. A culturômica representa uma abordagem completamente nova para o estudo de ecossistemas microbianos complexos, que se desenvolveu a partir de pesquisas do microbioma humano. Dentre as vantagens da abordagem pode-se destacar: a capacidade de detectar populações minoritárias; não se restringe a específicos domínios da vida; e permite ampla caracterização de novas espécies e suas interações no microbioma.

Em síntese, muitos desafios estão postos à BF, no entanto, vários destes já possuem solução advinda de outras áreas do conhecimento, basta a adequação para que o emprego em pesquisas focadas em fitomicrobioma seja exitoso.

4.1.5 Pepino (*Cucumis sativum*)

O pepino (*Cucumis sativum*) é uma planta pertencente à família Cucurbitácea. Originária da Índia, possui histórico de cultivo desde a antiguidade que abrange os continentes Asiático, Africano e Europeu, e, em consequência das grandes navegações chegou à América.

A nível mundial, a China é responsável por cerca de 60% da produção mundial (24,3 mil toneladas), seguida pela Turquia, Irã, Rússia e os Estados Unidos, respetivamente (Burton, 2017). Calcula-se que a cada 10 pepinos colhidos no planeta, 7,5 sejam chineses, em razão do forte incentivo ao consumo, e, do valor acessível do produto no país (Carvalho et al., 2013).

No Brasil, trazidos da Europa pelos colonizadores portugueses, os pepinos se adaptaram muito bem ao clima brasileiro, havendo, hoje, diversas variedades cultivadas, com produção anual superior a 200 mil toneladas (Carvalho et al., 2013).

O estado de São Paulo se sobressai como o principal produtor da hortaliça, ficando Santa Catarina em segundo lugar, com excelente produção de pepinos para conservas. Em relação a produção por região, o Sudeste é responsável por mais de 50% do total da produção brasileira (Carvalho et al., 2013).

Decorrente da ascensão no consumo deste alimento pela população, a produção do pepino, passou a ser uma segunda fonte de renda para muitos produtores rurais, de base familiar, visto que seu ciclo vegetativo é rápido e não demanda de grandes áreas para a produção.

Com área cultivada próxima de dois mil hectares, 3.800 pepino-cultores familiares, catarinenses, se envolvem anualmente com a atividade motivados pelo rápido retorno do investimento inicial, alcançando excelente produtividade (Rebelo et al., 2011), em curto espaço de tempo, pois as variedades de pepino apresentam ciclos rápidos de 90 a 110 dias.

No que tange a sua importância a nível do Estado do Paraná, temos a sua produção como uma segunda fonte de renda para a agricultura familiar. Sendo assim, seus dados ainda são relativos e dependem da informação das indústrias de processamento e associações rurais regionais.

O cultivo dessa olerícola é majoritariamente realizado pelo uso de cultivares híbridas, e com semeadura realizada no início da primavera, estendendo-se até o fim do verão. Sob essas condições, lavouras cultivadas em campo aberto, a produtividade pode alcançar até 80 toneladas por hectare (Martins, 2004; Rebelo; Schanllenberger; Cantú, 2011).

No entanto, quando cultivado em ambiente protegido, com cobertura plástica, a produtividade pode aumentar significativamente. Embora faltem informações quanto ao ganho de produtividade de variedades de pepinos para conserva, estudos realizados com híbridos comerciais de pepino para salada, tipo caipira e japonês, relatam aumento de até 79,6% na produtividade quando em ambiente protegido, em relação ao de campo aberto (Oliveira; Araujo; Leal, 1995; Cardoso & Silva, 2003).

Estudos relatam a necessidade de melhorar os sistemas de produção, no que diz respeito à nutrição mineral da planta. Há necessidade do uso de fertilizantes inorgânicos, pois quando o cultivo é realizado em solos com baixa fertilidade natural, as plantas apresentam, além do decréscimo na produtividade, frutos amargos e deformados, que são rejeitados pelos consumidores no mercado (Eifediyi e Remison, 2010; Nwofia et al., 2015).

No presente estudo, o interesse na cultura em questão se deu em virtude da falta de pesquisas locais, e, também, considerando que estudos sobre o sistema de cultivo em ambiente protegido, são inexistentes para esta região. No entanto, há enorme interesse no sudoeste do estado do Paraná, na implantação de sistemas de produção em larga escala. Sobretudo em ambiente protegido, em projetos de integração entre produtores e cooperativas responsáveis pelo envase e venda do fruto para redes de mercados e atacados, que já são uma realidade regional.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LOCALIZAÇÃO E DESCRIÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL

O estudo foi desenvolvido em duas etapas, sendo a primeira denominada de Experimento *in vitro*, realizado no Laboratório de Microbiologia no Câmpus Francisco Beltrão da UTFPR, e a segunda etapa, denominada Experimento *in loco*, conduzida em um túnel plástico em arco, no Viveiro Baldissarelli, localizado município de Marmeleiro – Paraná, objeto de parceria com a empresa. A escolha do local se deu em virtude de o proprietário do viveiro ser produtor de mudas olerícolas, e referência na região Sudoeste do Paraná. Dispondo de pessoal com conhecimento técnico e estrutura adequada para o cultivo das plantas em questão.

O experimento *in vitro*, consistiu de todos os testes preliminares relativos aos ensaios microbiológicos (cultivo, isolamento, caracterização morfológica e construção do consórcio de microrganismos) e o teste de emergência das plântulas de pepino em bandeja.

O experimento *in loco*, consistiu do cultivo protegido (túnel plástico) do pepino, transplantadas em vasos, este foi conduzido durante 52 dias, entre 20 de fevereiro e 11 de abril de 2020.

5.1.1 Caracterização do Cultivo *in loco*

O município de Marmeleiro, distante aproximadamente de 479 km de Curitiba, capital do Estado, está localizado na Região Sudoeste do Paraná, na latitude 26° 10' 36" e longitude 53°16" 09", a altitude do município varia entre 550 metros até 950 metros.

Figura 2 - Local de instalação dos ensaios.

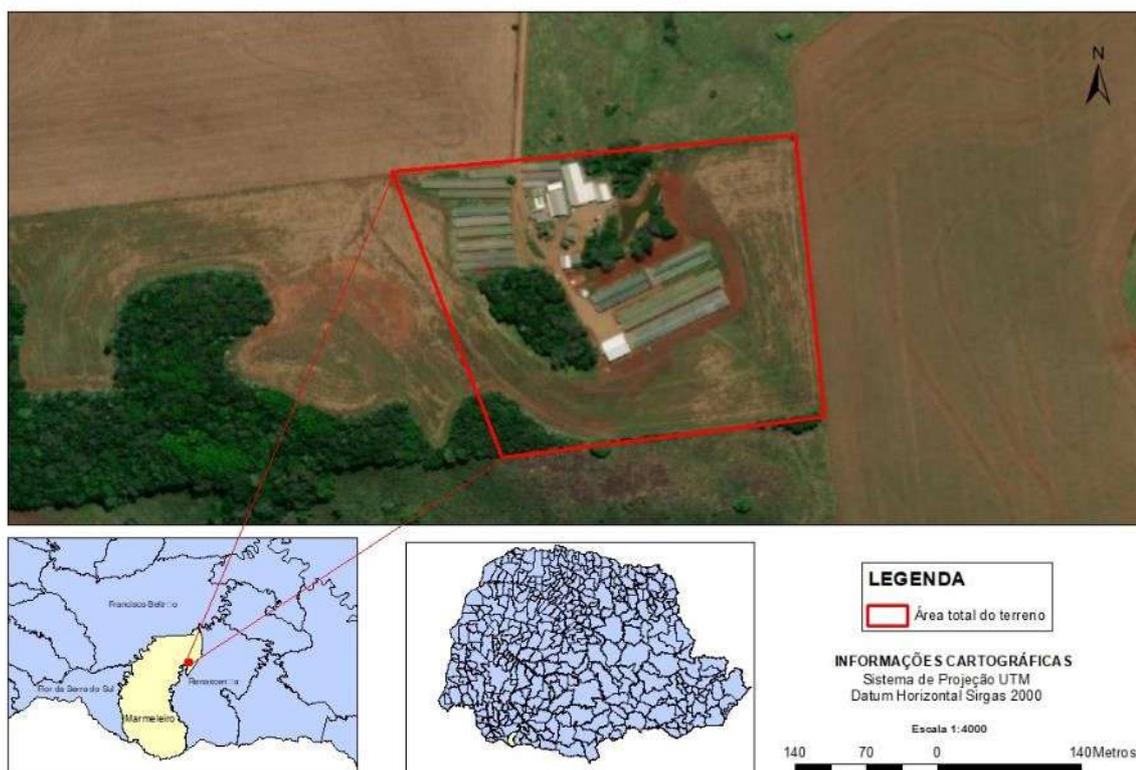


Fonte: Autoria própria (2020).

Como mencionado anteriormente toda a execução *in loco* do projeto ocorreu na propriedade onde está localizado o Viveiro Baldissarelli, um dos maiores viveiros de olerícolas do estado, e o maior da região Sudoeste do Paraná, estando o mesmo situado no interior do município de Marmeleiro. De propriedade do Sr. Moacir Baldissarelli, este estabelecimento comercial vende mudas de hortaliças para agropecuárias e atende mais de 200 municípios no Centro, Oeste e Sudoeste do Paraná e Oeste de Santa Catarina, e possui em seu catálogo mais de 80 espécies vegetais cultivadas.

Na figura 2 (A) pode-se visualizar, ao fundo, o sistema de irrigação por microaspersão, e na 2 (B) o sistema de microirrigação em vasos, ambos automatizados e utilizados no experimento.

Figura 3 - Foto área e geolocalização do Viveiro Baldissarelli.



Fonte: Abreu (2006) e adaptado de Wikimapia (2020).

A escolha da espécie para o projeto, foi em virtude da demanda local e da parceria firmada entre Autor do projeto e produtor de hortifruti da região de marmeleiro – sudoeste do paraná, que apresentou como dificuldade o padrão do fruto, a produ o e rendimento da qualidade da espécie, mesmo que esta seja de período curto.

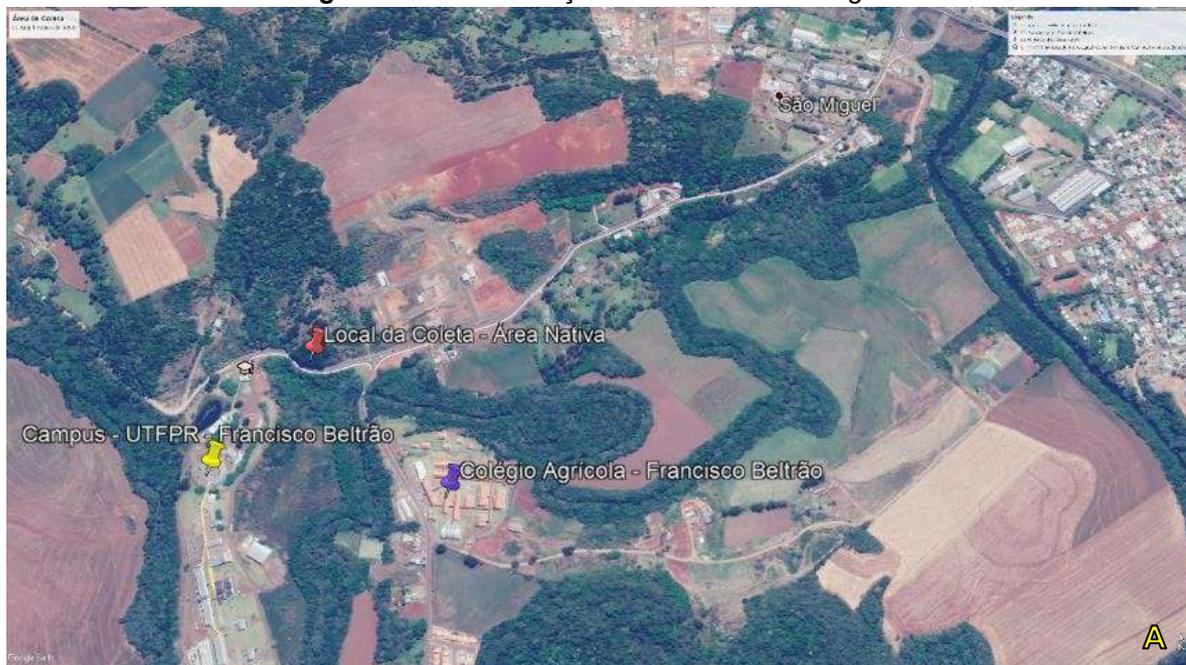
Outro fator citado pelo próprio produtor foi a possibilidade de novas formas de cultivo da espécie, saindo da forma tradicional, que é diretamente no solo, para plantio em vasos, o que torna a produção mais controlada de agentes e intempéries.

