MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE

TRATAMENTO DE SEMENTES COM MICRORGANISMOS BENÉFICOS: VIGOR E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE PLÂNTULAS

MATHEUS EMANNUEL OLIVEIRA VIEIRA

2026

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE

MATHEUS EMANNUEL OLIVEIRA VIEIRA

TRATAMENTO DE SEMENTES COM MICRORGANISMOS BENÉFICOS: VIGOR E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE PLÂNTULAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de "Doutor em Ciências".

Orientadora
Profa. Dra. Renata Silva Mann

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2026

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Vieira, Matheus Emannuel Oliveira
V657t Tratamento de sementes com microrganismos benéficos: vigor e respostas fisiológicas de plântulas / Matheus Emannuel Olievira Vieira; orientadora Renata Silva Mann. – São Cristóvão, SE, 2026.
110 f. : il.

Tese (Doutorado em Agricultura e Biodiversidade) –, Universidade Federal de Sergipe, 2026.

1. Agrobiodiverisdade. 2. Sementes-Tratamento. 3. Sementes- fisiologia. 4. Produtos biológicos. 5. Antioxidantes-Metabolismo. 6. Plantas. 7. Vitalidade. I. *Bacillus* (Bactéria). II. Mann, Renata Silva, orient. III. Título.

CDU 633.15

MATHEUS EMANNUEL OLIVEIRA VIEIRA

TRATAMENTO DE SEMENTES COM MICRORGANISMOS BENÉFICOS: VIGOR E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE PLÂNTULAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Doutorado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de "Doutor em Ciências".

APROVADA em 21de julho de 2026.

Dra. Aline de Almeida Vasconcelos	UFS
Dr. Marcelo Fernandes	EMBRAPA
Dra. Heloisa Oliveira Santos	UFLA
Dr. Wilson Vicente Souza Pereira	IFPI

gov.br Documento assinado digitalmente
RENATA SILVA MANN
Data: 11/09/2026 08:53:41-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. Renata Silva Mann
(Orientadora)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a DEUS.

À minha família, especialmente a meu pai, Américo; à minha mãe, Marlise; e à minha irmã, Thiara, pelo amor, incentivo, compreensão e apoio incondicional durante todas as etapas desta caminhada.

À minha orientadora, Prof.ª Dr.ª Renata Silva Mann, e à minha coorientadora, Dr.ª Valdinete Vieira Nunes, pela orientação para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, Prof.ª Dr.ª Aline de Almeida Vasconcelos, Dr. Marcelo Fernandes, Dr.ª Heloisa Oliveira Santos e Dr. Wilson Vicente Souza Pereira, pela disponibilidade e pelas valiosas contribuições para o aprimoramento deste trabalho.

À Universidade Federal de Sergipe, ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade e aos seus docentes, servidores e colaboradores, pela formação acadêmica, pelo suporte institucional e pelas oportunidades proporcionadas.

Aos Laboratórios LENTES e LAFIBIO e aos integrantes do grupo de pesquisa GENAPLANT, pelo acolhimento, pela colaboração nas atividades experimentais, pelas discussões científicas e pela convivência durante o período de realização deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação e de laboratório, pela amizade, parceria, auxílio nos experimentos, troca de experiências e apoio nos momentos de dificuldade.

Aos estudantes de graduação, técnicos, colaboradores e demais pessoas que contribuíram para a condução dos experimentos, a coleta de dados, as análises laboratoriais e demais etapas desta pesquisa.

Às instituições de fomento, CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro, pela concessão de bolsa e/ou pelos recursos destinados à realização deste estudo.

Aos amigos, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo incentivo constante e por tornarem esta caminhada mais leve.

Por fim, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para minha formação pessoal, acadêmica e profissional. A todos, minha sincera gratidão.

BIOGRAFIA

Matheus Emannuel Oliveira Vieira nasceu em Aracaju, Sergipe. Graduou-se em Engenharia Agronômica pela Universidade Federal de Sergipe, em 2018. Durante a graduação, desenvolveu atividades acadêmicas e científicas relacionadas ao manejo do solo e à produção agrícola.

Em 2021, concluiu o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade da Universidade Federal de Sergipe, desenvolvendo pesquisa na área de microbiologia do solo e sistemas de produção agrícola. Posteriormente, ingressou no curso de doutorado no mesmo Programa, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES.

Integra o Grupo de Pesquisa em Conservação, Melhoramento e Gestão de Recursos Genéticos - GENAPLANT, no qual desenvolve pesquisas voltadas à prospecção, à caracterização e à utilização de microrganismos de interesse agrícola, com ênfase em bioinsumos, tratamento de sementes, promoção do crescimento vegetal e sustentabilidade dos sistemas agrícolas.

Ao longo de sua formação, tem participado de projetos de pesquisa, atividades laboratoriais, produção de trabalhos científicos e ações voltadas ao desenvolvimento de tecnologias aplicáveis à agricultura, especialmente em sistemas de produção dos Tabuleiros Costeiros.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....x
LISTA DE TABELAS.....xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....xiii
RESUMO.....xiv
ABSTRACT.....xv
1. INTRODUÇÃO GERAL 1
2. REVISÃO DE LITERATURA..... 2
2.1. Biotecnologia microbiana e interações entre plantas e microrganismos 2
2.2. Bioprospecção microbiana e potencial dos ambientes do SEALBA..... 2
2.3. Promoção do crescimento vegetal e atividade antagônica *in vitro* de culturas bacterianas mistas contra fitopatógenos 3
2.3.1. Mecanismos diretos e indiretos de promoção do crescimento 3
2.3.2. Controle biológico e o patógeno *Macrophomina phaseolina* 3
2.4. *Bacillus sensu lato* e *Priestia* como agentes de interesse agrícola..... 3
2.4.1. Reorganização taxonômica e diversidade funcional..... 3
2.4.2. Potencial biotecnológico de *Bacillus* sp..... 5
2.4.3. Potencial biotecnológico de *Priestia* sp. 5
2.5. Bioinsumos agrícolas: conceito, expansão e desenvolvimento tecnológico..... 5
2.5.1. Microrganismos em bioinsumos e presença comercial de *Bacillus* 6
2.5.2. Formulações, viabilidade e combinação bacteriana 7
2.6. Tratamento biológico de sementes 8
2.6.1. Biocondicionamento e osmocondicionamento..... 8
2.7. Respostas fisiológicas e bioquímicas ao tratamento de sementes..... 9
2.8. Uso de bioinsumos no tratamento de sementes.....10
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 12
4. ARTIGO 1: GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA TRATADAS COM FORMULAÇÃO MICROBIANA MULTICOMPONENTE 23
Resumo.....23
4.1. Introdução 23
4.2. Material e Métodos..... 25
4.2.1. Local de execução e material biológico 25
4.2.2. Preparação da solução de potencial hídrico controlado (PS) 25
4.2.3. Sobrevivência bacteriana após exposição à solução PS e solubilização de fósforo inorgânico 25
4.2.4. Cocultivo bacteriano e preparação da formulação multicomponente..... 26
4.2.5. Determinação do período de embebição das sementes em solução de potencial hídrico controlado 27
4.2.6. Germinação e vigor das sementes tratadas com a formulação multicomponente ..... .27
4.2.7. Análise estatistica.....28
4.3. Resultados..... 28
4.3.1. Recuperação bacteriana e potencial de solubilização de fósforo inorgânico após exposição à solução PS..... 28
4.3.2. Efeito do período de embebição sobre a germinação e a formação de plântula..30
4.3.3. Efeito da inclusão do cocultivo na formulação multicomponente..... 32
4.4. Discussão 33
4.5. Conclusões 35
4.6. Referências Bibliográficas 35
5. ARTIGO 2: IMERSÃO EM BIOINSUMO À BASE DE *Bacillus amyloliquefaciens* MODULA O VIGOR E A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLÂNTULAS DE MILHO 39

Resumo.....39
5.1. Introdução 39
5.2. Material e Métodos..... 40
5.2.1. Material vegetal e caracterização do bioinsumo..... 40
5.2.2. Tratamentos e sistema aerado de imersão 40
5.2.3. Germinação e avaliação do vigor em diferentes tempos de imersão 40
5.2.4. Análise digital das plântulas..... 41
5.2.5. Ensaio com tempos contrastantes de imersão 41
5.2.6. Proteínas totais e extração das enzimas antioxidantes 41
5.2.7. Determinação das atividades antioxidantes..... 42
5.2.8.Análise estatística.....42
5.3. Resultados 43
5.3.1. Germinação das sementes 43
5.3.2. Vigor e padrões morfológicos em diferentes tempos de imersão..... 43
5.3.3. Vigor das plântulas nos tempos contrastantes 45
5.3.4. Atividade das enzimas antioxidantes 47
5.4. Discussão 48
5.5. Conclusão..... 49
5.6. Referências Bibliográficas 50
6. ARTIGO 3: COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL IN VITRO DE CULTURAS MICROBIANAS ASSOCIADAS A ENDOCARPOS DE UMBU E A CRESCIMENTO ESPONTÂNEO EM CULTIVO DE *Macrophomina phaaseolina* 53
Resumo.....53
6.1. Introdução 53
6.2. Material e Métodos..... 54
6.2.1. Origem e manutenção das culturas bacterianas..... 54
6.2.2. Crescimento microbiano e caracterização morfotintorial 55
6.2.3. Antagonismo in vitro contra *Macrophomina phaseolina* 55
6.2.4. Germinação de sementes em cocultivo direto 55
6.2.5. Efeito dos compostos voláteis sobre a germinação 56
6.2.6. Efeito na germinação de sementes de soja 56
6.2.7. Solubilização de fosfato inorgânico..... 56
6.2.8. Formação de biofilme 57
6.2.9. Extração de DNA e PCR dos genes *phoC* e *phoD* 57
6.2.10. Caracterização taxonômica molecular 58
6.2.11. Análise estatística..... 58
6.3. Resultados 59
6.3.1. Crescimento e caracterização morfotintorial..... 59
6.3.2. Antagonismo contra *Macrophomina phaseolina* 60
6.3.3. Germinação sob contato direto e exposição a compostos voláteis *in vitro* e por tratamento da semente *in vivo*..... 61
6.3.4. Solubilização de fosfato inorgânico..... 64
6.3.5. Formação de biofilme 64
6.3.6. Amplificação dos genes *phoC* e *phoD*..... 64
6.3.7. Caracterização taxonômica das culturas bacterianas 66
6.4. Discussão 67
6.5. Conclusões 69
6.6. Referências Bibliográficas 69
7. ARTIGO 4: DESVENDANDO AS DEFESAS DAS PLANTAS: O POTENCIAL DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS PARA A RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA EM HORTALIÇAS - UMA REVISÃO SISTEMÁTICA..... 73
Resumo.....73

7.1. Introdução 73
7.2. Material e Métodos 74
7.2.1. Revisão de literatura 74
7.2.2. Estrutura social e conceitual 74
7.2.3. Microrganismos, genes e metabólitos envolvidos na defesa vegetal 74
7.3. Resultados 76
7.3.1. Bibliometria dos estudos sobre resistência sistêmica induzida 76
7.3.2. Características dos estudos sobre resistência sistêmica induzida 79
7.4. Discussão 85
7.5. Conclusões 87
7.6. Referências Bibliográficas 87
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS 94

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Reorganização filogenômica do gênero *Bacillus* e formação de novos gêneros..... 6
Figura 2 - Evolução temporal de depósitos de patentes em bioinsumos entre 2016 e 2025..... 9
Figura 3 - Frequência relativa das modalidades de aplicação de bioestimulantes em estudos agrícolas. 10
Figura 1 - Frequência relativa das modalidades de aplicação de bioestimulantes em estudos agrícolas.....17

ARTIGO 1

Figura 1 - Área média da zona de clareamento produzida pelas cepas bacterianas recuperadas em meio Pikovskaya após exposição à solução PS 29
Figura 2 - Área de expansão radial das combinações de *Priestia aryabhattai* com *Bacillus amyloliquefaciens* ou *Bacillus licheniformis* em meio Pikovskaya, após incubação prévia em meio LB ou na solução PS 29
Figura 3 - Análise de Componentes Principais da germinação e vigor de plântulas de soja embebidas em diferentes tempos na solução de potencial hídrico controlado. AN = Plântula anormal, GHT = Tamanho do Hipocótilo (cm), NG = Número de plântulas não germinadas, PN = Número de plântulas normais, RHR = Razão Hipocotilo/Raiz, TT = Tamanho Total (cm), TRP = Tamanho da Raiz Principal (cm) 31
Figura 4 - Plântulas de soja germinadas a partir de sementes tratadas em solução com potencial hídrico controlado em diferentes tempos de embebição. Plântulas de soja obtidas nos diferentes tratamentos 32
Figura 5 - Proporção de plântulas normais e anormais após 4 horas de embebição na solução PS, na ausência e na presença do cocultivo formado por *Priestia aryabhattai* e *Bacillus amyloliquefaciens* 33