Para o projeto foi utilizado sementes de Pepino HB Kybria F1, que hoje, é o pepino mais utilizado em produção em larga escala, e, por apresentar elevada frutificação na sua haste principal, excelente crocância (excelente para produção de pickles), manter a coloração pós processamento e alta produtividade.

5.2 ISOLAMENTO DE MICROORGANISMOS

Para o isolamento dos microrganismos, amostras de solo, foram coletadas dentro de uma área de preservação permanente (APP), próximo ao Câmpus da UTFPR de Francisco Beltrão (A). A área amostrada apresentava um bosque de floresta nativa (C) com exemplares de grande porte de *Araucária - Araucaria angustifolia* e remanescentes de outras espécies arbóreas nativas (B). A cobertura do solo era constituída basicamente por gramíneas (D), e apresentava grande quantidade de resíduos orgânicos em decomposição, constituindo um horizonte O.

Figura 4 - Geolocalização do local de amostragem do solo.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 5 - Local da amostragem do solo utilizado para o isolamento de microrganismos.



Fonte: Autoria própria (2020).

Neste local foram coletadas amostras de solo de aproximadamente 50 gramas, utilizando uma colher de pedreiro, previamente higienizada com álcool 70%. As amostras foram tomadas na profundidade de 0 a 10 cm, após a limpeza da superfície vegetada. As amostras foram acondicionadas em frascos tipo Falcon de 50 mL, e os frascos mantidos sob temperatura ambiente em caixas de poliestireno (isopor). No laboratório, as amostras foram peneiradas para retirada do material orgânico particulado e posteriormente homogeneizadas. Na sequência, 10 g de solo homogeneizado foram diluídas em 90 mL de solução salina (0,8% de NaCl), em tubos plásticos, e agitado em vortex por 1 min. Todo material utilizado foi previamente esterilizado por autoclavagem. Após a agitação foi coletado 1 mL do sobrenadante, que foi utilizado como inóculo, usando a técnica *spread plate*, em placas de Petri contendo meio ágar nutriente (extrato de carne 1 g.L⁻¹; extrato de levedura 2 g.L⁻¹; peptona 5 g.L⁻¹; cloreto de sódio 5 g.L⁻¹; ágar 15 g.L⁻¹; pH final 6,8). As placas inoculadas foram incubadas à 35 °C por 48 horas. Após o período de incubação as colônias morfolologicamente distintas foram repicadas por estriamento em placas contendo ágar nutriente, e incubadas sob as mesmas condições descritas anteriormente. As placas estriadas, que ainda assim, apresentaram colônias distintas após o esgotamento, demonstrando que a cultura não estava pura, foram repicadas por estriamento até a obtenção de culturas visivelmente puras. As culturas puras isoladas foram utilizadas para compor o consórcio microbiano. Cada isolado foi utilizado na mesma proporção, em número de células viáveis, no consórcio microbiano de trabalho.

5.3 TESTE DE EMERGÊNCIA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PATOGENICIDADE DO CONSÓRCIO MICROBIANO

O teste de emergência de plântulas foi realizado em bandejas plásticas, de 200 células, contendo areia de textura média como substrato. O mesmo foi realizado para avaliar a taxa de germinação das sementes de pepino e, além disso, testar se a aplicação do consórcio microbiano poderia promover o desenvolvimento de doenças nas plântulas. Vidrarias: Vidro Erlenmeyer de 500 ml, 2 Béquer, Pipeta Manual, Espátula.

Para o cultivo foram adicionadas duas sementes de pepino em cada célula de uma bandeja estéril, totalizando 400 sementes da variedade Kybria F1. A semeadura foi realizada na câmara de fluxo laminar, utilizando para a semeadura uma pinça estéril (figura 6).

Figura 6 - Semeadura para efetuar o Teste de Germinação



Fonte: Autoria própria (2020).

O ensaio do teste de emergência foi conduzido em dividido em três tratamentos, sementes imersas em meio estéril, sementes imersas em meio com o consórcio microbiano, e sementes imersas em água destilada estéril. Como primeiro passo as sementes foram divididas em três quantidades iguais (figura 6 A), separadas e colocadas em béquer de 500 mL contendo 200 mL de água destilada por uma hora. Esse procedimento serviu para lavar e uniformizar a umidade das sementes. Na sequência foi retirado o excesso de umidade das sementes utilizando papel toalha, e em seguida as sementes foram imersas em soluções correspondentes aos tratamentos (meio estéril, meio inoculado, e água destilada estéril). Para isso, as mesmas foram deixadas imersas em béquer de 500 mL contendo 200 mL meio ou água destilada, conforme descrito anteriormente (figura 6 B).

As bandejas semeadas foram acondicionadas sobre uma mesa (figura 7 D) no laboratório de Frutas e hortaliças da UTFPR, sob temperatura ambiente e iluminação natural. Ao longo do período do cultivo, foi realizada a manutenção da umidade das mesmas, borrifando água destilada sobre as bandejas (figura 7 A).

Figura 7 – Condições de cultivo para o teste de emergência



Fonte: Autoria própria (2020).

Após o crescimento das plântulas, que correspondeu a 30 dias, foram selecionados aleatoriamente 10 exemplares de cada tratamento, e então foi realizada o mensuramento biométrico das plântulas (figura 8 C), e também o exame visual da sanidade das plântulas (figura 8 B).

Figura 8 - Controle de crescimento das mudas e verificação de desenvolvimento



Fonte: Autoria própria (2020).

5.4 ENSAIO A CAMPO

O ensaio a campo foi realizado em ambiente protegido, sendo que o transplante das plântulas foi realizado de bandejas para vasos com capacidade de 10 litros. O solo dos vasos foi previamente coletado de uma área sem histórico recente de uso agrícola e de fertilização mineral. Antes do solo ser acondicionado nos vasos, uma fração deste, correspondente a 10 vasos foi esterilizado por autoclavagem no laboratório de Microbiologia da UTFPR. Uma vez o volume total de solo necessário tenha sido esterilizado, o mesmo foi acondicionado em vasos plásticos, com capacidade de 10 litros, perfazendo um total de 50 vasos.

O arranjo experimental utilizado foi o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), visto que as condições locais eram homogêneas, por se tratar de um ambiente protegido. Neste sentido, o arranjo foi composto por 5 tratamentos e 10 repetições, como descrito na tabela 3.

Quadro 3 - Distribuição dos tratamentos e repetições no arranjo experimental.

Repetições	Tratamentos*				
	A	B	C	D	E
1	A1	B1	C1	D1	E1
2	A2	B2	C2	D2	E2
3	A3	B3	C3	D3	E3
4	A4	B4	C4	D4	E4
5	A5	B5	C5	D5	E5
6	A6	B6	C6	D6	E6
7	A7	B7	C7	D7	E7
8	A8	B8	C8	D8	E8
9	A9	B9	C9	D9	E9
10	A10	B10	C10	D10	E10

***Legenda tratamentos:** A= solo estéril; B= solo não estéril; C= solo não estéril+inoculação rizosfera; D= solo não estéril+inoculação rizosfera e parte aérea; E= solo não estéril+inoculação parte aérea.

Fonte: Autoria própria (2020).

Na sequência, os vasos foram distribuídos sob o túnel plástico de forma aleatória, obedecendo um espaçamento de 30 cm entre vasos (figura 9, B), para facilitar o manejo (aplicação do tratamento parte aérea) e favorecer a iluminação. Vale ressaltar que todos os tratamentos foram borrifados com a solução de inoculação da parte aérea. Porém, no caso dos tratamentos que não havia necessidade de inoculação da parte aérea, a solução estava estéril.

Esse procedimento foi adotado no intuito de minimizar um possível efeito químico exclusivo da solução de inoculação.

Figura 9 – Disposição dos vasos no túnel plástico.



Fonte: Autoria própria (2020).

Em apêndice encontra-se tabela 16, com sequencial das plantas, sendo os tratamentos posicionados de forma aleatória.

5.4.1 INOCULAÇÃO DAS PLANTAS

Primeiramente, as plantas foram selecionadas e separadas de acordo tamanho e sanidade, considerando a homogeneidade do material a ser utilizado no experimento (figura 9, A e B). Após a seleção visual das plantas, as mesmas foram separadas para compor os tratamentos. Para inoculação na rizosfera, o sistema radicular de cada planta foi imerso em 30 mL de solução de peptona 0,5% em água destilada, contendo uma carga microbiana de 10^7 UFC.mL⁻¹. Todas as plantas ficaram imersas na solução de inoculação por 1 minuto, e após esse procedimento, foi realizado o plantio nos vasos. As plantas que não foram inoculadas na rizosfera, passaram pelo mesmo procedimento de imersão em solução de inoculação estéril.

Após o plantio de todos os vasos, foi realizada a inoculação da parte aérea. Para tal, foi realizado a aspersão do inóculo utilizando a solução de inoculação, mencionado anteriormente, adicionada em um borrifador. Assim, cada planta recebeu 5 borrifadas da solução de inoculação. As plantas que não foram inoculadas na parte aérea, passaram pelo mesmo procedimento de aspersão de solução de inoculação estéril.

Após 20 dias de experimento, todas as plantas passaram novamente pelo processo de reinoculação (figura 10, A e B), exatamente como no tempo zero, com a exceção que a inoculação da rizosfera aconteceu pela adição da solução de inóculo no solo adjacente a planta utilizando um pipetador. Para isso, foram dispensados 10 mL de solução de inóculo no solo (figura 10, A).

Figura 10 – Separação e seleção de plântulas de pepino e aplicação do inóculo.



Fonte: Autoria própria (2020).

5.4.2 MENSURAMENTO FITOBIOMÉTRICO DAS PLANTAS

Imediatamente após o término do plantio, todas as plantas tiveram as medidas biométricas anotadas. Estas medidas foram computadas como as medidas biométricas no tempo zero (t_0) de experimento. Para as medidas de altura foi utilizado uma régua, e para as medidas do diâmetro do caule foi utilizado um paquímetro (figura 16 A). Este procedimento de medida foi repetido ao longo do tempo de cultivo nas tabelas 17,18,19, 20 e 21 em apêndice, visando registrar o crescimento das plantas em função dos tratamentos.

Figura 11 – Re-inoculações das plantas na parte aérea e raiz.



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 12 – Medição de plantas



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 13 - Desenvolvimento das plantas e ataque de pulgões



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 14 - Plantas em desenvolvimento e planta do ensaio A perecendo



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 15 - Planta perecida, planta apresentando frutos e folhas amareladas e plantas com frutos



Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 16 - Plantas perecendo, coleta de massa seca e frutos



Fonte: Autoria própria (2020).

5.5 QUANTIFICAÇÃO DA MASSA SECA E FRUTOS

A finalização do experimento a campo ocorreu após 51 dias de ensaio.

A decisão do encerramento do experimento se deu quando a maior parte das plantas apresentaram características de senescência fisiológica. Neste momento, cada planta foi retirada dos vasos, tomando o cuidado para não haver perda de tecido vegetal. A raiz de cada planta foi limpa manualmente com auxílio de uma espátula, de tal forma a retirar o solo aderido. Imediatamente após o procedimento anterior, a biomassa plantas e dos frutos foram separados, e tiveram seu peso fresco anotado (figura 17, A e B). Após a anotação da biomassa, cada exemplar foi acondicionado em sacos de papel pardo, e levados para o laboratório de microbiologia da UTFPR-FB. No laboratório este material foi levado a estufa de ventilação forçada à 70 °C, onde permaneceu até peso constante. Na sequência, todas as plantas tiveram a massa seca pesada em balança analítica (figura 17 B).