ARTIGO 2

Figura 1 - Análise de componentes principais das características de vigor de plântulas de milho oriundas de sementes submetidas ao controle sem tratamento (C), contato imediato (0 h) ou imersão por 2, 4 e 6 h em bioinsumo à base de *Bacillus amyloliquefaciens*. RRPA: razão entre raiz e parte aérea; SL: comprimento da parte aérea; TS: comprimento total; PRS: comprimento da raiz principal; NR: número de raízes..... 44
Figura 2 - Plântulas de milho oriundas de sementes submetidas a bioinsumo à base de Bacillus amyloliquefaciens. 45
Figura 3 - Distribuição das características morfológicas de plântulas de milho nos tratamentos controle (C), 4 h e 6 h. Cada ponto representa uma plântula analisada. 46
Figura 4 - Aspecto visual de plântulas de milho oriundas dos tratamentos controle (C), 4 h e 6 h de imersão em bioinsumo à base de *Bacillus amyloliquefaciens* 47
Figura 5 - Atividade da ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em plântulas de milho em bioinsumo à base de Bacillus amyloliquefaciens. 48

ARTIGO 3

Figura 1 - Densidade populacional das culturas bacterianas mistas B6 e EJ115 após 48 h de cultivo. ns: diferença não significativa entre as culturas ($p > 0,05$). 59

Figura 2 - Comparação morfológica por microscopia óptica. (A) B6 com células ovais, brotamento e pseudohifas. (B) EJ115 com células em bastonete e coloração Gram-positiva. Coloração de Gram, 1000× com óleo de imersão..... 60
Figura 3 - Atividade antagônica *in vitro* das culturas bacterianas mistas B6 e EJ115 sobre o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* após 7 dias de incubação. 61
Figura 4 - Porcentagem de germinação de sementes de feijão submetidas a diferentes formas de exposição às culturas bacterianas B6 e EJ115..... 62
Figura 5 - Germinação de sementes de soja submetidas ao contato direto com as culturas bacterianas B6 e EJ115 após 4 dias de incubação 63
Figura 6 - Plântulas de soja submetidas ao contato direto com as culturas bacterianas B6 e EJ115 após 4 dias de incubação. 63
Figura 7 - Solubilização de fosfato inorgânico pelas culturas bacterianas mistas B6 e EJ115 em meio Pikovskaya modificado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Šidák ($p > 0,05$)..... 64
Figura 8 - Formação de biofilme pelas culturas bacterianas mistas pelo método do cristal violeta em placas de microtitulação. 65
Figura 9 - Perfil eletroforético de produtos obtidos com iniciadores direcionados a *phoC* e *phoD* na cultura bacteriana mista EJ115. 66

ARTIGO 4

Figura 1 - Fluxograma do mapeamento científico utilizado para identificar os principais componentes envolvidos nos processos de resistência sistêmica induzida..... 75
Figura 2 - Produção científica anual dos estudos relacionados à resistência sistêmica induzida 76
Figura 3 - Produção científica por país: principais contribuições para a pesquisa sobre resistência sistêmica induzida entre 2005 e 2023..... 76
Figura 4 - Rede de colaboração: principais autores e grupos de colaboração na pesquisa sobre resistência sistêmica induzida..... 77
Figura 5 - Relações entre as palavras mais frequentes nos estudos sobre resistência sistêmica induzida 77
Figura 6 - Análise de correspondência múltipla dos termos mais utilizados nos estudos sobre resistência sistêmica induzida. A proximidade entre os pontos representa maior associação entre as categorias..... 78
Figura 7 - Gêneros de microrganismos benéficos empregados nos estudos sobre resistência sistêmica induzida, expressos em porcentagem 79
Figura 8 - Principais espécies de microrganismos benéficos empregadas em estudos sobre resistência sistêmica induzida: A, *Trichoderma*; B, *Bacillus*; e C, *Pseudomonas* 80
Figura 9 - Espécies vegetais mais utilizadas em estudos sobre resistência sistêmica induzida ..... .81
Figura 10 - Metabólitos associados ao sistema de defesa vegetal em estudos sobre resistência sistêmica induzida..... 85

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 - Médias e erro padrão de plântulas de soja embebidas em diferentes tempos em solução osmoprotetora. GHT = Tamanho do Hipocótilo, TT = Tamanho Total, TRP = Tamanho da Raiz Principal. Letras iguais não diferem estatisticamente a 5 % pelo teste de Sidak..... 32

ARTIGO 2

Tabela 1 - Características morfológicas de plântulas de milho oriundas de sementes submetidas a diferentes tempos de imersão em bioinsumo à base de *Bacillus amyloliquefaciens*. Os valores representam média ± erro-padrão. 44

ARTIGO 3

Tabela 1 - Síntese dos resultados quantitativos das culturas B6 e EJ115 nos ensaios funcionais 65

ARTIGO 4

Tabela 1 - Correlação entre os termos e as dimensões da análise de correspondência múltipla nos estudos sobre resistência sistêmica induzida. 78
Tabela 2 - - Genes e produtos de expressão gênica relacionados à resistência sistêmica induzida, microrganismos benéficos associados e patógenos avaliados. 82
Tabela 3 – Genes expressos por microrganismos benéficos durante a resistência sistêmica induzida 84

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ANOVA	Análise de variância
APX	Ascorbato peroxidase
ARY	*Priestia aryabhattai* CCT 4005
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
BA	*Bacillus amyloliquefaciens*
BL	*Bacillus licheniformis*
BOD	Biochemical Oxygen Demand (demanda bioquímica de oxigênio)
BPCP	Bactérias promotoras de crescimento de plantas
BSA	Bovine Serum Albumin (albumina sérica bovina)
CAT	Catalase
CCT	Coleção de Culturas Tropical
CTC	Capacidade de troca catiônica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Enzyme Commission (Comissão de Enzimas)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GLM	Generalized Linear Models (modelos lineares generalizados)
HSV	Hue, Saturation and Value (matiz, saturação e valor)
ISR	Induced Systemic Resistance (resistência sistêmica induzida)
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LENTES	Laboratório de Ensino em Tecnologia de Sementes
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MB	Microrganismos benéficos
NBT	Nitro Blue Tetrazolium (azul de nitrotetrazólio)
PCA	Principal Component Analysis (análise de componentes principais)
PEG	Polietilenoglicol
PEG 6000	Polietilenoglicol com massa molecular média de 6.000 g mol^{-1}
PNB	Programa Nacional de Bioinsumos
PS	Solução de potencial hídrico controlado
R5	Estádio fenológico de início do enchimento dos grãos da soja
R8	Estádio fenológico de maturação plena da soja
RAS	Regras para Análise de Sementes
RNA	Ácido ribonucleico
RUBISCO	Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxygenase
SB	Soma de bases
SEALBA	Região agrícola formada por áreas de Sergipe, Alagoas e Bahia
SOD	Superóxido dismutase
SVD	Singular Value Decomposition (decomposição em valores singulares)
TS	Tratamento de sementes
UFC	Unidades formadoras de colônia
UV-Vis	Ultravioleta-visível

RESUMO

VIEIRA, Matheus Emannuel Oliveira. **Tratamento de sementes com microrganismos benéficos: vigor e respostas fisiológicas de plântulas.** São Cristóvão: UFS, 2026.110p. (Tese –Doutorado em Agricultura e Biodiversidade).*

A agricultura contemporânea demanda tecnologias capazes de elevar a eficiência produtiva e a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, reduzindo a dependência de insumos químicos. Nesse contexto, o uso de microrganismos benéficos no tratamento de sementes constitui estratégia promissora por atuar diretamente na germinação, no vigor e no estabelecimento inicial das plantas. Nesta tese, integraram-se estudos sobre bioinsumos, combinações bacterianas, soluções osmoprotetoras, isolamento e caracterização do potencial biotecnológico de culturas microbianas mistas e indução de resistência sistêmica, com ênfase no aproveitamento de recursos microbianos e no desenvolvimento de tecnologias aplicáveis às condições agrícolas regionais. No Artigo 1, foi avaliada uma solução tecnológica para o tratamento de sementes de soja armazenadas, baseada na associação entre microrganismos e uma matriz osmoprotetora para melhorias no vigor das plântulas. Diferentes períodos de embebição e combinações microbianas foram testados, evidenciando que a resposta ao tratamento depende da composição da formulação e das condições de aplicação. Houve favorecimento de características de crescimento inicial e vigor das plântulas de soja, indicando potencial para o desenvolvimento de formulações destinadas ao tratamento biológico de sementes. No Artigo 2, avaliou-se o biocondicionamento de sementes de milho com *Bacillus amyloliquefaciens*, considerando germinação, morfologia das plântulas e atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase. Não houve alteração do percentual de germinação, mas o tempo de exposição foi crucial para o vigor, o crescimento e o metabolismo antioxidante das plântulas. No período de quatro horas houve respostas positivas, enquanto a exposição por seis horas esteve associada ao menor desempenho no vigor e maior atividade da ascorbato peroxidase, indicando maior demanda antioxidante. Nesses artigos, apresenta-se que o tempo de contato é uma variável decisiva, pois exposições intermediárias promoveram respostas mais equilibradas, enquanto períodos prolongados podem alterar o metabolismo e comprometer o vigor. No Artigo 3, foram prospectadas culturas mistas microbianas e avaliou-se o potencial biotecnológico dessas culturas na solubilização de fósforo inorgânico, no antagonismo *in vitro* do fungo *Macrophomina phaseolinana* e na germinação das culturas de feijão e soja. No Artigo 4, uma revisão sistemática reuniu evidências sobre a resistência sistêmica induzida por microrganismos benéficos. *Trichoderma, Bacillus* e *Pseudomonas* destacaram-se entre os principais gêneros envolvidos na ativação de defesas vegetais, com participação de genes, proteínas, enzimas, espécies reativas de oxigênio e vias hormonais relacionadas aos ácidos jasmônico e salicílico e ao etileno. Em conjunto, os estudos permitem inferir sobre a eficiência dos bioinsumos e a dependência da interação entre microrganismo, formulação, espécie vegetal, qualidade das sementes, tempo de aplicação e ambiente. Em conjunto, os resultados reforçam o potencial dos bioinsumos avaliados, mas também demonstram a necessidade de estudos adicionais sobre estabilidade, compatibilidade, sobrevivência microbiana e validação agronômica em diferentes condições de produção.

Palavras-chave: bioinsumos, tratamento de sementes, *Bacillus amyloliquefaciens*, condicionamento fisiológico, vigor de plântulas, metabolismo antioxidante.

---

* Comitê Orientador: Renata Silva Mann - UFS (Orientadora), Valdinete Vieira Nunes - UFS (Coorientadora).

ABSTRACT

VIEIRA, Matheus Emannuel Oliveira. **Seed treatment with beneficial microorganisms: seedling vigor and physiological responses.** São Cristóvão: UFS, 2026. 110p. (Thesis – Doctorate in Agriculture and Biodiversity).*

Modern agriculture requires technologies capable of enhancing the productive efficiency and sustainability of agricultural systems while reducing reliance on chemical inputs. In this context, the use of beneficial microorganisms for seed treatment represents a promising strategy to directly influence germination, vigor, and early plant establishment. This thesis integrates studies on bio-inputs, bacteria, osmoprotective solutions, the isolation and characterization of the biotechnological potential of mixed microbial cultures, and the induction of systemic resistance, with an emphasis on utilizing microbial resources and developing technologies applicable to regional agricultural conditions. Chapter 1 details the development of a technological solution for treating stored soybean seeds, combining microorganisms with an osmoprotective matrix to improve seedling vigor. Various imbibition periods and microbial treatments were tested, revealing that the response depends on the formulation's composition and application conditions. The treatment promoted early growth characteristics and vigor in soybean seedlings, highlighting the potential for developing formulations for biological seed treatment. Chapter 2 evaluates the biopriming of maize seeds with *Bacillus amyloliquefaciens*, assessing germination, seedling morphology, and the activity of antioxidant enzymes—specifically superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and catalase. While germination rates remained unchanged, exposure time proved crucial for seedling vigor, growth, and antioxidant metabolism. A four-hour exposure yielded positive responses, whereas six hours of exposure was associated with reduced vigor and increased ascorbate peroxidase activity, reflecting a higher antioxidant demand. These chapters demonstrate that contact time is a decisive variable; appropriate durations foster balanced physiological responses, whereas prolonged exposure can alter metabolism and compromise vigor. In Chapter 3, mixed microbial cultures were screened, and their biotechnological potential was evaluated regarding inorganic phosphorus solubilization, *in vitro* antagonism against the fungus *Macrophomina phaseolina*, and germination in bean and soybean crops. In Chapter 4, a systematic review gathered evidence on systemic resistance induced by beneficial microorganisms. *Trichoderma*, *Bacillus*, and *Pseudomonas* stood out as key genera involved in activating plant defenses, a process mediated by genes, proteins, enzymes, reactive oxygen species, and hormonal pathways linked to jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene. Collectively, these studies provide insights into the efficiency of bio-inputs and highlight how performance depends on the interplay between the microorganism, formulation, plant species, application timing, and environmental conditions. Overall, the results reinforce the potential of the evaluated bio-inputs but also demonstrate the need for further research into stability, compatibility, microbial survival, and agronomic validation across different production conditions.

Keywords: biological inputs, seed treatment, *Bacillus amyloliquefaciens*, physiological conditioning, seedling vigor, antioxidant metabolism.

---

* Guidance Committee: Renata Silva Mann (Advisor), Valdinete Vieira Nunes (Adjunct advisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

A região do SEALBA, cuja sigla corresponde às iniciais dos estados de Sergipe, Alagoas e Bahia, está localizada no Nordeste brasileiro e vem se consolidando como um importante fronteira agrícola do país. Nos últimos anos, a região tem ganhado destaque no agronegócio nacional em razão dos elevados níveis de produtividade, da expansão das áreas cultivadas e do aumento de sua participação na produção de *commodities* agrícolas.

A região tem passado por uma transição dinâmica entre sistemas agrícolas tradicionais e sistemas de alta tecnologia, tendo o milho como principal cultura. Essa cultura alcança elevados níveis de produtividade em razão da adoção de insumos tecnológicos e do regime de chuvas favorável. A expansão dos sistemas tecnificados de produção de milho tem atraído investimentos e ampliado a demanda por soluções biotecnológicas adaptadas às condições regionais. Paralelamente, a importância social e alimentar do feijão evidencia a necessidade de tecnologias acessíveis e adequadas aos sistemas de produção da agricultura familiar.

Nesse cenário, os bioinsumos constituem ferramentas promissoras para aumentar a eficiência produtiva e reduzir os impactos ambientais associados aos sistemas agrícolas. Apesar da expansão de seu uso, ainda são escassos os produtos formulados e validados especificamente para as condições edafoclimáticas do SEALBA. Torna-se, portanto, necessário desenvolver e avaliar novos bioinsumos, bem como validar produtos comerciais já disponíveis, com vistas à sua integração às cadeias produtivas regionais.

Para essa finalidade, torna-se indispensável buscar microrganismos benéficos oriundos da própria região, potencialmente mais adaptados às condições edafoclimáticas locais. As pressões de seleção natural a que esses microrganismos estão submetidos podem favorecer características que proporcionem aos isolados melhores desempenhos como ingredientes ativos de bioinsumos, em comparação com cepas comerciais exógenas. Adicionalmente, a prospecção e a caracterização desses microrganismos constituem estratégias para valorizar a agrobiodiversidade dos ecossistemas nativos e das comunidades tradicionais dos quais foram obtidos, contribuindo para a conservação desses recursos genéticos por meio de seu uso sustentável.

Paralelamente à prospecção de novos isolados, são necessárias a validação agronômica desses insumos biológicos e a compreensão de seus efeitos fisiológicos em etapas críticas do ciclo de cultivo, como o tratamento de sementes. Embora o tratamento de sementes *on-farm* com bioprodutos já seja uma realidade nas propriedades agrícolas, ainda são escassos os parâmetros técnicos que definem os métodos de aplicação e as doses mais adequados. Essa lacuna de conhecimento dificulta a compreensão dos efeitos dessas formulações sobre o metabolismo, a germinação das sementes e o vigor inicial das plântulas.

Nesse contexto, busca-se compreender como esses bioprodutos influenciam a capacidade das plantas de responder a estresses bióticos, especialmente às doenças causadas por patógenos. Ao longo da evolução, plantas e microrganismos estabeleceram relações mediadas por complexas redes de sinalização química e genética, entre as quais se destacam as interações mutualísticas. A identificação dos mecanismos moleculares, fisiológicos e genéticos envolvidos na interação entre plantas e microrganismos benéficos e na indução de resistência a patógenos representa um importante perspectiva biotecnológica para o desenvolvimento de bioinsumos de alto desempenho.

Diante disso, esta tese teve como objetivo geral desenvolver e avaliar estratégias biotecnológicas baseadas no uso de microrganismos benéficos, formulações osmoprotetoras e culturas microbianas mistas no tratamento de sementes, investigando seus efeitos sobre o vigor e as respostas fisiológicas das plântulas, bem como sobre a indução de resistência sistêmica nas plantas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biotecnologia microbiana e interações entre plantas e microrganismos

As plantas evoluíram em contato contínuo com comunidades microbianas presentes no solo, na rizosfera, na superfície dos tecidos e no interior dos órgãos vegetais. Essas interações interespecíficas compreendem relações prejudiciais, como o parasitismo e a patogenicidade, além de associações neutras ou benéficas. Entre os microrganismos de interesse agrícola, destacam-se as bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCP), que podem favorecer o desenvolvimento vegetal por meio de mecanismos cujos efeitos variam conforme a espécie e a estirpe microbianas, a espécie vegetal e as condições ambientais (Shaposhnikov *et al*., 2023; Wang *et al*., 2022).

As BPCP são encontradas em associação com diferentes espécies vegetais, tecidos e ambientes, o que amplia as possibilidades de sua utilização nos sistemas agrícolas. Seus efeitos podem resultar de mecanismos diretos, relacionados à nutrição e à regulação do crescimento vegetal, ou indiretos, associados à redução da incidência de doenças, à competição com organismos prejudiciais e à ativação de respostas de defesa. Entre as funções mais investigadas estão a fixação biológica de nitrogênio, a solubilização de fosfatos e de outros nutrientes, a produção de sideróforos e de compostos semelhantes a fitormônios, a atividade da enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminase e a indução de resistência sistêmica contra fitopatógenos e pragas (Chaluvadi & Bennetzen, 2018; Kudoyarova et al., 2019; Jalal et al., 2023)

Entretanto, a resposta da planta não deve ser atribuída a determinado mecanismo apenas por este ter sido descrito em outra estirpe ou espécie bacteriana. A expressão das características funcionais depende das condições de cultivo, da disponibilidade de nutrientes, das interações entre os componentes da formulação e da capacidade de estabelecimento do microrganismo (Escalas *et al*., 2019). Portanto, estudos voltados à aplicação agrícola devem integrar a caracterização funcional dos isolados, a avaliação da compatibilidade entre os componentes das formulações e a validação de seus efeitos sobre as plantas.

2.2 Bioprospecção microbiana e potencial dos ambientes do SEALBA

A bioprospecção microbiana compreende a busca, o isolamento, a identificação e a caracterização de microrganismos com características de interesse para a agricultura. Esse processo tem se intensificado diante da necessidade de desenvolver bioinsumos adaptados a diferentes culturas, condições ambientais e sistemas de produção. Comunidades microbianas associadas a plantas nativas, variedades crioulas e ambientes sujeitos a condições específicas de solo e clima podem desempenhar funções ecológicas com potencial de aplicação nos agroecossistemas (Rangel; Leveau, 2024; Timmusk *et al*., 2023).

A coexistência de sistemas de produção familiares, cultivos tradicionais e áreas agrícolas tecnificadas na região do SEALBA cria oportunidades para a prospecção de microrganismos associados a culturas de interesse regional, frutos nativos e materiais vegetais conservados pelos agricultores. Esses ambientes podem constituir fontes estratégicas de bactérias com potencial para promover o crescimento vegetal, mobilizar nutrientes e suprimir fitopatógenos.

A origem regional do isolado, contudo, não garante desempenho superior, e sua possível adaptação às condições edafoclimáticas locais deve ser confirmada por ensaios realizados em laboratório, casa de vegetação e campo. A bioprospecção deve, portanto, ser acompanhada por etapas de seleção funcional, caracterização molecular, avaliação da segurança, análise da estabilidade e definição de formas adequadas de aplicação (Díaz-Rodríguez *et al*., 2025; Parnell *et al*., 2016). Essa sequência permite transformar a diversidade microbiana em conhecimento e em tecnologias agrícolas com potencial de aplicação prática.

2.3 Promoção do crescimento vegetal e atividade antagônica *in vitro* de culturas bacterianas mistas contra fitopatógenos

2.3.1 Mecanismos diretos e indiretos de promoção do crescimento

A promoção do crescimento vegetal resulta de um conjunto de processos que podem ocorrer simultaneamente. A solubilização de fosfatos e a disponibilização de outros nutrientes aumentam a fração disponível para absorção pelas raízes, enquanto a produção de sideróforos altera a dinâmica do ferro no ambiente. A síntese de compostos com atividade semelhante à das auxinas e de outros reguladores do crescimento pode influenciar a formação de raízes laterais, o alongamento dos tecidos e a exploração do solo. A enzima ACC desaminase, por sua vez, pode contribuir para a modulação dos níveis de etileno em situações de estresse, favorecendo a tolerância das plantas a estresses bióticos e abióticos (Jing; Strader, 2019; Pradhan *et al*., 2025; Shahid *et al*., 2023). Esses mecanismos ajudam a explicar o potencial das BPCP, mas a contribuição de cada um deve ser demonstrada no sistema estudado.

Os efeitos dos microrganismos sobre a nutrição, o crescimento e a arquitetura das plantas podem decorrer tanto de ações diretas na rizosfera, como a mobilização de nutrientes e a produção de compostos bioativos, quanto da modulação da expressão gênica, do metabolismo e da sinalização hormonal do hospedeiro (Adedayo *et al*., 2022; Du *et al*., 2024). Essas respostas podem favorecer a adaptação das plantas a restrições hídricas, nutricionais e térmicas. A ampla diversidade funcional dos microrganismos desperta o interesse pela bioprospecção e pela combinação de isolados, mas exige critérios que permitam distinguir interações funcionais da simples coexistência entre os microrganismos.

2.3.2 Controle biológico e o patógeno *Macrophomina phaseolina*

As doenças fúngicas estão entre as principais causas de perdas na agricultura (Esse; Van Reuber; Van Der Does, 2020; Lehner *et al*., 2017). *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. é um fungo cosmopolita associado à ocorrência de podridões do caule e das raízes em culturas como feijão, soja e amendoim, cuja severidade pode aumentar sob temperaturas elevadas e condições de déficit hídrico. A produção de microescleródios, estruturas de resistência capazes de permanecer no solo e nos restos culturais por longos períodos, dificulta o manejo do patógeno (Marquez *et al*., 2021).

O controle químico e o uso de cultivares menos suscetíveis podem reduzir a incidência das doenças, mas apresentam limitações. A eficiência dos fungicidas depende do ingrediente ativo, da dose utilizada, da sensibilidade do isolado e do momento da aplicação. Além disso, o uso repetido de produtos com o mesmo modo de ação pode favorecer a seleção de populações resistentes (Kundargi *et al*., 2023). A disponibilidade de cultivares com resistência completa a *M. phaseolina* também permanece limitada, reforçando a necessidade da adoção de estratégias integradas de manejo (Indraja *et al*., 2023; Sodji *et al*., 2025).

Nesse contexto, o controle biológico apresenta potencial para reduzir os impactos ambientais e integrar programas de manejo de doenças (Prajapati *et al*., 2020). Essa estratégia caracteriza-se pela utilização de organismos vivos ou de seus produtos para reduzir as populações de pragas e patógenos (Moazami, 2011; Simberloff; Stiling, 1998). Diversos estudos têm buscado identificar microrganismos antagonistas com potencial para uso como bioinsumos, cujos mecanismos de ação incluem a competição por espaço e nutrientes, a produção de substâncias antimicrobianas, o parasitismo, a degradação de estruturas do patógeno e a indução de mecanismos de defesa nas plantas (Rajini *et al*., 2020; Schmoock; Linsler; Potthoff, 2018). Entre os grupos mais estudados estão as bactérias pertencentes ao complexo *Bacillus sensu lato* (Thambugala *et al*., 2020).