Figura 17 - Quantificação da matéria seca (A) e frutos (B)



Fonte: Autoria própria (2020).

5.6 ANÁLISE DE SOLO

Ao final do experimento a campo, quando as plantas foram retiradas dos vasos, foi realizada uma coleta de solo de todos os vasos. Para esta coleta, o solo retirado dos vasos utilizando uma colher de pedreiro, e acondicionado em sacos plásticos, os quais foram levados para o laboratório de solos da UTFPR-FB.

Neste laboratório, as amostras de vasos de um mesmo tratamento foram misturadas e homogeneizadas. Após, foi tomada uma subamostra de 100 gramas de

solo (figura 22, B) a qual foi acondicionada em saco plástico. Este procedimento foi repetido para todos os tratamentos.

Tais amostras foram enviadas ao laboratório de análises de solos da UTFPR câmpus Pato Branco, com a finalidade de determinação de macro e micronutrientes remanescentes em cada tratamento.

Figura 18 - Quantificação do Solo dos ensaios



Fonte: Autoria própria (2020).

O resultado das amostras de solo encontra-se na tabela 11 e 12 no decorrer do projeto em resultados e discussões.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 TESTE DE EMERGÊNCIA E POTENCIAL DE PATOGENICIDADE DO INÓCULO

O teste de emergência foi avaliado em 4 bandejas de 200 células, sendo que cada bandeja possuía 4 repetições de 50 células, com uma (1) semente por célula. O ensaio foi conduzido em um período de análise 5 dias, no intervalo entre os dias 13/01 e 17/01/2020.

Na tabela 1, são apresentados os resultados relativos à emergência das plântulas no tratamento controle. Nesta bandeja, a semeadura ocorreu sem a inoculação do consórcio microbiano e sem adição do meio de cultivo estéril. Assim, o controle apresentou a emergência de 182 plântulas de um total de 200 sementes, o que correspondeu a uma taxa média de emergência de 91%. Na tabela 2, são apresentados os resultados correspondentes ao tratamento com a inoculação das sementes com o consórcio microbiano, o qual apresentou a emergência de 191 sementes, correspondendo a uma taxa média de emergência de 94,5%. Na tabela 3, são apresentados os resultados correspondentes ao tratamento sem inoculação das sementes com o consórcio microbiano, mas com adição da solução de inoculação estéril (meio de cultura estéril), o qual apresentou a emergência de 196 sementes, correspondendo a uma taxa média de emergência de 98%.

Embora tenha sido observado uma variação no número de plântulas emergidas em cada bandeja, que correspondeu a 14 plântulas na maior discrepância, ainda assim, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos. Todavia, analisando em escala temporal, é possível verificar que no primeiro dia de avaliação, o tratamento controle foi o que apresentou o menor número total de plântulas emergidas (46 plântulas) e o maior desvio padrão (7,0), quando comparado aos demais tratamentos, e essa tendência permaneceu ao longo do experimento. Mesmo não sendo observado diferença matemática entre os tratamentos, esses resultados foram importantes do ponto de vista biológico. Pois, esses resultados serviram para descartar a hipótese do inóculo interferir de maneira negativa na emergência das plântulas. Desta forma é importante ressaltar que o principal objetivo do arranjo experimental, no ensaio de emergência, foi verificar se o consórcio microbiano poderia desencadear em um processo de patogenicidade das sementes, interferindo na emergência, que o inviabilizaria como inóculo, e conseqüentemente na

sequência dos ensaios a campo. O que foi descartado com base nos resultados deste ensaio.

Tabela 1 - Emergência de plântulas no tratamento controle.

DATA	13/01	14/01	15/01	16/01	17/01	
REPETIÇÃO	Número de plântulas					Média
EPC1	20	39	46	48	48	40,2
EPC2	14	29	41	46	46	35,2
EPC3	08	16	36	41	43	28,8
EPC4	04	14	36	41	45	28,0
Total de plântulas \pm (DP)	46\pm7,0	98\pm11,7	159\pm4,7	176\pm3,5	182\pm2,0	

EPC= emergência de plântulas, controle.

Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 2 - Emergência de plântulas no tratamento inoculado.

DATA	13/01	14/01	15/01	16/01	17/01	
MEDIDA	Número de plântulas					Média
EPI1	17	38	50	50	50	41,0
EPI2	24	46	48	48	48	42,8
EPI3	17	35	47	47	49	39,0
EPI4	18	25	39	44	44	34,0
TOTAL	76\pm3,3	144\pm8,6	184\pm4,8	189\pm2,5	191\pm2,6	

EPI= emergência de plântulas, inoculado.

Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 3 - Emergência de plântulas no tratamento solução de inoculação estéril.

DATA	13/01	14/01	15/01	16/01	17/01	
MEDIDA	Número de plântulas					Média
APSE1	21	27	33	46	49	35,2
APSE2	28	35	44	50	50	41,4
APSE3	30	35	45	49	49	41,6
APSE4	36	45	47	48	48	44,8
EPSE	115\pm6,1	142\pm7,3	169\pm6,2	193\pm1,7	196\pm0,8	

EPSE= emergência de plântulas, solução inoculação estéril.

Fonte: Autoria própria (2020).

Não menos importante, além da avaliação da emergência, por um período de 10 dias, a altura das plântulas emergidas foram mensuradas. Embora não

apresentando diferença significativa ($p>0,05$), o tratamento que recebeu o inóculo foi o que apresentou a maior média de altura de 13,96 mm com o menor desvio padrão médio de 1,76 mm (tabela 4).

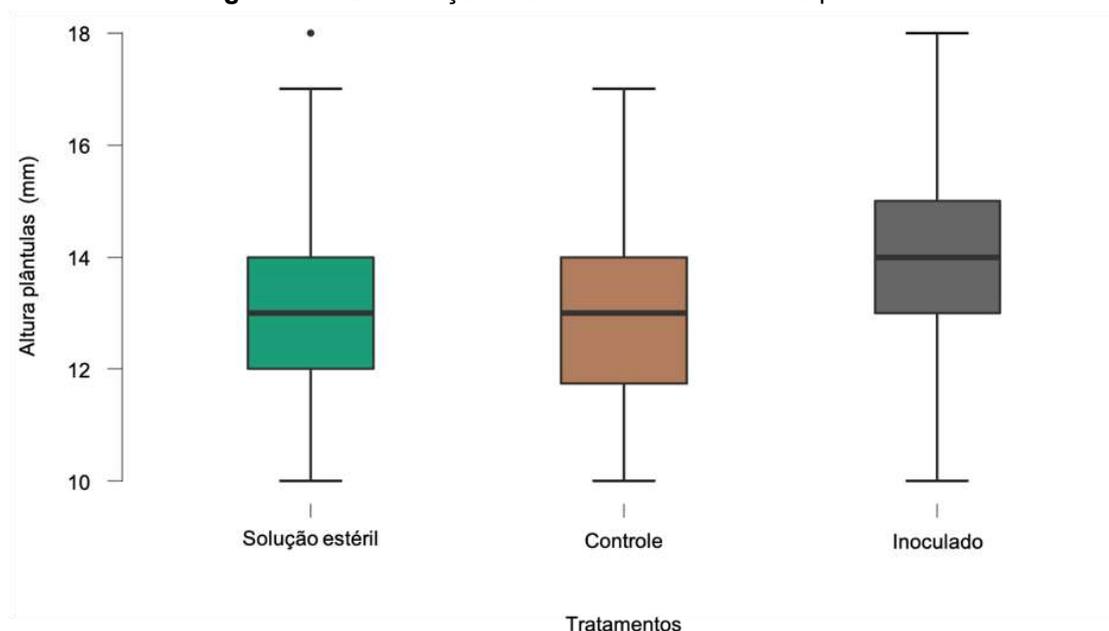
Este resultado, embora matematicamente sinalize que a diferença observada nas alturas não tenha diferença significativa, do ponto de vista biológico, existiu uma pequena diferença no crescimento das plantas, que correspondeu na média de 0.45 mm (tabela 4). Essa diferença corresponde à uma diferença de apenas 3,3%.

Tabela 4 - Altura das plântulas emergidas

Tratamentos	Altura das plântulas (mm)		
	Controle	Inoculado	Solução estéril
Válido	40	40	40
Perdido	0	0	0
Média	13.51	13.96	13.23
Desvio padrão	1.79	1.67	1.65
Mínimo	10.40	10.20	10.10
Máximo	17.10	18.00	18.00

Fonte: Autoria própria (2020).

Observando a figura 19, também é possível verificar que a distribuição das medidas das alturas das plântulas foi mais uniforme, ou seja, com menor variação nos tratamentos que receberam a solução de inoculação. Assim, é provável que o efeito observado tenha ocorrido em função de uma maior disponibilidade de nutrientes presente no meio de cultivo do consórcio microbiano. Não obstante, estes nutrientes teriam uma maior influência no crescimento a partir do momento em que as plântulas começassem a depender exclusivamente do metabolismo fotossintético, momento que corresponderia ao final das reservas de nutrientes da semente.

Figura 19 – Distribuição das medidas de altura das plântulas.

Fonte: Autoria própria (2020).

6.2 ANÁLISES FITOBIOMÉTRICAS

Este ensaio foi realizado para verificar o efeito da inoculação do consórcio microbiano na filosfera e na rizosfera, e também do efeito da inoculação combinada (rizosfera e filosfera na mesma planta).

Conforme a tabela 5, verifica-se que os tratamentos que apresentaram as maiores medidas de altura foram: solo estéril e inoculação combinada na filosfera e rizosfera, que apresentaram médias de 21,33 e 21,00 cm, respectivamente.

Tabela 5 - Altura das plantas de pepino (cm.planta⁻¹) no ensaio em ambiente protegido em total de dias.

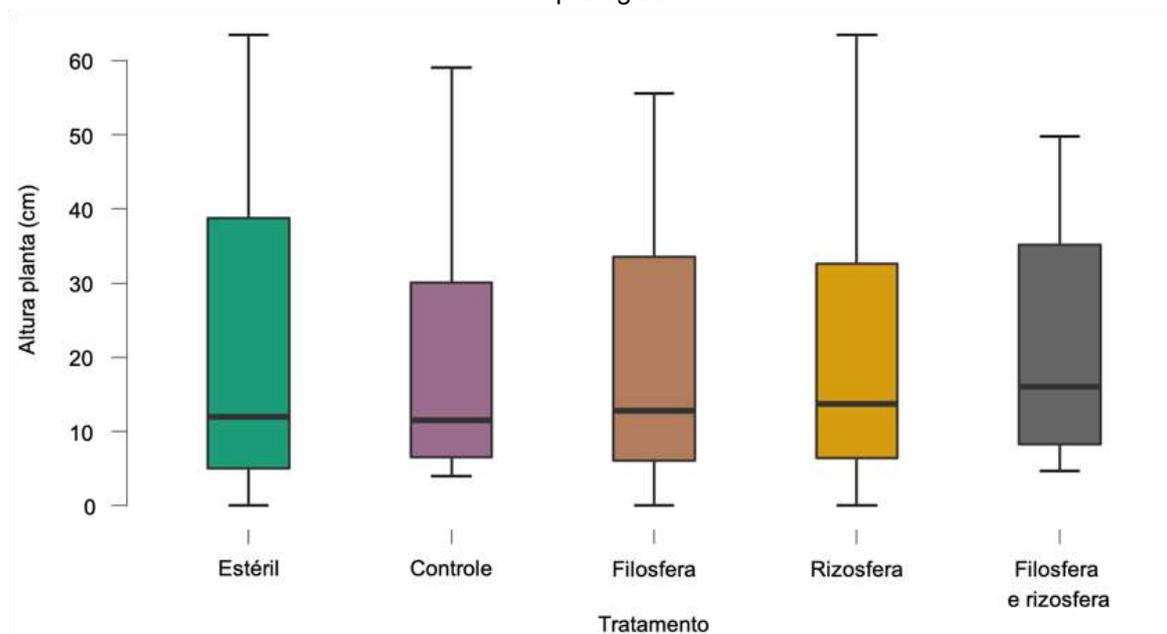
Tratamentos	Altura das plantas (cm)				
	Controle	Estéril	Filosfera	Rizosfera	Filosfera e rizosfera
Válido	80	80	80	80	80
Perdido	0	0	0	0	0
Média	18.999	21.335	19.463	20.294	21.006
Desvio padrão	14.680	19.457	15.729	16.119	14.576
Mínimo	4.000	0.000	0.000	0.000	4.700
Máximo	59.100	63.500	55.600	63.500	49.800

Fonte: Autoria própria (2020).