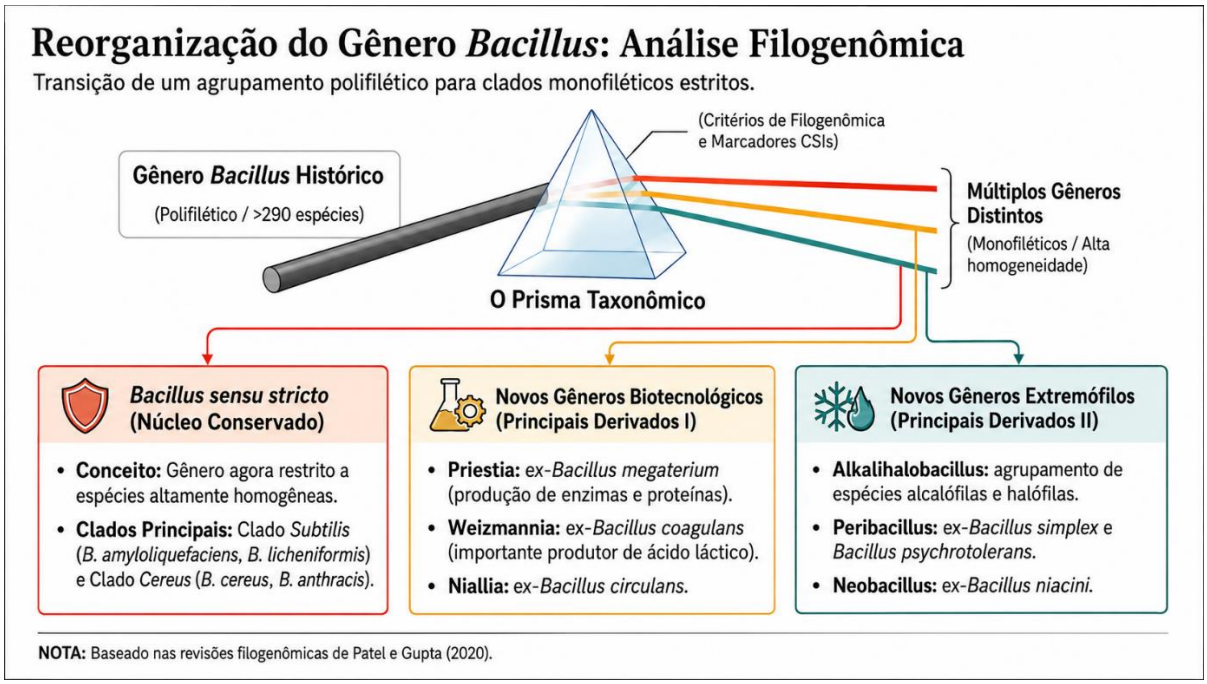
2.4 *Bacillus sensu lato* e *Priestia* como agentes de interesse agrícola

2.4.1 Reorganização taxonômica e diversidade funcional

As bactérias historicamente agrupadas no gênero *Bacillus* são, em geral, Gram-positivas, apresentam morfologia bacilar e estão amplamente distribuídas nos ecossistemas

terrestres (Fira *et al*., 2018). Durante muitos anos, microrganismos com essas características e capazes de produzir endósporos em condições aeróbias foram reunidos em um táxon amplo e heterogêneo. O avanço do sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossômico *16S*, da filogenômica e da análise comparativa de marcadores moleculares permitiu reconhecer diferentes linhagens evolutivas e levou à proposição de novos gêneros, como *Priestia* e *Weizmannia*, resultantes da reorganização taxonômica do antigo gênero *Bacillus* (Bhandari *et al*., 2013; Gupta *et al*., 2020; Rao *et al*., 2023) (Figura 1).

Figura 2 - Reorganização filogenômica do gênero *Bacillus* e formação de novos gêneros.



Fonte: Elaborada pelo autor com base em Patel e Gupta (2020), com auxílio da ferramenta de inteligência artificial generativa NotebookLM, do Google, para criação e edição gráfica da imagem (2026). O conteúdo científico, a terminologia taxonômica e a versão final foram revisadas e validadas pelo autor.

A reorganização taxonômica do gênero *Bacillus*, fundamentada em análises filogenômicas e genômicas comparativas, não reduz a importância agrícola dos microrganismos anteriormente incluídos nesse grupo, mas evidencia a necessidade de maior precisão na identificação das espécies e estirpes utilizadas. Estudos genômicos demonstraram que o antigo gênero reunia linhagens evolutivamente distintas, o que levou à delimitação de novos gêneros e à restrição de *Bacillus sensu stricto*, principalmente, aos clados *B. subtilis* e *B. cereus* (Gupta *et al*., 2020). Além dessa diversidade taxonômica, existem diferenças funcionais relevantes entre espécies e até mesmo entre estirpes da mesma espécie. Essas diferenças envolvem a composição dos agrupamentos gênicos relacionados à biossíntese de metabólitos especializados, a capacidade de promover o crescimento vegetal, a atividade antagônica contra fitopatógenos e a adaptação a diferentes nichos ecológicos (Mullins *et al*., 2020).

A capacidade de colonizar as raízes e a eficiência agronômica também dependem da estirpe e das condições de interação com a planta e, portanto, não podem ser previstas exclusivamente com base na identificação do gênero ou em características funcionais detectadas em ensaios *in vitro* (Mendis *et al*., 2018; Li *et al*., 2018). Assim, a identificação em nível de espécie e, sempre que possível, de estirpe é essencial para interpretar adequadamente os resultados, assegurar a rastreabilidade dos bioinsumos e evitar generalizações entre organismos filogeneticamente próximos, mas funcionalmente distintos.

2.4.2 Potencial biotecnológico de *Bacillus* sp.

As bactérias pertencentes ao clado de *Bacillus* apresentam elevado potencial biotecnológico, especialmente por sua capacidade de promover o crescimento vegetal e atuar como agentes de controle biológico. Entre as características funcionais relatadas estão a solubilização e a disponibilização de nutrientes, a produção de compostos relacionados à regulação do crescimento vegetal, como as auxinas, a síntese de enzimas e a capacidade de colonizar a rizosfera (Blake; Christensen; Kovacs, 2021; Dame; Rahman; Islam, 2021; Miljaković *et al*., 2022).

Espécies como *Bacillus amyloliquefaciens* (ex Fukumoto 1943) Priest *et al.* 1987 são utilizadas na formulação de produtos agrícolas por apresentarem características relacionadas à estabilidade, à produção de metabólitos e à interação com as raízes. Estirpes desse grupo podem competir por espaço e nutrientes, produzir lipopeptídeos, enzimas líticas e outros compostos antimicrobianos, além de contribuir para a indução de resistência sistêmica nas plantas (Bordé-Pavlicz *et al*., 2024; Dame; Rahman; Islam, 2021; Saadaoui *et al*., 2022). Entretanto, a intensidade com que esses mecanismos se manifestam depende da estirpe e das condições de aplicação.

Um dos principais fatores que favorecem a ampla utilização agrícola de bactérias do gênero *Bacillus* é sua capacidade de formar endósporos (Mohsin *et al*., 2021; Nandana; Anith, 2025). Durante a esporulação, formam-se estruturas metabolicamente dormentes, constituídas por camadas protetoras que envolvem o material genético e aumentam sua tolerância à dessecação, às variações de temperatura e a outras condições desfavoráveis (Biermann *et al*., 2023; McKenney; Driks; Eichenberger, 2013). Quando as condições ambientais se tornam novamente favoráveis, os endósporos podem germinar e dar origem a células vegetativas (Beskrovnaya *et al*., 2021; Checinska; Paszczynski; Burbank, 2015). Do ponto de vista industrial, essa propriedade favorece a estabilidade do inóculo, a sobrevivência durante os processos de formulação e secagem e o prolongamento da vida útil dos produtos.

2.4.3 Potencial biotecnológico de *Priestia* sp.

Priestia é um dos gêneros resultantes da reorganização taxonômica de *Bacillus sensu lato* e inclui espécies de interesse biotecnológico, como *Priestia megaterium* e *P. aryabhattai* (Gupta *et al*., 2020). Estirpes pertencentes a esse gênero têm sido investigadas por sua capacidade de produzir sideróforos, solubilizar nutrientes, apresentar atividade da enzima ACC desaminase e modificar a arquitetura radicular. Essas características podem contribuir para aumentar a tolerância das plantas a estresses hídricos e nutricionais e para manter o crescimento sob condições desfavoráveis (Almirón *et al*., 2025; Djalolova *et al*., 2024; Phringpaen *et al*., 2023).

O uso de *P. aryabhattai* em formulações agrícolas requer a avaliação específica da estirpe, de sua viabilidade no produto, da compatibilidade com outros microrganismos e da capacidade de estabelecimento após a aplicação. Quando essa espécie é utilizada em combinações bacterianas, sua contribuição não deve ser inferida apenas com base em sua presença na formulação. É necessário comparar os efeitos dos componentes isolados e combinados para identificar possíveis interações complementares, neutras ou antagônicas.

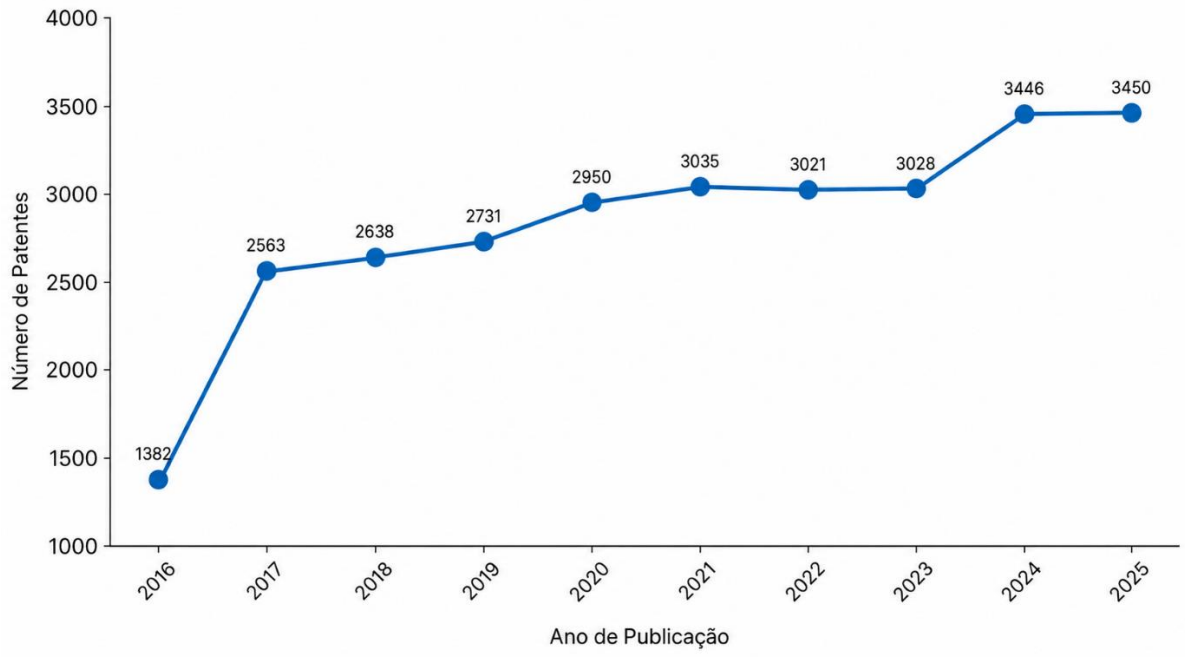
2.5 Bioinsumos agrícolas: conceito, expansão e desenvolvimento tecnológico

Os bioinsumos compreendem produtos, processos ou tecnologias de origem biológica destinados ao uso na produção agrícola. Nos produtos biológicos, o componente ativo pode ser constituído pelo próprio organismo vivo, como ocorre nos inoculantes microbianos, ou por metabólitos e outras substâncias dele derivados (Hett *et al*., 2022; Osorio-Reyes *et al*., 2023; Chowdhury *et al*., 2020). Essa categoria abrange soluções destinadas à promoção do crescimento vegetal, à nutrição, ao controle biológico, à mitigação de estresses e a outras finalidades agrícolas.

O uso de produtos biológicos aumentou nas últimas décadas em diferentes cadeias produtivas, impulsionado pela busca por maior eficiência no uso de insumos, redução dos impactos ambientais e desenvolvimento de tecnologias compatíveis com sistemas de produção mais sustentáveis. No Brasil, a instituição do Programa Nacional de Bioinsumos (PNB) representou um marco para o setor, ao estabelecer diretrizes voltadas à ampliação da adoção de produtos biológicos e ao incentivo à pesquisa, ao desenvolvimento e à inovação nessa área (BRASIL, 2020).

No levantamento de patentes realizado nesta tese, verificou-se um aumento de 150% no número de documentos relacionados a bioinsumos entre 2016 e 2025. O número de documentos cresceu até 2021, manteve-se relativamente estável entre 2021 e 2023 e voltou a aumentar em 2024. No período analisado, foram identificados 17.632 documentos nos Estados Unidos, 11.992 na China e 5.360 no Brasil. Esses resultados indicam a expansão tecnológica do setor, mas devem ser interpretados considerando-se as diferenças entre as bases consultadas, as estratégias de busca, o agrupamento dos documentos em famílias de patentes e as respectivas datas de publicação.

Figura 3 - Evolução temporal de depósitos de patentes em bioinsumos entre 2016 e 2025.



Fonte: Elaborada pelo autor (2026), com dados extraídos de Lens.org.

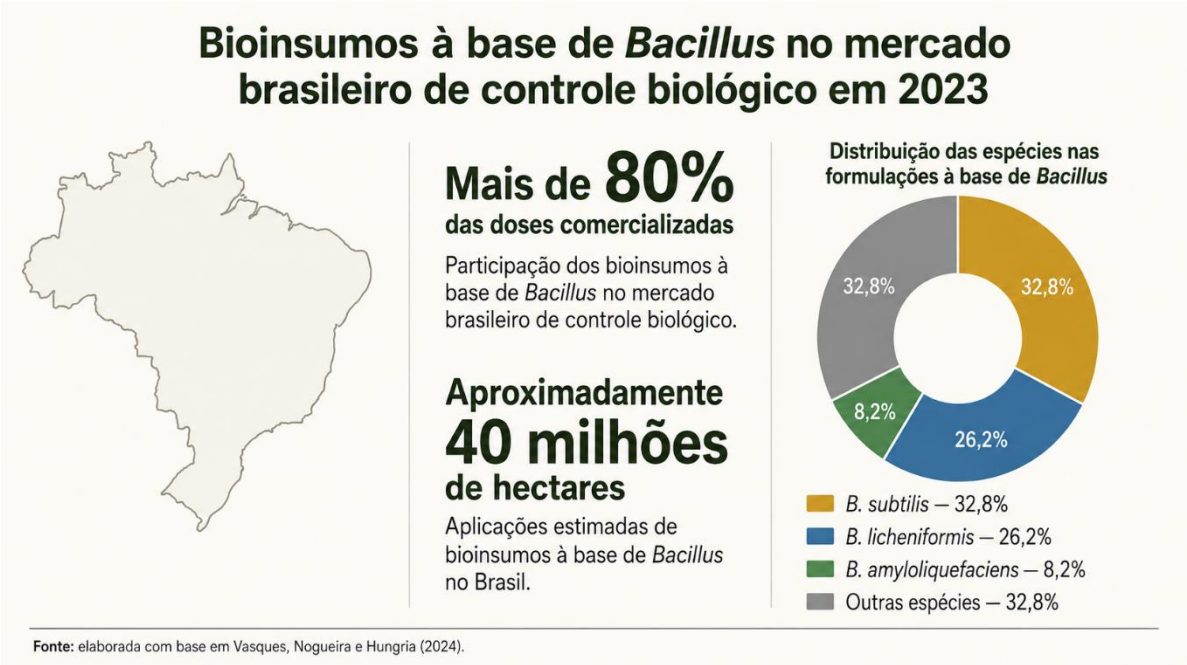
2.5.1 Microrganismos em bioinsumos e presença comercial de *Bacillus*

Os microrganismos estão entre os principais componentes ativos utilizados na formulação de bioinsumos. Sua versatilidade metabólica, capacidade de adaptação e diversidade funcional possibilitam a exploração de diferentes mecanismos nos agroecossistemas (Liang *et al*., 2024). Entre os microrganismos empregados, destacam-se as espécies pertencentes ao clado *Bacillus subtilis*, amplamente investigadas e utilizadas em produtos comerciais (Maitra *et al*., 2021; da Silva *et al*., 2026).

Dados compilados sobre o mercado brasileiro indicam uma participação expressiva de produtos formulados com bactérias do gênero *Bacillus*, bem como uma ampla área agrícola tratada com tecnologias baseadas nesse grupo (Vasques; Nogueira; Hungria, 2024). Essa relevância comercial está relacionada à estabilidade dos endósporos, ao conhecimento acumulado sobre a produção em larga escala e à diversidade de aplicações. Entretanto, a

participação no mercado não implica, por si só, eficiência agronômica equivalente em todas as culturas e condições de uso (Figura 3).

Figura 4 - Frequência relativa das modalidades de aplicação de bioestimulantes em estudos agrícolas.



Fonte: Elaborada pelo autor com base nos dados compilados por Vasques, Nogueira e Hungria (2024), com auxílio da ferramenta de inteligência artificial generativa NotebookLM, do Google, para a criação e a edição gráfica da imagem (2026). O conteúdo científico e a versão final da figura foram revisados e validados pelo autor.

2.5.2 Formulações, viabilidade e combinação bacteriana

A eficácia de um bioinsumo depende das condições ambientais, da espécie e da estirpe microbianas, da densidade do inóculo, da composição da formulação, das condições de armazenamento e do método de aplicação (Tabacchioni *et al*., 2021). A formulação deve preservar a viabilidade celular e minimizar os estresses aos quais os microrganismos são submetidos durante sua aplicação nas plantas, no solo ou nas sementes. A redução prematura da população microbiana pode comprometer a eficiência agronômica, mesmo quando a formulação contém isolados com elevado potencial funcional (Ambrosini *et al*., 2016; Timmusk *et al*., 2017).

A combinação de microrganismos com funções complementares ou sua associação com extratos vegetais pode ampliar o espectro funcional da formulação e aumentar a consistência de seu desempenho sob diferentes condições de campo (Ansari; Ahmad, 2019; Da Silva *et al*., 2022; Devi *et al*., 2018). Entretanto, a presença de múltiplos componentes não comprova, por si só, a ocorrência de sinergismo, uma vez que as interações podem ser compatíveis, neutras, competitivas ou antagônicas. Portanto, antes de atribuir vantagens à combinação microbiana, é necessário avaliar o crescimento dos microrganismos isoladamente e em cocultivo, a estabilidade de suas populações, a compatibilidade com os excipientes e os efeitos individuais e combinados de cada componente.

As formulações multicomponentes podem reunir microrganismos, agentes osmoprotetores e compostos naturais em uma única tecnologia. Essa abordagem amplia as possibilidades de ação, mas também aumenta a complexidade da formulação e da interpretação de seus efeitos. A escolha dos componentes e de suas respectivas concentrações, assim como a definição do pH, do potencial hídrico, do tempo de contato e das condições de secagem, deve ser realizada de maneira integrada. Desse modo, a inovação em bioinsumos depende tanto da seleção dos componentes biológicos quanto do desenvolvimento de métodos de inoculação que

preservem a viabilidade dos microrganismos e favoreçam sua interação com as plantas (Chatterjee *et al*., 2018).

2.6 Tratamento biológico de sementes

A germinação das sementes e o estabelecimento inicial das plântulas constituem etapas críticas do ciclo das culturas, pois influenciam a uniformidade do estande e o aproveitamento dos recursos disponíveis (Godfray; Mason-D'Croz; Robinson, 2016). Nessa fase, os tecidos apresentam intensa atividade metabólica e maior vulnerabilidade a estresses bióticos e abióticos. Sementes de menor vigor podem germinar mais lentamente, originar uma proporção maior de plântulas anormais e apresentar menor capacidade de estabelecimento, mesmo quando a porcentagem final de germinação é considerada aceitável.

Durante o armazenamento, a qualidade fisiológica das sementes pode ser reduzida pela interação entre o teor de água, a temperatura, a umidade relativa do ar, a qualidade inicial e as condições sanitárias do lote e a duração do período de armazenamento. Alterações nas membranas celulares, nos sistemas enzimáticos e no metabolismo energético podem reduzir o vigor antes que a perda de viabilidade se torne evidente (da Silva *et al*., 2022). Portanto, o tratamento não deve ser compreendido como uma forma de recuperar sementes inviáveis ou reverter sua deterioração, mas como uma estratégia para favorecer a expressão do potencial fisiológico remanescente dos lotes prejudicados pelo armazenamento inadequado.

O tratamento de sementes constitui uma forma localizada de aplicação de agentes químicos, nutrientes, reguladores de crescimento ou microrganismos benéficos. Quando a formulação e o método de aplicação são adequados, o tratamento pode proteger as sementes, facilitar o estabelecimento dos microrganismos na rizosfera e favorecer o desenvolvimento inicial das plântulas. Entretanto, seus efeitos dependem da compatibilidade entre o produto e as sementes, da qualidade fisiológica do lote e das condições de germinação e cultivo (Ma, 2019; Sabirov *et al*., 2019; Singh *et al*., 2020).

O tratamento de sementes *on-farm* com bioinsumos tem se expandido por permitir a adequação do procedimento às condições da propriedade e do sistema de produção (Cardarelli *et al*., 2022; Malik *et al*., 2020). Essa flexibilidade, contudo, aumenta a necessidade de padronização do processo. Fatores como o volume de calda, a concentração do inóculo, a qualidade da água, a temperatura, a aeração, a homogeneização, o tempo de contato e as condições de secagem podem interferir tanto na sobrevivência dos microrganismos quanto na resposta fisiológica das sementes.

Quando mal-conduzido, o tratamento pode causar hidratação excessiva, danos por embebição, restrição da disponibilidade de oxigênio, fitotoxicidade ou comprometimento da integridade dos tecidos, com efeitos negativos sobre a germinação e o vigor (Malik *et al*., 2020; Milon *et al*., 2022; Reis; Carvalho; Khanday, 2026). O tempo de contato constitui uma variável determinante: exposições muito curtas podem ser insuficientes para promover a hidratação e a interação com o inóculo, enquanto períodos prolongados podem acelerar excessivamente o metabolismo, aumentar o consumo de reservas e intensificar o estresse sobre as sementes.

A utilização de sistemas aerados durante a imersão pode reduzir as limitações na disponibilidade de oxigênio e favorecer a homogeneidade da suspensão. Entretanto, a aeração não elimina a necessidade de definir o período de imersão adequado para cada cultura, lote de sementes e formulação. Protocolos estabelecidos para determinada espécie ou produto não devem ser aplicados diretamente a outros materiais sem validação experimental prévia.

2.6.1 Biocondicionamento e osmocondicionamento

O *biopriming*, ou biocondicionamento, associa a hidratação controlada das sementes à aplicação de microrganismos benéficos. Essa técnica é considerada promissora por possibilitar a ativação parcial do metabolismo das sementes, sem a protrusão da raiz primária, e favorecer o contato inicial entre os microrganismos e os tecidos antes da semeadura (Chakraborti *et al*., 2022). Nos procedimentos realizados por imersão, as sementes são colocadas em contato com

uma suspensão microbiana e homogeneizadas. Após o período estabelecido, podem ser submetidas à secagem superficial ou controlada (Aizaz *et al.*, 2023; Das *et al*., 2023). Essa abordagem constitui uma via de introdução de microrganismos benéficos nos sistemas agrícolas (Ma, 2019b).

O *osmopriming* consiste na embebição das sementes em soluções com potencial osmótico controlado. Essa restrição à absorção de água permite a ocorrência das etapas iniciais da germinação sem que haja a protrusão da raiz primária, desde que o potencial osmótico e o período de condicionamento sejam adequadamente definidos (Lemmens *et al*., 2019). O procedimento pode favorecer a reorganização das membranas, a ativação enzimática e a retomada coordenada do metabolismo. Entretanto, seus efeitos dependem da espécie, da qualidade fisiológica do lote, da temperatura, da duração do tratamento e do potencial osmótico empregado (Ramalho et al., 2020; Ferreira et al., 2021)

A associação entre *biopriming* e *osmopriming* constitui uma estratégia que combina a hidratação controlada das sementes com a inoculação de microrganismos benéficos. Nesse processo, o agente osmótico, o microrganismo e os demais componentes da formulação devem ser compatíveis durante o tratamento. A integração dessas técnicas apresenta potencial para o desenvolvimento de bioinsumos, mas requer a avaliação do equilíbrio entre a ativação fisiológica das sementes, a sobrevivência dos microrganismos e a preservação do vigor.