O tratamento que apresentou a menor média na altura foi o controle (figura 20). Com base nestes resultados verifica-se que não foi possível observar efeito

pronunciado da inoculação do consórcio microbiano, independentemente do alvo inoculado na planta.

Figura 20 - Distribuição das medidas da altura das plantas de pepino cultivadas em ambiente protegido.



Fonte: Autoria própria (2020).

Ainda assim, foi possível verificar que a menor variação na medida de altura das plantas ocorreu no tratamento de inoculação combinada, o qual apresentou um desvio padrão de 14,57 cm, ao passo que o solo estéril foi o que apresentou a maior variação na altura das plantas (19,45 cm).

Tabela 6 - Diâmetro das plantas de pepino ao longo do período de cultivo.

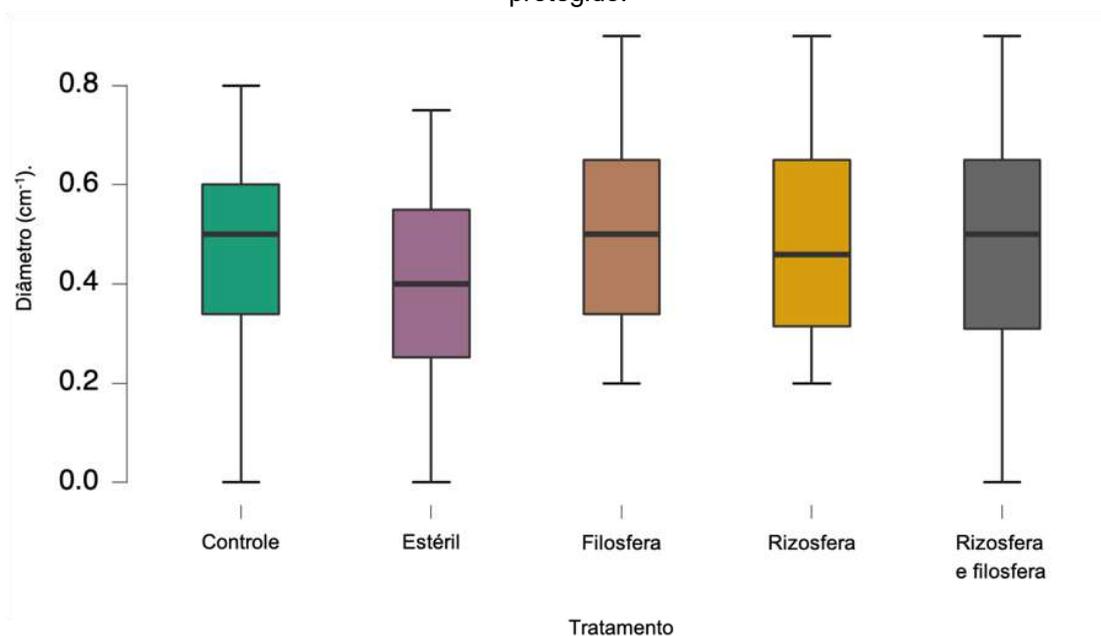
Tratamentos	Diâmetro das plantas (cm)				
	Controle	Estéril	Filosfera	Rizosfera	Rizosfera e filofosfera
Válido	70	70	69	70	69
Perdida	0	0	1	0	1
Média	0.468	0.407	0.501	0.492	0.493
Desvio padrão	0.174	0.186	0.188	0.190	0.197
Mínimo	0.000	0.000	0.200	0.200	0.000
Máximo	0.800	0.750	0.900	0.900	0.900

Fonte: Autoria própria (2020).

Estes resultados demonstram que o solo estéril apresentou uma maior desuniformidade no crescimento das plantas. Embora os resultados não tenham mostrado um efeito aditivo no crescimento das plantas, a partir da inoculação do

consórcio microbiano, é importante destacar que o mesmo não afetou negativamente o crescimento das mesmas. O que poderia ser uma consequência da presença das cepas exógenas no sistema radicular e filosfera das plantas inoculadas. É importante ressaltar que muitos microrganismos possuem um potencial patogênico em função da espécie vegetal. Sendo que muitas cepas se apresentam como patógenos oportunistas, dependendo do estado fisiológico da planta.

Figura 21 - Distribuição das medidas do diâmetro das plantas de pepino cultivadas em ambiente protegido.



Fonte: Autoria própria (2020).

Deste modo, ainda que não tenha se observado um efeito aditivo no crescimento das plantas, também não foi verificado efeito deletério da inoculação do consórcio microbiano, que poderia ter resultado desde deformidades morfológicas à morte das plantas.

Salienta-se que uma das questões chave para a inoculação de microrganismos no solo e/ou plantas é a carga microbiana a ser utilizada. Este é um fator de grande importância considerando que uma carga baixa pode significar fracasso, em função da competição com microrganismos autóctones do solo e/ou do microbioma da planta. Da mesma forma que uma carga elevada (10^{10} UFC/grama de solo e/ou cm^2 de tecido vegetal) pode favorecer à desbiose, e conseqüentemente o predomínio de espécies com potencial patogênico oportunista.

Na pesquisa em questão, os ensaios em ambiente protegido foram conduzidos foi utilizada uma carga microbiana pré-estabelecida de 10^7 UFC.mL⁻¹ de solução

inoculante. Avaliando o volume aspergido em cada borrifada, verificamos que o volume correspondia a 0,7 mL de solução inoculante. Como foi estabelecido, de forma empírica, que cada vaso receberia cinco borrifadas de solução direcionadas ao solo (rizosfera) e/ou parte aérea (filosfera), como alvo da inoculação, calcula-se que a carga microbiana inoculada por vaso variou de aproximadamente $3,5 \times 10^7$ UFC no solo, por vaso, à 7×10^7 UFC no solo mais filosfera, por vaso. Assim, é provável que a carga microbiana inoculada tenha sido insuficiente para manter a resiliência frente a competição com os microrganismos autóctones do solo e da planta.

Em estudo realizado por Pertille (2021), foi observado que a adição de cepas fúngicas combinadas com fertilizante nitrogenado, alterou a estrutura da comunidade de bactérias e arqueas, em dois solos distintos, sendo que carga microbiana utilizada foi de $1-3 \times 10^7$ UFC por grama de solo tratado. Conforme os autores, a alteração na microbiota ocorreu para ajustar a homeostase do solo às alterações provocadas pelo tratamento. Nesta pesquisa, foi reportada um aumento significativo dos filos *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, após inoculação das cepas fúngicas, que provavelmente tenha ocorrido em função das alterações físico-químicas no solo que favoreceram o crescimento destes grupos microbianos até então fisiologicamente desfavorecidos.

Esse talvez seja um dos pontos críticos para a utilização de microrganismos como bioinsumo a nível de campo. Fica evidente que a inoculação e re-inoculações devem ser realizadas com base no volume de solo ocupado pelas raízes, no caso da inoculação da rizosfera, e, parte aérea, para inoculação da filosfera. Outro ponto de fragilidade metodológica a ser considerado é a equitabilidade do consórcio microbiano, de tal forma que não haja codominância de espécies microbianas na solução de inoculação.

Ainda assim, recentemente, foi proposto o conceito de metafenoma, por Jansson and Hofmockel (2018), que talvez possa trazer luz a complexidade das interações metabólicas microbianas no solo. Até então a teoria utilizada para tentar explicar estas interações era baseada na teoria de redes ecológicas. No entanto, o conceito de redes microbianas em interação mostra-se extremamente difícil de testar em ecossistemas complexos, tais como o solo, pois envolvem teias metabólicas interconectadas entre as espécies e entre os reinos. E estas interações variam desde a cooperação metabólica até a competição pelo acesso a nutrientes limitantes (Van der Heijden and Hartmann, 2016).

Assim, provavelmente uma inoculação com baixa carga microbiana, como a realizada na pesquisa em questão, seja a principal causa da não observação das respostas positivas, nas plantas cultivadas a campo, daquelas obtidas inicialmente nos ensaios *in vitro* (dados não reportados).

Neste contexto, vislumbra-se que o melhor entendimento das interações metabólicas microbianas e sua importância na fisiologia das plantas, possa ser obtido a partir de estudos focados no metafenoma do solo.

Além das medidas de altura, foram conduzidas medidas do diâmetro das plantas de pepino ao longo do período de cultivo em ambiente protegido. Na tabela 6, é possível verificar que a maior diferença entre as médias das plantas de pepino ocorreu entre os tratamentos inoculação na rizosfera e solo estéril, resultando em 0,094 cm, sendo que essa diferença não foi estatisticamente significativa. Embora não observada diferença significativa entre os tratamentos, é possível verificar (Figura 21) que os tratamentos inoculados na filosfera e rizosfera apresentaram uma menor variação entre as medidas mínimas e máximas do diâmetro das plantas, o que do ponto de vista vegetativo representa uma maior uniformidade no crescimento das plantas.

Não obstante, quando avaliamos os resultados dos frutos de pepinos por planta, relativos aos seguintes parâmetros biométricos, peso, comprimento e diâmetro dos frutos (tabela 7), verifica-se que as maiores médias de peso dos frutos foram obtidos nos tratamentos em que houve inoculação na rizosfera (143,8 g) e rizosfera mais filosfera (136,6 g), respectivamente. Com base na análise da variância (ANOVA) destes tratamentos, verificou-se que os tratamentos que receberam inoculação na rizosfera (Tukey, $p=0,007$) e na rizosfera mais filosfera (Tukey, $p=0,017$) apresentaram peso dos frutos significativamente maior que o solo estéril. Contudo, não houve diferença significativa entre os demais tratamentos.

Sabe-se que diversos fatores podem interferir na qualidade dos frutos, e é difícil determinar isoladamente a contribuição de cada fator, visto que esses interagem de maneira complexa e são dependentes de características da cultivar e do estágio de desenvolvimento da planta. Contudo, em termos práticos, os principais fatores são classificados em ambientais e culturais. Onde os ambientais, são temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade, textura do solo, ventos, chuvas, entre outros. Já os fatores culturais estão relacionados à nutrição mineral, manejo do solo, aplicações de produtos químicos, irrigação e drenagem, entre outros.

O experimento foi conduzido de forma que as condições de cultivo fossem as mesmas para todos os tratamentos, visando neutralizar os efeitos ambientais e culturais. Todavia, do ponto de vista prático, sabe-se que o desenho experimental tem por objetivo amenizar os efeitos previsíveis, mas não elimina os fatores não previsíveis, que interferem de forma isolada ou interativa nos tratamentos. Afim de comparar o efeito da microbiota autóctone do solo com os tratamentos em que houve a inoculação do consórcio microbiano, foi necessário estabelecer um tratamento com solo estéril. Justo nesse tratamento foi verificado a menor média, dentre os parâmetros biométricos avaliados, em relação aos demais tratamentos.

Considerando que todos os tratamentos receberam a solução de inoculação, exceto pela presença ou ausência do consórcio microbiano (solução estéril), descarta-se que o comportamento observado tenha sido resultante da suplementação de nutrientes disponibilizados no solo através do meio de cultivo (solução de inoculação).

Analisando os resultados de massa seca das plantas cultivadas em ambiente protegido (figura 25), verifica-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos. Ainda assim, chama atenção o fato que a maior média de massa seca foi obtido no tratamento solo estéril (tabela 10). No entanto, quando se observada a distribuição das medidas de massa seca deste tratamento é possível verificar que foi o que a apresentou a maior variação nas medidas (figura 25), sendo que os únicos tratamentos que não apresentaram medidas fora da curva da normalidade (outliers), foram os solos controle e inoculado na rizosfera mais filosfera.

A mesma tendência de comportamento descrita para o parâmetro peso foi observada nas medidas de diâmetro e comprimento dos frutos de pepino. Assim, os tratamentos que receberam inoculação na rizosfera e rizosfera mais filosfera, foram os tratamentos que apresentaram as maiores médias, respectivamente, e que apresentaram diferenças significativas (Tukey, $p=0,05$) superiores ao solo estéril. Neste contexto, não se descarta que o processo de esterilização do solo, empregando autoclave, tenha causado alterações em atributos físicos e químicos do solo, que possam ter refletido no desenvolvimento das plantas no experimento.