O polietilenoglicol com massa molar média de 6.000 g mol^{-1} (PEG 6000) é utilizado no condicionamento osmótico de sementes por reduzir o potencial hídrico da solução e limitar a velocidade de absorção de água. Em razão de seu elevado tamanho molecular, sua penetração nos tecidos das sementes é limitada, possibilitando o controle da hidratação sem a ocorrência dos efeitos iônicos associados a determinados sais utilizados como agentes osmótico (Yousefi et al., 2020; Wang et al., 2023).

Embora o PEG possibilite maior controle da embebição, seus efeitos não são uniformes. Potenciais osmóticos excessivamente negativos podem limitar a ativação metabólica esperada, enquanto exposições prolongadas podem intensificar o estresse osmótico. Portanto, a definição do período de tratamento é tão importante quanto a escolha do potencial osmótico. Em lotes de menor vigor, o intervalo entre uma resposta favorável e um efeito prejudicial pode ser mais estreito (Lutts *et al*., 2016; Spadeto *et al*., 2018).

Os extratos de própolis contêm compostos fenólicos e flavonoides cuja composição varia conforme a origem botânica e geográfica da matéria-prima e o método de extração empregado. Atividades antioxidante e antimicrobiana desses extratos têm sido descritas em diferentes sistemas biológicos (Tiveron et al., 2016; Xu et al., 2022). Sua inclusão em formulações destinadas ao tratamento de sementes pode ampliar as propriedades funcionais do produto. Entretanto, seus efeitos devem ser avaliados especificamente nas sementes e nas concentrações de interesse, não podendo ser inferidos diretamente de estudos conduzidos com outros organismos ou condições experimentais.

Em formulações que associam PEG, própolis e microrganismos, cada componente pode influenciar a estabilidade e a atividade dos demais. A própolis pode modificar o ambiente químico da solução, o PEG altera a disponibilidade de água e a combinação bacteriana depende da manutenção da viabilidade e da compatibilidade entre os microrganismos durante o tratamento. Na ausência de tratamentos que avaliem os componentes isoladamente e em diferentes combinações, é possível determinar o desempenho da formulação completa, mas não atribuir os efeitos individuais ao PEG, à própolis ou às bactérias, tampouco afirmar a ocorrência de sinergismo.

2.7 Respostas fisiológicas e bioquímicas ao tratamento de sementes

A absorção de água pelas sementes desencadeia a reorganização das membranas celulares, a retomada da atividade respiratória, a mobilização das reservas e a síntese de moléculas necessárias à germinação. A velocidade desses processos depende da estrutura da semente, da temperatura, da disponibilidade de água e da condição fisiológica do lote. Em

sementes deterioradas, a reidratação rápida pode intensificar a liberação de solutos e evidenciar danos acumulados durante o armazenamento (Burgass; Powell, 1984; Rezaei; Buitink; Hay, 2024).

O tempo de imersão determina o grau de avanço do metabolismo antes da retirada das sementes da solução. Períodos intermediários podem permitir a ativação de processos favoráveis ao estabelecimento das plântulas, enquanto exposições excessivamente prolongadas podem aumentar o consumo de reservas, restringir a disponibilidade de oxigênio e alterar o equilíbrio oxidativo. A resposta ao tratamento deve ser avaliada não apenas pela porcentagem final de germinação, mas também pela proporção de plântulas normais, pela uniformidade do processo germinativo e pelo crescimento dos diferentes órgãos das plântulas (Almeida *et al*., 2024; Salleh; Pa'Ee, 2021).

Durante a embebição e a retomada do metabolismo, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Em concentrações controladas, essas moléculas atuam na sinalização celular e na regulação de processos relacionados à germinação. Entretanto, quando produzidas em excesso ou eliminadas de forma insuficiente pelos sistemas antioxidantes, podem causar peroxidação lipídica, alterações em proteínas, inativação de enzimas e danos aos ácidos nucleicos (Juan *et al*., 2021; Murphy *et al*., 2022).

O tratamento de sementes pode produzir efeitos distintos sobre o equilíbrio oxidativo. Quando aplicado em condições adequadas, pode favorecer a regulação da resposta antioxidante; entretanto, uma formulação incompatível ou um período de exposição inadequado pode atuar como fator de estresse e intensificar a produção de EROs (Bałabusta; Szafrańska; Posmyk, 2016; Basit *et al*., 2021; Ellouzi *et al*., 2021). Portanto, o aumento da atividade de uma enzima antioxidante não deve ser interpretado isoladamente como um efeito benéfico, pois também pode indicar maior intensidade de estresse oxidativo.

Entre as enzimas utilizadas na avaliação do metabolismo antioxidante estão a superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1), a L-ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) e a catalase (CAT; EC 1.11.1.6). A SOD catalisa a dismutação do radical superóxido, produzindo peróxido de hidrogênio; a APX utiliza o ascorbato como doador de elétrons para reduzir o peróxido de hidrogênio a água; e a CAT catalisa sua decomposição em água e oxigênio. A avaliação conjunta dessas enzimas fornece informações mais consistentes sobre o equilíbrio oxidativo do que a análise isolada de uma única atividade enzimática. As alterações observadas podem refletir processos de sinalização, aclimatação ou dano oxidativo, dependendo do contexto fisiológico (Adetunji et al., 2021; Cortés et al., 2023; Xing et al., 2025).

Os efeitos observados durante a germinação e o crescimento inicial das plântulas nem sempre se mantêm até a fase reprodutiva. A disponibilidade de nutrientes, o volume de solo explorado pelas raízes, o regime de irrigação, a competição entre plantas, a capacidade de colonização radicular pelos microrganismos e a heterogeneidade ambiental podem modificar ou reduzir as diferenças inicialmente observadas. Portanto, o maior crescimento das plântulas não implica, necessariamente, aumento da produtividade da cultura.

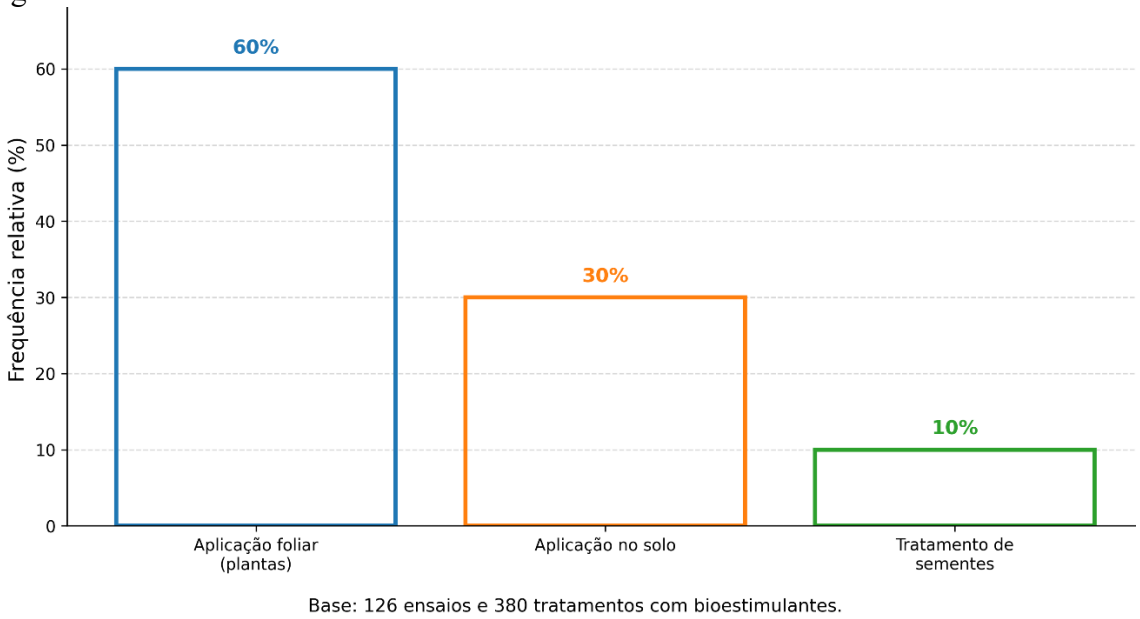
2.8 Uso de bioinsumos no tratamento de sementes

O tratamento de sementes constitui uma via estratégica para a aplicação de bioinsumos, pois permite posicionar os microrganismos na superfície das sementes e, posteriormente, na espermosfera e na rizosfera em formação. Essa proximidade favorece o contato inicial entre o agente biológico e a planta, podendo facilitar a colonização das raízes e reduzir a quantidade de inóculo necessária por unidade de área, em comparação com determinadas formas de aplicação no solo. Além disso, a aplicação via sementes pode ser incorporada às operações de beneficiamento e semeadura, proporcionando maior precisão na distribuição do produto. Apesar dessas vantagens, a transformação de microrganismos promissores em tecnologias eficientes para o tratamento de sementes ainda enfrenta limitações relacionadas à produção do inóculo, à formulação, à aderência às sementes, à uniformidade de distribuição, às condições de armazenamento e à sobrevivência dos microrganismos após a aplicação

Uma das principais lacunas está relacionada à manutenção simultânea da qualidade fisiológica das sementes e da viabilidade dos microrganismos. A semente é uma estrutura viva e metabolicamente sensível, enquanto o bioinsumo pode conter bactérias, fungos, metabólitos, agentes osmóticos, polímeros, adesivos e outros componentes capazes de modificar o ambiente físico e químico ao seu redor. Desse modo, um tratamento que favoreça a sobrevivência microbiana não preservará necessariamente o vigor das sementes. Da mesma forma, condições adequadas à manutenção da qualidade fisiológica podem não assegurar uma população microbiana suficiente até a semeadura. A sobrevivência dos microrganismos durante a secagem e o armazenamento permanece como um dos principais entraves ao desenvolvimento de sementes pré-inoculadas com vida útil compatível com a dinâmica comercial do setor sementeiro (Köhl *et al*., 2025).

Essa complexidade é ainda maior no biocondicionamento, técnica que associa a aplicação de microrganismos benéficos à hidratação controlada das sementes. A hidratação ativa processos metabólicos relacionados à reorganização das membranas celulares, à respiração, à atividade enzimática, à mobilização das reservas e ao início da germinação. Quando conduzido adequadamente, o biocondicionamento pode aumentar a velocidade e a uniformidade da germinação, favorecer o vigor das plântulas e ampliar sua tolerância a determinados estresses. Entretanto, a resposta ao tratamento depende da espécie vegetal, da cultivar, da qualidade inicial do lote, da estirpe microbiana, da concentração do inóculo, do potencial hídrico, da temperatura, da aeração, do tempo de exposição e do procedimento de secagem. Portanto, não existe um protocolo único que possa ser aplicado com segurança a diferentes culturas, lotes e formulações sem validação experimental prévia (Fiodor *et al*., 2023) (Figura 4).

Figura 5 - Frequência relativa das modalidades de aplicação de bioestimulantes em estudos agrícolas.



Fonte: Elaborada pelo autor com base nos dados compilados por Sible, Seebauer e Below (2021), referentes a 126 ensaios e 380 tratamentos com bioestimulantes.

O tempo de contato entre as sementes e o bioinsumo requer atenção especial. Períodos muito curtos podem limitar a adesão dos microrganismos, a hidratação das sementes e a interação entre ambos. Em contrapartida, períodos prolongados podem intensificar a embebição, aumentar o consumo de reservas, antecipar a ativação do metabolismo germinativo, restringir a disponibilidade de oxigênio e alterar o equilíbrio oxidativo. Desse modo, uma porcentagem elevada de germinação não indica, necessariamente, a ausência de efeitos do

tratamento. Alterações mais sutis podem manifestar-se no vigor, na uniformidade da germinação, no crescimento do sistema radicular e da parte aérea, na integridade das membranas celulares e na atividade do sistema antioxidante (Cortés *et al*., 2023).

Os efeitos do tratamento também dependem do microrganismo utilizado. A presença de características funcionais demonstradas em laboratório não assegura que a estirpe seja capaz de sobreviver na formulação, aderir às sementes, competir com a microbiota nativa e colonizar as raízes. Em estudo com bactérias promotoras do crescimento de plantas, apenas parte dos isolados avaliados apresentou efeitos positivos sobre a germinação, evidenciando que os resultados não podem ser generalizados para todas as estirpes de uma mesma espécie ou para diferentes espécies de um mesmo gênero (Fiodor *et al*., 2023).