De acordo com Lotrario et al. (1995), o tratamento térmico do solo usando autoclave provoca um colapsamento da microporosidade devido aos ciclos de compressão e descompressão. E, também, pode favorecer a agregação do solo a partir de minerais na fração argila. Com relação aos atributos químicos do solo, estudos reportaram (Ferriss, 1984; Tanaka et al., 2003) que o processo de

autoclavagem está correlacionado há um aumento na concentração de íons e matéria orgânica dissolvida na solução do solo.

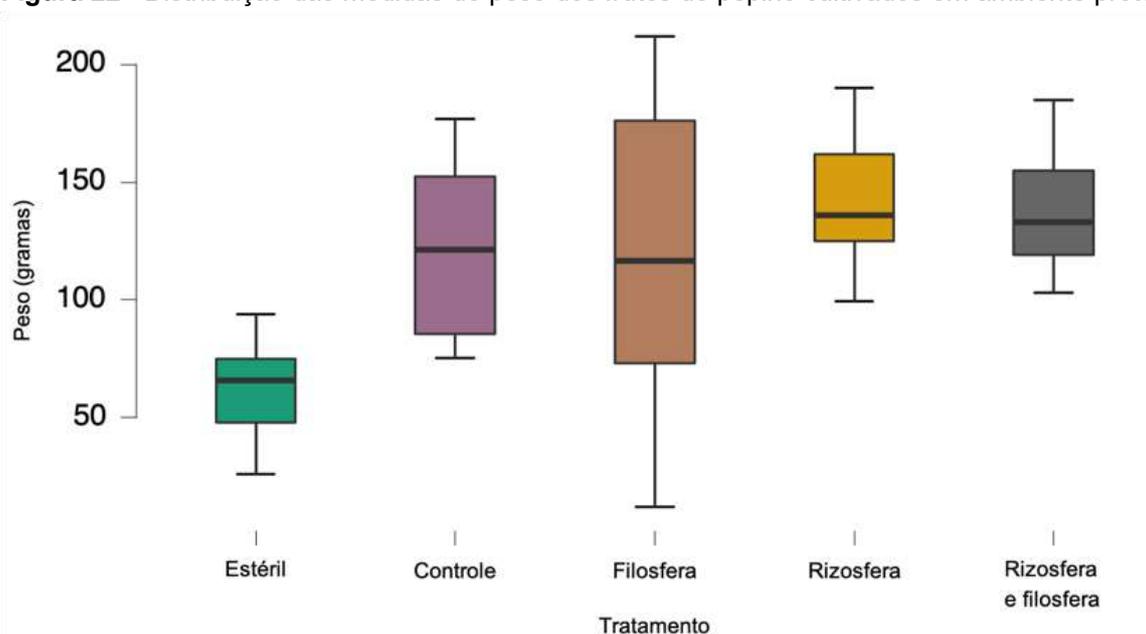
Tais evidências podem sustentar a razão pela qual o solo estéril não apresentou maior produção de biomassa durante o crescimento vegetativo da planta, mas apresentou o menor desenvolvimento dos frutos (estatisticamente significativas). Esse comportamento pode ter ocorrido em função da rápida disponibilidade de nutrientes na solução do solo, provocada pelo tratamento térmico. No entanto, a disponibilização dos nutrientes, em escala temporal, não foi suficiente para garantir a nutrição da planta até a produção dos frutos. Os resultados obtidos no solo estéril, que apesar de ter tido a maior média na produção de massa seca (tabela 10 e figura 25), apresentou os menores indicadores biométricos na produção de frutos (tabelas 7, 8 e 9 e figuras 22, 23 e 24).

Tabela 7 - Peso dos frutos de pepino cultivado em ambiente protegido.

Tratamentos	Peso dos frutos (gramas)				
	Estéril	Controle	Filosfera	Rizosfera	Rizosfera e filosfera
Válido	6	8	9	9	9
Perdido	4	2	1	1	1
Média	61.883	122.125	114.944	143.833	136.556
Desvio padrão	24.209	39.382	68.648	33.662	26.283
Mínimo	26.000	75.500	12.000	99.500	103.000
Máximo	94.000	177.000	212.000	190.000	185.000

Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 22 - Distribuição das medidas do peso dos frutos de pepino cultivados em ambiente protegido.



Fonte: Autoria própria (2020).

É importante ressaltar que, propositalmente, não foi realizada a correção do solo para o cultivo. Por esta razão, o nível de fertilidade do solo utilizado para o experimento estava muito aquém dos níveis de nutrientes para cultivo comercial de pepino. Porém, como um dos objetivos era verificar se o consórcio microbiano poderia compensar os níveis baixos de fertilidade, o desenho experimental não considerou a fertilização química dos tratamentos.

Com base no boletim técnico (Trani et al. 2015) do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), sobre adubação na cultura do pepino, somente os elementos cobre, ferro, manganês e zinco, estavam em quantidades superiores ao recomendado para uma produção média de 28,5 t ha⁻¹ desta hortícola.

Os teores de matéria orgânica, entre os tratamentos ao final do experimento, estavam em um intervalo de 30,8 a 38,8 g.dm⁻³ (tabela 11), que considerando a textura argiloso do solo, resulta no limite inferior ao desejado (31 a 60 g.dm⁻³). A matéria orgânica representa a maior fonte natural de nitrogênio e enxofre disponível para as plantas no solo, e desta forma um baixo teor de matéria orgânica implica em uma baixa disponibilidade destes elementos essenciais ao metabolismo fotossintético e de síntese de aminoácidos, respectivamente. O baixo nível de matéria orgânica no solo também implica, de maneira negativa, na capacidade de tamponamento do mesmo, ainda mais em um solo com elevada acidez como o utilizado no experimento (tabela 11). Os teores de fósforo e potássio estavam em níveis muito baixos, e, respectivamente, conforme recomendação agronômica para a cultura.

Resumidamente, embora tenha havido somente diferença estatística significativa entre o solo estéril e os solos inoculados na rizosfera e rizosfera mais filosfera, é possível verificar que todos os parâmetros biométricos avaliados do fruto (peso, diâmetro e comprimento), nos tratamentos que receberam o consórcio microbiano, apresentaram maiores médias nesses atributos e uma menor variação dos valores em relação a média (figuras 22, 23 e 24). É importante destacar que, embora estes tratamentos tenham apresentado os melhores resultados em termos de produção de frutos, quando verificado os teores de fósforo no solo, observa-se que os mesmos foram os que mantiveram os maiores teores de fósforo disponível no solo, de acordo com Rodrigues (2018) o uso de microrganismos como promotores de crescimento vegetal tem se apresentado como uma alternativa promissora, sobretudo para a ciclagem de nutrientes, especialmente o fósforo.

A análise de fósforo no solo verifica os teores de fósforo disponíveis para planta, e despreza o fósforo fortemente adsorvido na matriz do solo. Neste sentido, é notório que muitos microrganismos (bactérias e fungos) produzem metabólitos que liberam o fósforo retido na matriz do solo, principalmente em óxidos de ferro, e por este motivo são conhecidos como solubilizadores de fosfatos.

Como a disponibilidade do fósforo é o resultado de ações químicas e biológicas, fazer a ligação da atividade de fosfatase diretamente com os teores de fósforo e com as respectivas mudanças de disponibilidade de P é um grande desafio (Fraser et al., 2015). Logo, o efeito positivo da inoculação do consórcio microbiano na rizosfera possa ter sido responsável pela melhor eficiência na utilização do fósforo que nos demais tratamentos. (Dai et al, 2020) justifica que os microrganismos desempenham um papel crucial no ciclo do fósforo no solo e na regulação da disponibilidade deste, estes processos microbianos de transformação de fósforo são mediados principalmente por três grupos genéticos microbianos, ou seja, genes envolvidos na solubilização, P- solubilização inorgânica e mineralização orgânica, absorção e transporte, e regulação de resposta à fome.

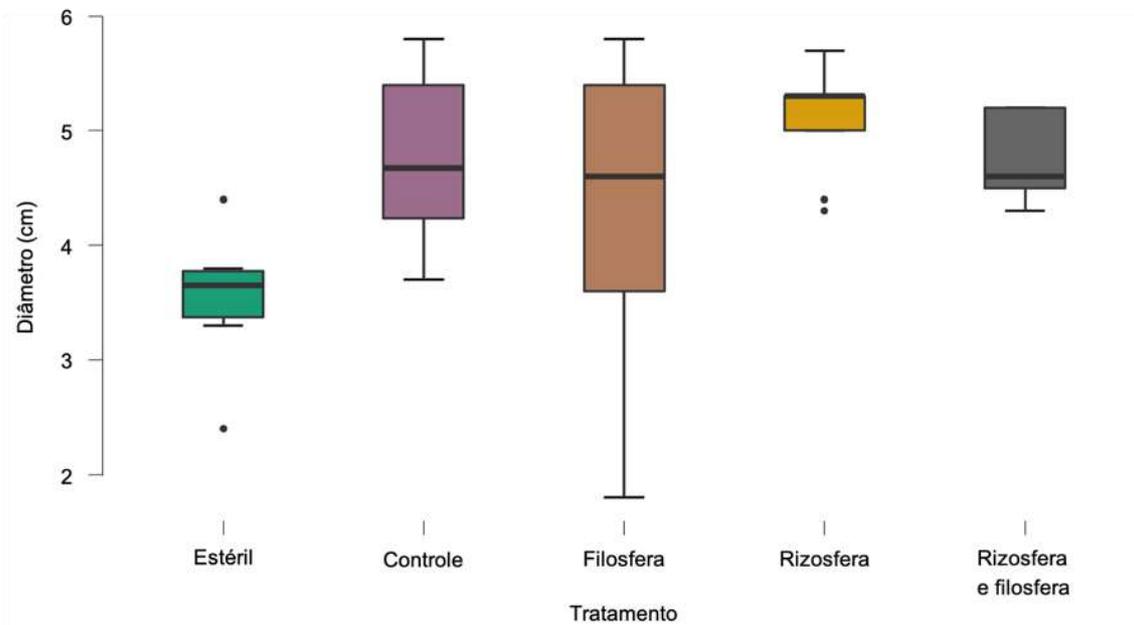
Em síntese, embora o conjunto dos resultados não tenham apontado com clareza os efeitos da inoculação do consórcio microbiano, o presente estudo trouxe luz para sequência da pesquisa, uma vez que não houve a promoção de doenças e ou qualquer anomalia visível às plantas inoculadas. Ademais, ficou evidente a necessidade do ajuste da carga e da equitabilidade na elaboração do consórcio microbiano.

Tabela 8 - Diâmetro dos frutos de pepino cultivado em ambiente protegido.

Tratamentos	Diâmetro dos frutos (cm)				
	Estéril	Controle	Filosfera	Rizosfera	Rizosfera e filosfera
Válido	6	8	9	9	9
Perdido	4	2	1	1	1
Média	3.533	4.763	4.283	5.122	4.733
Desvio padrão	0.662	0.719	1.415	0.484	0.364
Mínimo	2.400	3.700	1.800	4.300	4.300
Máximo	4.400	5.800	5.800	5.700	5.200

Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 23 - Distribuição das medidas do diâmetro dos frutos de pepino cultivados em ambiente protegido.

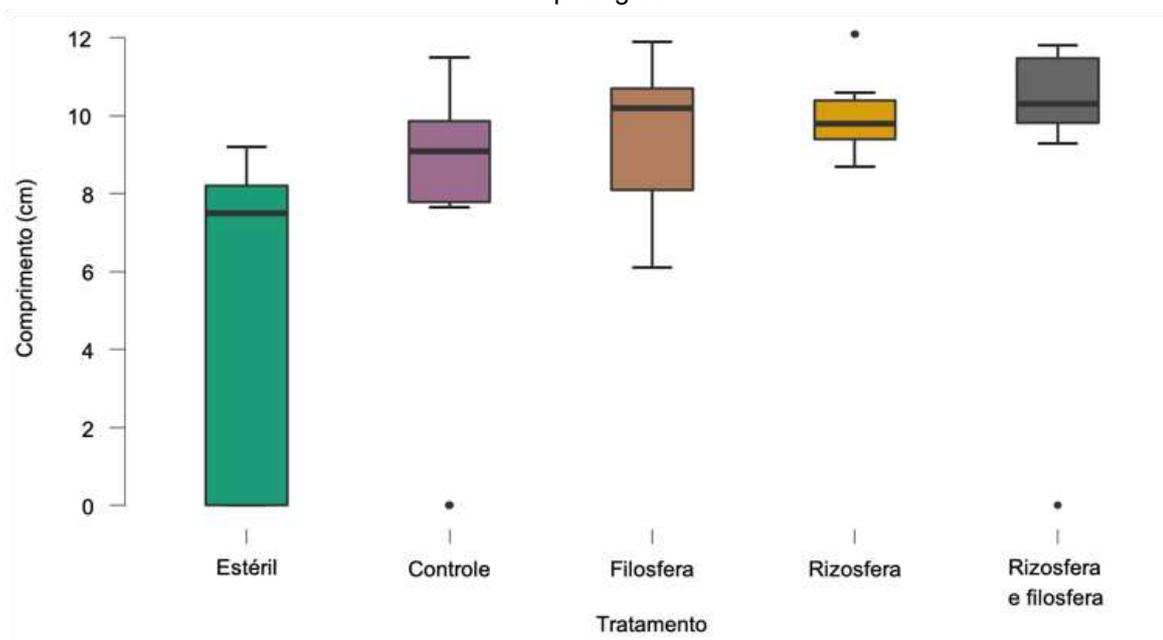


Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 9 - Comprimento dos frutos de pepino cultivado em ambiente protegido.

Tratamentos	Comprimento dos frutos (cm)				
	Estéril	Controle	Filosfera	Rizosfera	Rizosfera e filosfera
Válido	9	10	9	9	10
Perdido	1	0	1	1	0
Média	5.367	7.540	9.467	9.978	9.590
Desvio padrão	4.091	4.122	1.963	1.039	3.481
Mínimo	0.000	0.000	6.100	8.700	0.000
Máximo	9.200	11.500	11.900	12.100	11.800

Fonte: Autoria própria (2020).

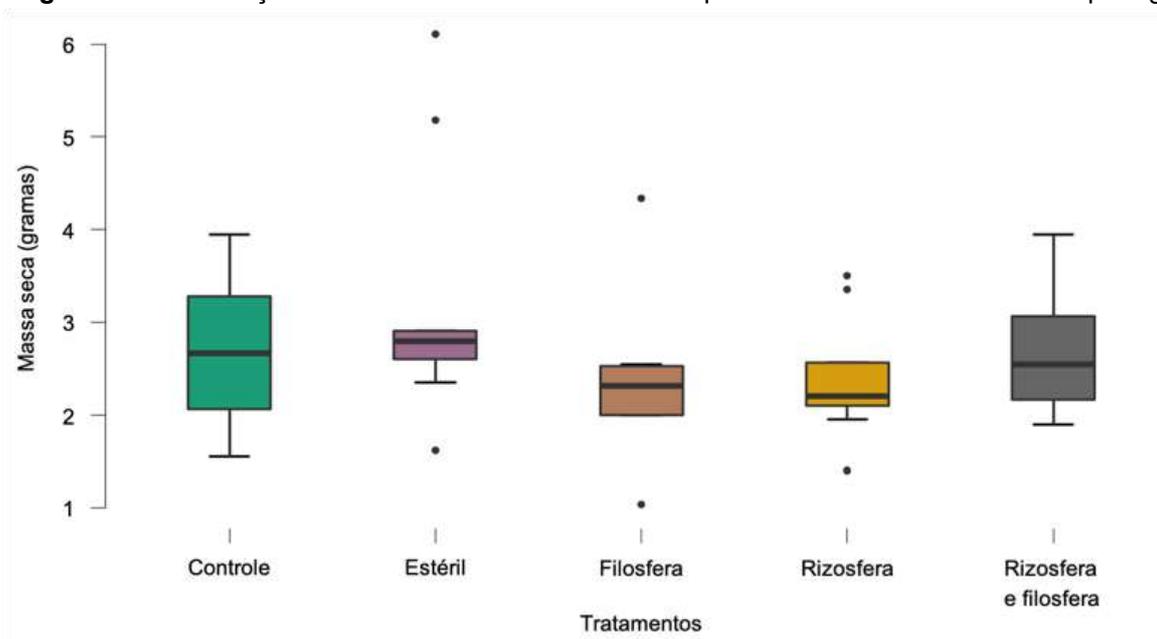
Figura 24 - Distribuição das medidas do comprimento dos frutos de pepino cultivados em ambiente protegido.

Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 10 - Massa seca das plantas cultivadas em ambiente protegido.

Tratamentos	Massa seca das plantas (gramas)				
	Controle	Estéril	Filosfera	Rizosfera	Rizosfera e filosfera
Válido	10	9	10	9	10
Perdido	0	1	0	1	0
Média	2.671	3.232	2.358	2.402	2.701
Desvio padrão	0.857	1.441	0.832	0.663	0.687
Mínimo	1.550	1.620	1.030	1.400	1.900
Máximo	3.950	6.110	4.340	3.500	3.950

Fonte: Autoria própria (2020).

Figura 25 - Distribuição das medidas de massa seca das plantas cultivadas em ambiente protegido.

Fonte: Autoria própria (2020).

Tabela 11 - Análise do solo realizada após o cultivo da cultura do pepino.

Tratamento/ Análise	Estéril	Controle	Rizosfera	Rizosfera e filosfera	Filosfera
MO gdm⁻³	38,87	37,53	32,17	37,53	30,83
P mgdm⁻³	15,78	15,78	16,85	16,85	15,78
K cmol.dm⁻³	0,37	0,30	0,34	0,32	0,35
Cu mgdm⁻³	6,20	7,70	7,30	7,60	6,60
Fe mgdm⁻³	47,80	35,60	34,60	37,10	31,90
Zn mgdm⁻³	4,30	3,20	3,30	3,00	2,80
Mn mgdm⁻³	281,30	100,60	103,40	95,20	82,90
pH CaCl²	4,50	4,70	4,70	4,70	4,70

Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 12 - Análise do solo realizada após o cultivo da cultura do pepino (continuação).

Tratamento / Análise	Estéril	Controle	Rizosfera	Rizosfera e filosfera	Filosfera
Índice SMP	5,60	5,70	5,60	5,90	5,60
Al⁺³ cmol.dm⁻³	0,31	0,25	0,26	0,31	0,24
H+Al cmol.dm⁻³	6,69	6,21	6,69	5,35	6,69
Ca mgdm⁻³	5,30	4,70	4,60	4,50	4,40
Mg mgdm⁻³	2,90	2,20	2,20	1,90	1,90
SB mgdm⁻³	8,57	7,20	7,14	6,72	6,65
V (%)	56,16	53,69	51,63	55,68	49,85
Sat.Al (%)	3,49	3,36	3,51	4,41	3,48

Fonte: Autoria própria (2020)

7 CONCLUSÕES

- a) A inoculação do consórcio microbiano não promoveu doenças nem anomalias visíveis nas plantas inoculadas;
- b) Os solos inoculados com o consórcio microbiano na rizosfera e rizosfera mais filosfera apresentaram as maiores médias no peso, comprimento e diâmetro dos frutos, dentre os tratamentos avaliados;
- c) Não foram verificadas alterações fenotípicas qualitativas observáveis entre os tratamentos;
- d) Não foi observada qualquer alteração promovida pela inoculação do consórcio microbiano na filosfera das plantas;
- e) Para a sequência da pesquisa existe a necessidade da adequação da carga e equitabilidade do consórcio microbiano, e foco deve ser dirigido à inoculação rizosférica.

REFERÊNCIAS

- ADESEMOYE, A. O.; TORBERT, H. A.; KLOEPPER, J. W. **Enhanced plant nutrient use efficiency with PGPR and AMF in an integrated nutrient management system**. Canadian Journal of Microbiology, v. 54, n. 10, p. 876-886, 2008.
- ALEF, K. (1995) SOIL RESPIRATION. IN: ALEF, K. AND NANNIPIERI, P., EDS., **Methods in Soil Microbiology and Biochemistry**, Academic Press Inc., San Diego, 214-215.
- ANDREWS, John H. **Biological control in the phyllosphere**. 1992.
- AZEVEDO, P. de A. S.; KUSS, A. V.; BERNARDI, E.; CALDAS, K. V.; GUEDES MILHEIRA, R. **Cultivo e isolamento de microrganismos presentes em cerâmicas arqueológicas no ambiente do LEPAARQ/UFPEL, na ótica da Conservação Preventiva**. Revista de Arqueologia, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 172–184, 2018. DOI: 10.24885/sab.v31i1.509. Disponível em: <https://revista.sabnet.org/index.php/sab/article/view/509>. Acesso em: 01 jan. 2021.
- BALTRUS, DAVID A. **Adaptation, specialization, and coevolution within phytobiomes**. Current opinion in plant biology, v. 38, p. 109-116, 2017.
- BAKKEN, J.S., BORODY, T., BRANDT, L.J., BRILL, J.V., DEMARCO, D.C., FRANZOS, M.A., KELLY, C., KHORUTS, A., LOUIE, T., MARTINELLI, L.P. AND MOORE, T.A. **Treating Clostridium difficile infection with fecal microbiota transplantation**, Clinical Gastroenterology and Hepatology, 9(12), pp.1044-1049. 2011.
- BANERJEE, ADITYA; ROYCHOUDHURY, ARYADEEP. **Epigenetic regulation during salinity and drought stress in plants: histone modifications and DNA methylation**. Plant Gene, v. 11, p. 199-204, 2017.
- BERDUGO, Silvia Eugenia Barrera. **Redes ecológicas em comunidades bacterianas da filosfera, dermosfera e rizosfera de espécies arbóreas da Mata Atlântica**. 2016. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.
- BERG, G., GRUBE, M., SCHLOTTER, M., & SMALLA, K. (2014C). **Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives**. Frontiers in Microbiology, 5, 148. doi:10.3389/fmicb.2014.00148.
- BERG, GABRIELE. **Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture**. Applied microbiology and biotechnology, v. 84, n. 1, p. 11-18, 2009.
- BEVER, JAMES D.; PLATT, THOMAS G.; MORTON, ELISE R. **Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities**. Annual review of microbiology, v. 66, p. 265-283, 2012.

BLOEMBERG, Guido V.; LUGTENBERG, Ben JJ. **Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria**. Current opinion in plant biology, v. 4, n. 4, p. 343-350, 2001.

CAÑIZARES, Kathia Alexandra Lara. **Enxertia, potássio e magnésio na nutrição, desenvolvimento e produção de pepino**. 2001. xvii, 158 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, 2001. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/103267>>.

CÂMARA BRASIL-ISRAEL DE COMÉRCIO E INDÚSTRIA. **Tecnologia na produção de mudas de hortaliças**. Disponível em: <<http://www.cambici.org.br/tecnologia-na-producao-de-mudas-de-hortalicas>>, acesso 20 de maio de 2020.

CHEN, Xiaodong et al. **Impact of long-term phosphorus fertilizer inputs on bacterial phoD gene community in a maize field, Northeast China**. Science of The Total Environment, v. 669, p. 1011-1018, 2019.

COTES, ALBA. (2018). **Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros**. Volume 1.

DAI, Zhongmin et al. **Long-term nutrient inputs shift soil microbial functional profiles of phosphorus cycling in diverse agroecosystems**. The ISME journal, v. 14, n. 3, p. 757-770, 2020.

DE BAKKER, Leonardo Barcellos; YOUNG, Carlos Eduardo Frickmann. **Caracterização do emprego verde no Brasil**. 2012.

DINIZ, Kênia Almeida et al. **Incorporação de microrganismos, aminoácidos, micronutrientes e reguladores de crescimento em sementes de alface pela técnica de peliculização**. Revista Brasileira de Sementes, v. 28, n. 3, p. 37-43, 2006.