Essa variabilidade também foi demonstrada em sementes de milho inoculadas com diferentes isolados de *Pseudomonas*. Embora pertencentes ao mesmo gênero bacteriano, as estirpes diferiram quanto à adesão às sementes, à sobrevivência após a inoculação, à colonização das raízes e à resposta à adição de substâncias protetoras. Algumas permaneceram detectáveis nas sementes por vários dias, enquanto outras apresentaram rápida redução populacional. Esses resultados evidenciam que cada candidato a bioinsumo deve ser avaliado individualmente, não sendo adequado pressupor comportamentos semelhantes entre estirpes taxonomicamente próximas durante o tratamento de sementes.

Outro aspecto ainda pouco esclarecido é a interação dos bioinsumos com os demais produtos utilizados no tratamento industrial de sementes ou no tratamento realizado na propriedade. As sementes podem receber, simultaneamente, fungicidas, inseticidas, micronutrientes, polímeros, corantes, agentes protetores e inoculantes biológicos. Essas associações podem alterar o pH, o potencial osmótico, a disponibilidade de água, a adesão do inóculo e a sobrevivência dos microrganismos. A inclusão de polímeros ou adesivos pode favorecer a fixação do inóculo às sementes, mas também restringir as trocas gasosas ou modificar a velocidade de hidratação. Da mesma forma, componentes antimicrobianos presentes em tratamentos químicos ou extratos naturais podem reduzir a população do próprio agente biológico. Portanto, os estudos de compatibilidade devem avaliar não apenas as características da mistura imediatamente após o preparo, mas também a sobrevivência microbiana ao longo do tempo, a qualidade fisiológica das sementes tratadas e o desempenho posterior das plantas (Mustapha *et al*., 2026; Nettles *et al*., 2016).

Também é necessário ampliar a avaliação da uniformidade do recobrimento das sementes. A quantidade média de produto aplicada ao lote não permite determinar se todas as sementes receberam doses semelhantes. Em um mesmo lote, podem ocorrer sementes sem cobertura, com quantidade insuficiente do produto ou com acúmulo excessivo da formulação. Essa heterogeneidade pode resultar em diferenças na população microbiana presente em cada semente, na velocidade de hidratação e na resposta fisiológica (Bradford, 2018). Em estudos com sementes de milho, observou-se que a distribuição das células microbianas sobre a superfície pode ser irregular, reforçando a necessidade de métodos que permitam avaliar individualmente as sementes, e não apenas amostras compostas representativas do lote (Lorch; Valverde; Agaras, 2024).

Um tratamento pode favorecer a germinação ou o crescimento inicial das plântulas sem resultar em aumento da produtividade, pois as diferenças observadas nas fases iniciais podem ser reduzidas ou modificadas ao longo do desenvolvimento das plantas (Karmakar *et al*., 2021; Ma *et al*., 2018; Pandiselvam *et al*., 2020). Portanto, a validação deve abranger diferentes lotes, cultivares, safras, ambientes e condições de manejo, com avaliações que compreendam desde a qualidade inicial das sementes até o estabelecimento do estande, o crescimento, a sanidade e a produtividade da cultura.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEDAYO, A. A.; BABALOLA, O. O.; KAPPO, A. P.; ARORA, K.; LI, W. J.; KOZA, N. A. Microorganisms in plant growth and development: roles in abiotic stress tolerance and

secondary metabolites secretion. *Microorganisms*, v. 10, n. 8, p. 1528, 2022.DOI: https:// 10.3390/microorganisms10081528

ADETUNJI, A. E.; ADETUNJI, T. L.; VARGHESE, B.; SERSHEN; PAMMENTER, N. W. Oxidative Stress, Ageing and Methods of Seed Invigoration: An Overview and Perspectives. *Agronomy* 2021, Vol. 11, Page 2369, v. 11, n. 12, p. 2369, 23 nov. 2021

AIZAZ, M.; AHMAD, W.; ASAF, S.; KHAN, I.; SAAD JAN, S.; SALIM ALAMRI, S.; BILAL, S.; JAN, R.; KIM, K. M.; AL-HARRASI, A. Characterization of the seed biopriming, plant growth-promoting and salinity-ameliorating potential of halophilic fungi isolated from hypersaline habitats. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 5, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms24054904.

ALMEIDA, R. DE S.; ARAÚJO, J. K. P. DE; ARAÚJO, M. P. DE; MOURA, L. B.; GOMES, A. C.; BARBOSA, F. M.; LACERDA, A. V. DE. Biometria de sementes de *Handroanthus impetiginosus* e produção de mudas após diferentes períodos de imersão em água. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 59, p. e03568, 2024.

ALMIRÓN, C.; PETITTI, T. D.; PONSO, M. A.; ROMERO, A. M.; ARECO, V. A.; BIANCO, M. I.; ESPARIZ, M.; YARYURA, P. M. Functional and genomic analyses of plant growth promoting traits in *Priestia aryabhattai* and *Paenibacillus* sp. isolates from tomato rhizosphere. *Scientific Reports*, v. 15, n. 1, art. 3498, 2025. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-025-87390-0.

ALVES, C. P. S. S.; NEGREIROS, A. M. P.; CAVALCANTE, A. L. A.; VIANA, D. M.; OLIVEIRA, S. H. F.; SALES JÚNIOR, R. Efficacy of fungicides for controlling *Macrophomina* spp. in melon plant. *Tropical Plant Pathology*, v. 49, n. 2, p. 218-231, 2024. DOI: https://doi.org/10.1007/S40858-023-00623-3.

AMBROSINI, A.; DE SOUZA, R.; PASSAGLIA, L. M. P. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. *Plant and Soil*, v. 400, n. 1-2, p. 193-207, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/s11104-015-2727-7.

ANSARI, F. A.; AHMAD, I. Fluorescent *Pseudomonas*-FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-019-40864-4.

BAŁABUSTA, M.; SZAFRAŃSKA, K.; POSMYK, M. G. M. Exogenous melatonin improves antioxidant defense in cucumber seeds (*Cucumis sativus* L.) germinated under chilling stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, art. 190957, 2016. DOI: https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00575.

BASIT, F.; CHEN, M.; AHMED, T.; SHAHID, M.; NOMAN, M.; LIU, J.; AN, J.; HASHEM, A.; AL-ARJANI, A. B. F.; ALGARAWI, A. A.; ALSAYED, M. F. S.; ABD-ALLAH, E. F.; HU, J.; GUAN, Y. Seed priming with brassinosteroids alleviates chromium stress in rice cultivars via improving ROS metabolism and antioxidant defense response at biochemical and molecular levels. *Antioxidants*, v. 10, n. 7, art. 1089, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/ANTIOX10071089.

BESKROVNAYA, P.; SEXTON, D. L.; GOLMOHAMMADZADEH, M.; HASHIMI, A.; TOCHEVA, E. I. Structural, Metabolic and Evolutionary Comparison of Bacterial Endospore

and Exospore Formation. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, art. 630573, 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.630573.

BHANDARI, V.; AHMOD, N. Z.; SHAH, H. N.; GUPTA, R. S. Molecular signatures for *Bacillus* species: demarcation of the *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus* clades in molecular terms and proposal to limit the placement of new species into the genus *Bacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 63, n. pt. 7, p. 2712-2726, 2013. DOI: https://doi.org/10.1099/IJS.0.048488-0.

BIERMANN, R.; RÖSNER, L.; BEYER, L. M.; NIEMEYER, L.; BEUTEL, S. Bioprocess development for endospore production by *Bacillus coagulans* using an optimized chemically defined medium. *Engineering in Life Sciences*, v. 23, n. 10, art. e2300210, 2023. DOI: https://doi.org/10.1002/elsc.202300210.

BLAKE, C.; CHRISTENSEN, M. N.; KOVACS, A. T. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 34, n. 1, p. 15-25, 2021. DOI: https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR.

BORDÉ-PAVLICZ, Á.; ZHUMAKAYEV, A. R.; ALLAGA, H.; VÖRÖS, M.; RAMTEKE, P. W.; MONOSTORI, T.; VÁGVÖLGYI, C. Characterisation of the endophytic and rhizospheric *Bacillus licheniformis* strains isolated from sweet potato with plant growth-promoting and yield enhancing potential. *Advances in Agriculture*, v. 2024, n. 1, art. 4073275, 2024. DOI: https://doi.org/10.1155/2024/4073275.

BRADFORD, K. J. Interpreting biological variation: Seeds, populations and sensitivity thresholds. *Seed Science Research*, v. 28, n. 3, p. 158–167, 2018.

BRASIL. Decreto nº 10.375, de 26 de maio de 2020. Institui o Programa Nacional de Bioinsumos e o Conselho Estratégico do Programa Nacional de Bioinsumos. *Diário Oficial da União*: seção 1, Brasília, DF, 27 maio 2020. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2019-2022/2020/decreto/d10375.htm. Acesso em: 29 jun. 2026.

BURGASS, R. W.; POWELL, A. A. Evidence for Repair Processes in the Invigoration of Seeds by Hydration. *Annals of Botany*, v. 53, n. 5, p. 753–757, 1984.

CAMBIA. *The Lens: patent and scholarly search platform*. Canberra: Cambia, 2026. Disponível em: https://www.lens.org/. Acesso em: 29 jun. 2026.

CARDARELLI, M.; WOO, S. L.; ROUPHAEL, Y.; COLLA, G. Seed treatments with microorganisms can have a biostimulant effect by influencing germination and seedling growth of crops. *Plants*, v. 11, n. 3, art. 259, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/PLANTS11030259.

CHAKRABORTI, S.; BERA, K.; SADHUKHAN, S.; DUTTA, P. Bio-priming of seeds: Plant stress management and its underlying cellular, biochemical and molecular mechanisms. *Plant Stress*, v. 3, art. 100052, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100052.

CHALUVADI, S.; BENNETZEN, J. L. Species-associated differences in the below-ground microbiomes of wild and domesticated setaria. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. August, p. 1–12, 2018. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01183

CHATTERJEE, N.; SARKAR, D.; SANKAR, A.; PAL, S.; SINGH, H.; SINGH, R. K.; BOHRA, J. S.; RAKSHIT, A. On-farm seed priming interventions in agronomic crops. *Acta Agriculturae Slovenica*, v. 111, n. 3, p. 715-735, 2018. DOI: https://doi.org/10.14720/aas.2018.111.3.19.

CHECINSKA, A.; PASZCZYNSKI, A.; BURBANK, M. *Bacillus* and other spore-forming genera: variations in responses and mechanisms for survival. *Annual Review of Food Science and Technology*, v. 6, p. 351-369, 2015. DOI: https://doi.org/10.1146/ANNUREV-FOOD-030713-092332.

CHOWDHURY, S. K.; MAJUMDAR, S.; MANDAL, V. Biocontrol potential and growth promotion capability of *Bacillus* sp. LBF-1 for management of wilt disease of *Solanum lycopersicum* caused by *Fusarium* sp. *Russian Agricultural Sciences*, v. 46, n. 2, p. 139-147, 2020. DOI: https://doi.org/10.3103/s1068367420020044.

DA SILVA, J. P.; TEIXEIRA, R. D. S.; DA SILVA, I. R.; SOARES, E. M. B.; LIMA, A. M. N. Decomposition and nutrient release from legume and non-legume residues in a tropical soil. *European Journal of Soil Science*, v. 73, n. 1, p. 1-16, 2022. DOI: https://doi.org/10.1111/ejss.13151.

DA SILVA, M. D. G. C.; DE MEDEIROS, A. O.; ROQUE, B. A. C.; DOS SANTOS, M. R.; BEZERRA, K. G. O.; DE ALMEIDA, F. C. G.; SARUBBO, L. A. Next-generation bioinputs: a systematic review of biosurfactants in sustainable agriculture and research frontiers with bacterial cellulose. *Processes*, v. 14, n. 3, art. 398, 2026. DOI: https://doi.org/10.3390/PR14030398.

DAME, Z. T.; RAHMAN, M.; ISLAM, T. *Bacilli* as sources of agrobiotechnology: recent advances and future directions. *Green Chemistry Letters and Reviews*, v. 14, n. 2, p. 245-270, 2021. DOI: https://doi.org/10.1080/17518253.2021.1905080.