DOS SANTOS SKRZYSZOWSKI, Vinicius; NETO, Sebastião Cavalcanti; SCHNEIDER, Alessandro Vinicius. **Estudo do potencial do capim vetiver (Chrysopogon Zizanioides (L.) Roberty) com ênfase à bioengenharia de solos, na reabilitação de áreas degradadas, considerando a identificação das classes de fragilidade ambiental da Colônia Santa Cruz, Litoral Do Paraná**. Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 3, p. 32593-32607, 2021.

EPSTEIN, HANNAH E. ET AL. **Microbiome engineering: enhancing climate resilience in corals**. Frontiers in Ecology and the Environment, v. 17, n. 2, p. 100-108, 2019.

FERREIRA, Cibele Machado et al. **Metodologia para a condução do teste de germinação em sementes de ipê-amarelo (Tabebuia serratifolia (Vahl) Nicholson)**. Cerne, v. 8, n. 2, p. 17-25, 2002.

FERRISS, R.S. (1984). **Effects of microwave-oven treatment on microorganisms in soil.** *Phytopathology*, 74, 121–126.

FRASER, Tandra D. et al. **Soil bacterial phoD gene abundance and expression in response to applied phosphorus and long-term management.** *Soil Biology and Biochemistry*, v. 88, p. 137-147, 2015.

FUKAMI, J., CEREZINI, P. & HUNGRIA, M. **Azospirillum: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation.** *AMB Expr* 8, 73 (2018).
<https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1>

GUIA, AP de O. **Produtividade de milho verde cultivado em sucessão a adubação verde com aplicação de microrganismos eficientes, nas condições de Matias Barbosa, MG.** Embrapa Agrobiologia-Tese/dissertação (ALICE), 2018.

HORTAVIVA COMERCIO DE SEMENTES E INSUMOS AGRÍCOLOS. Conheça melhor **Semente Pepino Híbrido Kybria f1.** Disponível em: <<http://www.SementePepinoHíbridoKybriaF1.1000MX-Produto-HortaVivaSementes>>; acesso em 15 de fevereiro de 2020.

JANZEN, DANIEL H. **When is it coevolution?**. 1980.

JANSSON, J.K. & HOFMOCKEL, K. S. (2018) **The soil microbiome — from metagenomics to metaphenomics.** *Current Opinion in Microbiology*, Volume 49, June 2019, Pages 104. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.013>

KIM, M.; SINGH, D.; LAI-HOE, A.; GO, R.; RAHIM, R.A.; AINUDDIN, A.N.; CHUN, J.; ADAMS, J.M. **Distinctive phyllosphere bacterial communities in tropical trees.** *Microbial Ecology*, New York, 63: 674-681, 2012.

LAGIER, J.-C. et al. **Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study.** *Clinical Microbiology and Infection*, v. 18, n. 12, p. 1185-1193, 2012.

LEACH, J. E., TRIPLETT, L. R., ARGUESO, C. T., & TRIVEDI, P. (2017). **Communication in the Phytobiome.** *Cell*, 169(4), 587-596.
Doi:10.1016/j.cell.2017.04.025.

LIU, JUAN ET AL. **An improved method for extracting bacteria from soil for high molecular weight DNA recovery and BAC library construction.** *The Journal of Microbiology*, v. 48, n. 6, p. 728-733, 2010.

LÓPEZ, Ana Clara. **Selección y caracterización de microorganismos con capacidad antifúngica y fertilizante aislados de la rizosfera de plantas de yerba mate de la provincia de Misiones para su aplicación como promotores del crecimiento vegetal.** 2021. Tese de Doutorado. Universidad Nacional de La Plata. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/119072>.

LOTRARIO, J.B., STUART, B.J., LAM, T., ET AL. (1995). **Effects of sterilization methods on the physical characteristics of soil: Implications for sorption**

isotherm analyses. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 54, ed. 5, p.668. doi:10.1007/bf00206097

MACEDO JUNIOR, E.K. **Crescimento e produtividade de pepino (*Cucumis sativum* L.) enxerta do e não enxertado, submetido à adubação convencional em cobertura e fertirrigação, em cultivo protegido.** Botucatu: UNESP, 1998. 129 p

MARTÍNEZ-HIDALGO, Pilar et al. **Engineering root microbiomes for healthier crops and soils using beneficial, environmentally safe bacteria.** Canadian journal of microbiology, v. 65, n. 2, p. 91-104, 2018.

MARULANDA, ADRIANA; BAREA, JOSÉ-MIGUEL; AZCÓN, ROSARIO. **Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness.** Journal of Plant Growth Regulation, v. 28, n. 2, p. 115-124, 2009.

MARTIN, Alyce M. et al. **The gut microbiome regulates host glucose homeostasis via peripheral serotonin.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 116, n. 40, p. 19802-19804, 2019.

MATTOS, Maria. Microbiologia do solo. NUNES, Oliveira. **Recurso solo: propriedades e usos.** 1. Edição – São Carlos: Editora Cubo, 2015. P. 251.

MENDES, RODRIGO; GARBEVA, PAOLINA; RAAIJMAKERS, Jos M. **The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms.** FEMS microbiology reviews, v. 37, n. 5, p. 634-663, 2013.

MUELLER, U.G., SACHS, J.L., 2015. **Engineering microbiomes to improve plant and animal health.** Trends Microbiol. 23, 606–617.

MULLER, T.; RUPPEL, S. **Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology.** FEMS Microbiology Ecology, Amsterdam, v. 87, p. 2-17, 2014.

NUISMER, SCOTT L.; GOMULKIEWICZ, RICHARD; RIDENHOUR, BENJAMIN J. **When is correlation coevolution?** The american naturalist, v. 175, n. 5, p. 525-537, 2010.

OTTO, R.; MULVANEY, R. L.; KHAN, S. A.; TRIVELIN, P. C. O. **Quantifying soil nitrogen mineralization to improve fertilizer nitrogen management of sugarcane.** Biology and Fertility of Soils, v. 49, n. 7, p. 893–904, 2013.

PANKE-BUISSE, Kevin et al. **Selection on soil microbiomes reveals reproducible impacts on plant function.** The ISME journal, v. 9, n. 4, p. 980-989, 2015.

PEREIRA, Maysa Mathias Alves et al. **Isolamento e identificação de microorganismos promotores de crescimento e inoculação em mudas de**

bananeira in vitro. Research, Society and Development, v. 10, n. 1, p. e54010112080-e54010112080, 2021.

PERTILLE, G. et al. (2021). **Immediate effects of the application of various fungal strains with urea fertiliser on microbiome structure and functions and their relationships with the physicochemical parameters of two different soil types.** Applied Soil Ecology, v. 163, 103972. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.103972>

PHILIPPOT, L., RAAIJMAKERS, J. M., LEMANCEAU, P., & VAN DER PUTTEN, W. H. (2013). **Going back to the roots: The microbial ecology of the rhizosphere.** Nature Reviews Microbiology, 11(11), 789–799. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3109>

QUIZA, LILIANA; ST-ARNAUD, MARC; YERGEAU, ETIENNE. **Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering.** Frontiers in plant science, v. 6, p. 507, 2015.

RITPITAKPHONG, Unyarat et al. **The microbiome of the leaf surface of Arabidopsis protects against a fungal pathogen.** New Phytologist, v. 210, n. 3, p. 1033-1043, 2016.

RODRIGUES, Yasmin Florentino. **Influência da diversidade microbiana presente na rizosfera do milho na disponibilização de fósforo.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SANTOS, Eder C. et al. **Artificial neural network modeling of microbial community structures in the Atlantic Forest of Brazil.** Soil Biology and Biochemistry, v. 69, p. 101-109, 2014.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology.** Second Edition. Butterworth Heinemann, Elsevier Science, 1995, p 357.

SINGH, Brajesh K. et al. **Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options.** Nature Reviews Microbiology, v. 8, n. 11, p. 779-790, 2010.

TANAKA, S., KOBAYASHI, T., IWASAKI, K. et al. (2003). **Properties and metabolic diversity of microbial communities in soils treated with steam sterilization compared with methyl bromide and chloropicrin fumigations.** Soil Science and Plant Nutrition, 49, 603–610.

TRANI, Paulo Espíndola; PASSOS, Francisco Antonio; DE ARAÚJO, Humberto Sampaio. **Calagem e adubação do pepino.** Campinas-SP: Instituto Agrônômico de Campinas, 2015.

VANDENKOORNHUYSE, PHILIPPE ET AL. **The importance of the microbiome of the plant holobiont.** New Phytologist, v. 206, n. 4, p. 1196-1206, 2015.

VAN DER HEIJDEN, M.G.A. & HARTMANN. M. (2016). **Networking in the plant microbiome**. PLOS Biology, 14 pp. 1-9.

VASCONCELOS, CAROLINA BETTKER ET AL. **Desperdício de alimentos e bioengenharia de alimentos. Desperdício de alimentos: velhos hábitos, novos desafios. p. 223.**

VENKATACHALAM LAKSHMANAN, GOPINATH SELVARAJ, HARSH P. BAIS. **Functional Soil Microbiome: Underground Solutions to a Aboveground Problem**. Plant Physiology, Volume 166, Issue 2, October 2014, Pages 689-700, <https://doi.org/10.1104/pp.114.245811>

VOGEL, CHRISTINE ET AL. **The Arabidopsis leaf transcriptome reveals distinct but also overlapping responses to colonization by phyllosphere commensals and pathogen infection with impact on plant health**. New Phytologist, v. 212, n. 1, p. 192-207, 2016

VORHOLT, JULIA A. **Microbial life in the phyllosphere**. Nature Reviews Microbiology, v. 10, n. 12, p. 828, 2012.

ZHU, BAOLI; WANG, XIN; LI, LANJUAN. **Human gut microbiome: the second genome of human body**. Protein & cell, v. 1, n. 8, p. 718-725, 2010.

APÊNDICE A - Sequencial do ensaio

Tabela 13 - Sequencial do ensaio implantado de forma heterogênea no ambiente controlado.

ENSAIO	DESCRIÇÃO DO TRATAMENTO
B01	SOLO SEM ESTERELIZAR / CONTROLE
A10	SOLO TOTALMENTE ESTERELIZADO
E01	PARTE AÉREA INOCULADA
C01	RIZOSFERA INOCULADA
A07	SOLO TOTALMENTE ESTERELIZADO
B03	SOLO SEM ESTERELIZAR / CONTROLE
A06	SOLO TOTALMENTE ESTERELIZADO
C02	RIZOSFERA INOCULADA
D01	RIZOSFERA E PARTE AÉREA INOCULADOS
B06	SOLO SEM ESTERELIZAR / CONTROLE
E02	PARTE AÉREA INOCULADA
A01	SOLO TOTALMENTE ESTERELIZADO
C03	RIZOSFERA INOCULADA
C10	RIZOSFERA INOCULADA
D02	RIZOSFERA E PARTE AÉREA INOCULADOS
E04	PARTE AÉREA INOCULADA
A02	SOLO TOTALMENTE ESTERELIZADO
C04	RIZOSFERA INOCULADA
A03	SOLO TOTALMENTE ESTERELIZADO
B07	SOLO SEM ESTERELIZAR / CONTROLE
D03	RIZOSFERA E PARTE AÉREA INOCULADOS
E03	PARTE AÉREA INOCULADA
A04	SOLO TOTALMENTE ESTERELIZADO
D04	RIZOSFERA E PARTE AÉREA INOCULADOS
B02	SOLO SEM ESTERELIZAR / CONTROLE
C05	RIZOSFERA INOCULADA
E06	PARTE AÉREA INOCULADA
A05	SOLO TOTALMENTE ESTERELIZADO
D07	RIZOSFERA E PARTE AÉREA INOCULADOS
B05	SOLO SEM ESTERELIZAR / CONTROLE
C07	RIZOSFERA INOCULADA
A09	SOLO TOTALMENTE ESTERELIZADO
D09	RIZOSFERA E PARTE AÉREA INOCULADOS
B08	SOLO SEM ESTERELIZAR / CONTROLE
E08	PARTE AÉREA INOCULADA
D10	RIZOSFERA E PARTE AÉREA INOCULADOS
D05	RIZOSFERA E PARTE AÉREA INOCULADOS
E05	PARTE AÉREA INOCULADA
C06	RIZOSFERA INOCULADA
D06	RIZOSFERA E PARTE AÉREA INOCULADOS
E07	PARTE AÉREA INOCULADA
A08	SOLO TOTALMENTE ESTERELIZADO
B10	SOLO SEM ESTERELIZAR / CONTROLE

D08	RIZOSFERA E PARTE AÉREA INOCULADOS
C08	RIZOSFERA INOCULADA
E09	PARTE AÉREA INOCULADA
C09	RIZOSFERA INOCULADA
B04	SOLO SEM ESTERELIZAR / CONTROLE
E10	PARTE AÉREA INOCULADA
B09	SOLO SEM ESTERELIZAR / CONTROLE

Fonte: Aatoria própria (2020)

APÊNDICE B - DESENVOLVIMENTO DAS PLANTAS

Neste apresento as tabelas referente ao desenvolvimento das plantas de acordo com o citado no texto, onde, verifica-se nestas o desenvolvimento de cada ensaio e de cada repetição, verificando-se diâmetro e altura.

Tabela 14 - Crescimento das plantas - Controle

MEDIÇÕES/ ENSAIO	20/02/2020	20/02/2020	28/02/2020	28/02/2020	06/03/2020	06/03/2020	14/03/2020	14/03/2020	27/03/2020	27/03/2020
	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D
A01	4,50	0,20	5,90	0,31	8,50	0,41	12,00	0,40	60,00	0,70
A02	4,50	0,20	5,25	0,32	6,50	0,38	13,00	0,40	25,00	0,50
A03	4,30	0,20	6,40	0,34	7,70	0,39	10,50	0,40	26,50	0,50
A04	4,10	0,20	5,20	0,29	5,50	0,43	12,00	0,50	44,70	0,60
A05	4,80	0,20	5,90	0,23	8,20	0,44	13,00	0,50	50,20	0,70
A06	4,00	0,25	4,81	0,26	3,50	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00
A07	4,40	0,25	4,83	0,25	6,00	0,39	8,10	0,40	33,50	0,50
A08	4,60	0,25	5,01	0,26	5,00	0,39	10,00	0,30	38,50	0,40
A09	4,70	0,20	5,01	0,30	7,00	0,34	12,00	0,50	45,80	0,60
A10	4,20	0,25	4,37	0,24	5,50	0,23	5,10	0,40	22,00	0,50
MEDIÇÕES/ ENSAIO	02/04/2020	02/04/2020	11/04/2020	11/04/2020	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VARIÂNCIA			
	H	D	H	D						
A01	60,00	0,70	59,10	0,65	15,24	23,47	551,01			
A02	36,50	0,55	42,10	0,60	9,70	13,82	190,92			
A03	34,60	0,55	37,20	0,60	9,30	12,83	164,51			
A04	53,20	0,55	55,00	0,60	13,06	20,15	406,02			
A05	60,50	0,70	63,50	0,75	14,97	22,94	526,44			
A06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,94	1,67	2,80			
A07	41,30	0,50	40,30	0,55	10,09	15,05	226,58			
A08	46,50	0,60	48,20	0,65	11,48	17,52	306,90			
A09	49,10	0,55	49,20	0,70	12,57	18,82	354,17			
A10	38,00	0,40	40,10	0,70	8,71	13,54	183,38			

Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 15 - Crescimento das plantas - Estéril

MEDIÇÕES/ ENSAIO	20/02/2020	20/02/2020	28/02/2020	28/02/2020	06/03/2020	06/03/2020	14/03/2020	14/03/2020	27/03/2020	27/03/2020
	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D
B01	4,50	0,25	5,20	0,31	6,50	0,43	9,60	0,60	11,50	0,70
B02	4,90	0,25	5,80	0,34	7,20	0,41	12,00	0,40	38,30	0,50
B03	4,50	0,25	5,31	0,35	8,50	0,48	12,00	0,50	28,00	0,70
B04	4,70	0,25	5,91	0,30	8,00	0,43	13,50	0,40	41,50	0,70
B05	4,30	0,20	6,60	0,34	8,50	0,40	14,00	0,50	42,10	0,80
B06	4,00	0,20	5,46	0,30	7,30	0,50	10,50	0,50	38,20	0,70
B07	5,20	0,25	6,50	0,32	7,80	0,37	8,50	0,40	9,00	0,50
B08	5,10	0,20	5,31	0,34	6,50	0,48	14,00	0,50	23,80	0,70
B09	5,00	0,20	6,43	0,28	8,00	0,38	12,00	0,40	30,00	0,50
B10	5,30	0,20	6,83	0,29	9,20	0,53	9,50	0,60	20,00	0,60

MEDIÇÕES/ ENSAIO	02/04/2020	02/04/2020	11/04/2020	11/04/2020	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VARIÂNCIA
	H	D	H	D			
B01	11,50	0,45	40,30	0,60	6,60	10,22	104,41
B02	38,30	0,60	59,10	0,65	12,05	18,22	331,97
B03	28,00	0,55	39,20	0,75	9,22	12,48	155,79
B04	38,50	0,60	29,20	0,70	10,34	14,31	204,78
B05	42,10	0,65	40,00	0,65	11,51	16,09	258,75
B06	44,20	0,65	0,00	0,00	8,04	13,94	194,26
B07	9,50	0,50	42,10	0,60	6,54	10,52	110,63
B08	24,50	0,55	45,10	0,70	9,13	12,90	166,34
B09	35,40	0,50	37,20	0,60	9,78	13,29	176,72
B10	47,30	0,80	8,80	0,60	7,90	12,23	149,54

Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 16 - Crescimento das plantas - Filosfera

MEDIÇÕES/ ENSAIO	20/02/2020		28/02/2020		06/03/2020		14/03/2020		27/03/2020	
	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D
C01	4,80	0,20	5,92	0,30	8,00	0,30	8,50	0,40	23,00	0,60
C02	4,70	0,20	5,80	0,30	8,00	0,43	10,60	0,60	35,00	0,70
C03	5,00	0,25	6,30	0,38	8,50	0,47	14,00	0,60	26,50	0,70
C04	5,00	0,25	6,30	0,30	7,50	0,43	13,50	0,50	39,20	0,70
C05	4,80	0,20	5,25	0,31	6,50	0,37	11,00	0,40	18,10	0,50
C06	5,20	0,20	6,79	0,33	6,80	0,45	16,50	0,40	34,50	0,60
C07	5,00	0,25	5,22	0,29	7,00	0,40	13,00	0,40	32,30	0,60
C08	5,10	0,25	6,40	0,35	9,20	0,51	15,50	0,40	45,10	0,70
C09	4,70	0,25	6,02	0,31	8,00	0,43	11,50	0,40	29,50	0,70
C10	4,50	0,25	6,70	0,31	8,50	0,45	12,00	0,40	38,50	0,60

MEDIÇÕES/ ENSAIO	02/04/2020		11/04/2020		MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VARIÂNCIA
	H	D	H	D			
C01	40,30	0,80	41,20	0,90	9,66	13,99	195,79
C02	40,50	0,65	40,00	0,65	10,58	14,96	223,72
C03	53,20	0,55	55,00	0,60	12,29	18,47	341,29
C04	37,50	0,55	38,00	0,70	10,75	14,82	219,68
C05	28,00	0,55	28,00	0,75	7,48	9,74	94,83
C06	32,50	0,65	33,00	0,80	9,91	12,97	168,18
C07	25,20	0,75	25,00	0,85	8,30	10,72	115,02
C08	60,50	0,60	63,50	0,75	14,92	22,37	500,32
C09	41,30	0,50	50,30	0,70	11,04	16,16	261,06
C10	44,20	0,65	42,50	0,90	11,46	16,23	263,32

Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 17 - Crescimento das plantas - Rizosfera

MEDIÇÕES/ ENSAIO	20/02/2020	20/02/2020	28/02/2020	28/02/2020	06/03/2020	06/03/2020	14/03/2020	14/03/2020	27/03/2020	27/03/2020
	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D
D01	5,40	0,25	7,33	0,37	10,50	0,47	15,20	0,60	39,10	0,80
D02	5,00	0,20	6,33	0,27	8,30	0,44	11,00	0,40	28,50	0,90
D03	4,80	0,20	6,90	0,31	9,20	0,41	15,00	0,50	38,20	0,70
D04	4,70	0,20	7,60	0,30	9,20	0,44	16,20	0,60	36,10	0,60
D05	7,00	0,30	8,01	0,25	9,70	0,38	16,00	0,40	29,50	0,60
D06	6,20	0,25	6,83	0,26	6,00	0,44	12,00	0,40	35,20	0,60
D07	5,80	0,25	7,05	0,30	9,80	0,55	13,00	0,40	21,50	0,60
D08	6,00	0,30	6,29	0,31	8,30	0,36	10,00	0,60	9,50	0,60
D09	5,80	0,20	8,45	0,34	11,00	0,51	20,00	0,50	49,80	0,70
D10	5,00	0,25	7,05	0,33	9,80	0,51	16,00	0,50	27,50	0,70
MEDIÇÕES/ ENSAIO	02/04/2020	02/04/2020	11/04/2020	11/04/2020	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VARIÂNCIA			
	H	D	H	D						
D01	0,00	0,00			6,67	10,88	118,40			
D02	49,10	0,55	49,20	0,70	11,49	17,01	289,41			
D03	48,20	0,65	48,50	0,70	12,45	17,62	310,55			
D04	24,50	0,55	25,10	0,70	9,06	11,38	129,57			
D05	46,70	0,65	46,50	0,90	11,92	16,23	263,52			
D06	30,20	0,75	30,10	0,80	9,29	12,30	151,18			
D07	34,50	0,55	35,30	0,65	9,30	12,06	145,49			
D08	35,70	0,65	36,10	0,70	8,24	11,84	140,21			
D09	37,10	0,65	37,30	0,80	12,37	16,33	266,75			
D10	46,00	0,65	44,00	0,75	11,36	15,65	245,03			

Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 18 - Crescimento das plantas - Rizosfera e Filosfera

MEDIÇÕES/ ENSAIO	20/02/2020	20/02/2020	28/02/2020	28/02/2020	06/03/2020	06/03/2020	14/03/2020	14/03/2020	27/03/2020	27/03/2020
	H	D	H	D	H	D	H	D	H	D
E01	4,60	0,25	6,10	0,31	7,50	0,43	9,60	0,70	32,00	0,80
E02	4,90	0,25	5,56	0,28	9,00	0,44	14,20	0,50	39,50	0,70
E03	4,50	0,25	4,70	0,27	6,20	0,44	10,00	0,40	38,50	0,60
E04	4,80	0,25	5,80	0,30	6,20	0,44	5,00	0,40	X	X
E05	6,20	0,30	7,42	0,29	9,50	0,39	14,00	0,40	33,10	0,50
E06	4,70	0,20	5,80	0,36	9,50	0,53	12,50	0,50	24,50	0,60
E07	4,40	0,25	5,49	0,35	6,70	0,44	13,00	0,40	31,00	0,80
E08	4,50	0,20	7,09	0,33	9,00	0,57	15,00	0,50	43,80	0,60
E09	5,90	0,20	6,50	0,29	8,50	0,34	12,50	0,40	34,90	0,70
E10	4,50	0,40	5,27	0,32	8,50	0,48	14,00	0,40	42,50	0,70

MEDIÇÕES/ ENSAIO	02/04/2020	02/04/2020	11/04/2020	11/04/2020	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	VARIÂNCIA
	H	D	H	D			
E01	35,70	0,80	35,30	0,80	9,64	13,24	175,32
E02	46,50	0,60	48,20	0,65	12,23	17,50	306,41
E03	47,30	0,80	10,20	0,90	8,93	14,37	206,39
E04	10,20	0,75	47,30	0,75	6,85	12,58	158,35
E05	46,80	0,60	47,00	0,80	11,95	16,64	276,94
E06	52,80	0,65	55,60	0,65	12,06	18,41	339,01
E07	30,20	0,70	30,50	0,70	8,92	11,81	139,57
E08	42,10	0,65	40,50	0,70	11,82	16,37	268,02
E09	36,50	0,60	37,00	0,60	10,35	13,95	194,72
E10	35,40	0,50	35,50	0,60	10,65	14,76	217,89

Fonte: Autoria própria (2020)