DAS, S.; KUNDU, S.; MEENA, K.; JHA, R. K.; VARMA, A.; BAHUGUNA, R. N.; Tripathi, S. Seed biopriming with potential bioagents influences physiological processes and plant defense enzymes to ameliorate sheath blight induced yield loss in rice (*Oryza sativa* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 39, n. 5, p. 1-16, 2023. DOI: https://doi.org/10.1007/s11274-023-03576-6.

DEVI, A. R.; SHARMA, G. D.; MAJUMDAR, P. B.; PANDEY, P. A multispecies consortium of bacteria having plant growth promotion and antifungal activities, for the management of *Fusarium* wilt complex disease in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 16, p. 614-624, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.10.003.

DÍAZ-RODRÍGUEZ, A. M.; PARRA COTA, F. I.; CIRA CHÁVEZ, L. A.; GARCÍA ORTEGA, L. F.; ESTRADA ALVARADO, M. I.; SANTOYO, G.; DE LOS SANTOS-VILLALOBOS, S. Microbial inoculants in sustainable agriculture: advancements, challenges, and future directions. **Plants**, v. 14, n. 2, p. 191, 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/plants14020191

DJALOLOVA, B.; ABDUSAMATOV, S.; SHURIGIN, V.; JABBOROVA, D.; TURAEVA, B.; KUTLIEVA, G.; DAVRANOV, K. Bacteria associated with grapevine (*Vitis vinifera* L.) rhizosphere and their efficacy in plant growth promotion. *Plant Science Today*, v. 11, n. 4, p. 1739-1746, 2024. DOI: https://doi.org/10.14719/PST.3338.

DU, T.; QU, X.; WANG, Y.; LI, M.; QIE, X.; JIN, J.; GAO, Y.; WANG, Z.; LIN, K.; YANG, C.; SUN, J. Rhizosphere *Mortierella* strain of alfalfa exerted weed growth inhibition by inducing expression of plant hormone-related genes. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1385992, 2024.

ELLOUZI, H.; OUESLATI, S.; HESSINI, K.; RABHI, M.; ABDELLY, C. Seed-priming with H_2O_2 alleviates subsequent salt stress by preventing ROS production and amplifying antioxidant defense in cauliflower seeds and seedlings. *Scientia Horticulturae*, v. 288, art. 110360, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.110360.

ESCALAS, A.; HALE, L.; VOORDECKERS, J. W.; YANG, Y.; FIRESTONE, M. K.; ALVAREZ-COHEN, L.; ZHOU, J. Microbial functional diversity: From concepts to applications. *Ecology and Evolution*, v. 9, n. 20, p. 12000–12016, 2019.

FIRA, D.; DIMKIĆ, I.; BERIĆ, T.; LOZO, J.; STANKOVIĆ, S. A. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, v. 285, p. 44-55, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044.

FERREIRA, T. C.; OLIVEIRA, M. R. G. DE; PEREZ-MARIN, A. M. Hydropriming para a promoção da emergência e do vigor em sementes provenientes de populações do bioma Caatinga. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 4, p. e17910414142–e17910414142, 4 abr. 2021. DOI: https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.14142

FIODOR, A.; AJIJAH, N.; DZIEWIT, L.; PRANAW, K. Biopriming of seed with plant growth-promoting bacteria for improved germination and seedling growth. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, art. 1142966, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142966.

GODFRAY, H. C. J.; MASON-D'CROZ, D.; ROBINSON, S. Food system consequences of a fungal disease epidemic in a major crop. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 371, n. 1709, 2016. DOI: https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0467.

GUPTA, R. S.; PATEL, S.; SAINI, N.; CHEN, S. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel Bacillaceae genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 70, n. 11, p. 5753-5798, 2020. DOI: https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.004475.

HETT, J.; NEUHOFF, D.; DÖRING, T. F.; MASOERO, G.; ERCOLE, E.; BEVIVINO, A. Effects of multi-species microbial inoculants on early wheat growth and litterbag microbial activity. *Agronomy*, v. 12, n. 4, p. 1-17, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/agronomy12040899.

INDRAJA, D.; SANTHA LAKSHMI PRASAD, M.; PRASANNA KUMARI, V.; SANDHYA RANI, C.; MANJUNATHA, T.; Aravind, K. Identification of resistant sources of different cultivars of castor against *Macrophomina phaseolina*. *The Andhra Agric. J.*, v. 70, n. 2, p. 172-178, 2023. DOI: https://doi.org/10.61657/aaj.2023.26.

JALAL, A.; OLIVEIRA, C. E. DA S.; ROSA, P. A. L.; GALINDO, F. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M. Beneficial Microorganisms Improve Agricultural Sustainability under Climatic Extremes. *Life*, v. 13, n. 5, p. 1–23, 2023.

JING, H.; STRADER, L. C. Interplay of Auxin and Cytokinin in Lateral Root Development. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 3, p. 486, 2019.

JUAN, C. A.; DE LA LASTRA, J. M. P.; PLOU, F. J.; PÉREZ-LEBEÑA, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 9, art. 4642, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/IJMS22094642.

KARMAKAR, S.; BILLAH, M.; HASAN, M.; SOHAN, S. R.; HOSSAIN, M. F.; FAISAL HOQUE, K. M.; KABIR, A. H.; RASHID, M. M.; TALUKDER, M. R.; REZA, M. A. Impact of LFGD ($Ar+O_2$) plasma on seed surface, germination, plant growth, productivity and nutritional composition of maize (*Zea mays* L.). *Heliyon*, v. 7, n. 3, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06458.

KÖHL, J.; VAN DER HEIJDEN, L.; BUTTERBACH, P.; GAILDRY, T.; HAAS, L. G. DE; HOUWERS, I.; LANGE, E. DE; LOPEZ, G.; VAN NIEUWENHOVEN, A.; TOUCEDA, M. Survival of seed-coated microbial biocontrol agents during seed storage. *Biological Control*, v. 207, p. 105809, 2025. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2025.105809.

KUNDARGI, C. Y.; JOHNSON, I.; KARTHIKEYAN, M.; ANANDHAM, R.; JAYAKANTHAN, M. Assessing the baseline sensitivity of predominant soil-borne pathogens against carbendazim. *International Journal of Plant & Soil Science*, v. 35, n. 20, p. 333-339, 2023. DOI: https://doi.org/10.9734/IJPSS/2023/V35I203813

KUDOYAROVA, G.; ARKHIPOVA, T.; KORSHUNOVA, T.; BAKAEVA, M.; LOGINOV, O.; DODD, I. C. Phytohormone Mediation of Interactions Between Plants and Non-Symbiotic Growth Promoting Bacteria Under Edaphic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. October, p. 1–11, 2019. .DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01368

LEHNER, M. S.; PETHYBRIDGE, S. J.; MEYER, M. C.; DEL PONTE, E. M. Meta-analytic modelling of the incidence–yield and incidence–sclerotial production relationships in soybean white mould epidemics. *Plant Pathology*, v. 66, n. 3, p. 460-468, 2017. DOI: https://doi.org/10.1111/ppa.12590.

LEMMENS, E.; DELEU, L. J.; DE BRIER, N.; DE MAN, W. L.; DE PROFT, M.; PRINSEN, E.; DELCOUR, J. A. The impact of hydro-priming and osmo-priming on seedling characteristics, plant hormone concentrations, activity of selected hydrolytic enzymes, and cell wall and phytate hydrolysis in sprouted wheat (*Triticum aestivum* L.). *ACS Omega*, v. 4, n. 26, p. 22089-22100, 2019. DOI: https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03210.

LIANG, C.; QI, J.; WU, W.; CHEN, X.; LI, M.; LIU, Y.; PENG, Z.; CHEN, S.; PAN, H.; CHEN, B.; LIU, J.; WANG, Y.; DU, S.; WEI, G.; JIAO, S. Smaller microorganisms outcompete larger ones in resistance and functional effects under disturbed agricultural ecosystems. *iMeta*, v. 3, n. 4, 2024. DOI: https://doi.org/10.1002/IMT2.219.

LUTTS, S.; BENINCASA, P.; WOJTYLA, L.; KUBALA, S.; PACE, R.; LECHOWSKA, K.; QUINET, M.; GARNCZARSKA, M. Seed Priming: New Comprehensive Approaches for an Old Empirical Technique. *New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology*, 2016. DOI: https://doi.org/10.5772/64420.

MA, H. Y.; ZHAO, D. D.; NING, Q. R.; WEI, J. P.; LI, Y.; WANG, M. M.; LIU, X. L.; JIANG, C. J.; LIANG, Z. W. A Multi-year Beneficial Effect of Seed Priming with Gibberellic Acid-3 (GA_3) on Plant Growth and Production in a Perennial Grass, *Leymus chinensis*. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 13214, 2018. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-018-31471-w.

MA, Y. Seed coating with beneficial microorganisms for precision agriculture. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 7, art. 107423, 2019. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107423.

MAITRA, S.; BRESTIC, M.; BHADRA, P.; SHANKAR, T.; PRAHARAJ, S.; PALAI, J. B.; SHAH, M. M. R.; BAREK, V.; ONDRISIK, P.; SKALICKÝ, M.; HOSSAIN, A. Bioinoculants-natural biological resources for sustainable plant production. *Microorganisms*, v. 10, n. 1, art. 51, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10010051.

MALIK, A.; MOR, V. S.; TOKAS, J.; PUNIA, H.; MALIK, S.; MALIK, K.; SANGWAN, S.; TOMAR, S.; SINGH, P.; SINGH, N.; HIMANGINI; VIKRAM; NIDHI; SINGH, G.; KUMAR, V.; SANDHYA; KARWASRA, A. Biostimulant-treated seedlings under sustainable agriculture: a global perspective facing climate change. *Agronomy*, v. 11, n. 1, art. 14, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11010014.

MARQUEZ, N.; GIACHERO, M. L.; DECLERCK, S.; DUCASSE, D. A. *Macrophomina phaseolina*: general characteristics of pathogenicity and methods of control. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, art. 634397, 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.634397.

MCKENNEY, P. T.; DRIKS, A.; EICHENBERGER, P. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, v. 11, n. 1, p. 33-44, 2013. DOI: https://doi.org/10.1038/NRMICRO2921.

MENDIS, H. C.; THOMAS, V. P.; SCHWIENTEK, P.; SALAMZADE, R.; CHIEN, J.-T.; WAIDYARATHNE, P.; KLOEPPER, J.; DE LA FUENTE, L. Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria Bacillus firmus I-1582 and Bacillus amyloliquefaciens QST713 in non-sterile soil and field conditions. **PLOS ONE**, v. 13, n. 2, p. e0193119, 2018. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193119.

MILJAKOVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, J.; TAMINDŽIĆ, G.; ĐORĐEVIĆ, V.; TINTOR, B.; MILOŠEVIĆ, D.; IGNJATOV, M.; NIKOLIĆ, Z. Bio-priming of soybean with *Bradyrhizobium japonicum* and *Bacillus megaterium*: strategy to improve seed germination and the initial seedling growth. *Plants*, v. 11, n. 15, art. 1927, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/PLANTS11151927.

MILON, A. R.; CHANG, S. W.; Ravindran, B. Biochar amended compost maturity evaluation using commercial vegetable crops seedlings through phytotoxicity germination bioassay. *Journal of King Saud University – Science*, v. 34, n. 2, art. 101770, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2021.101770.

MOAZAMI, N. Biological Control. In: *Comprehensive Biotechnology*. 2. ed. Amsterdam: Elsevier B.V., 2011. v. 3. DOI: https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00235-X.

MOHSIN, M. Z.; OMER, R.; HUANG, J.; MOHSIN, A.; GUO, M.; QIAN, J.; ZHUANG, Y. Advances in engineered *Bacillus subtilis* biofilms and spores, and their applications in

bioremediation, biocatalysis, and biomaterials. *Synthetic and Systems Biotechnology*, v. 6, n. 3, p. 180-191, 2021. DOI: https://doi.org/10.1016/j.synbio.2021.07.002.

MULLINS, A. J.; LI, Y.; QIN, L.; HU, X.; XIE, L.; GU, C.; MAHENTHIRALINGAM, E.; LIAO, X.; WEBSTER, G. Reclassification of the biocontrol agents Bacillus subtilis BY-2 and Tu-100 as Bacillus velezensis and insights into the genomic and specialized metabolite diversity of the species. **Microbiology**, v. 166, n. 11, p. 1121-1128, 2020. DOI: https://doi.org/10.1099/mic.0.000986

MURPHY, M. P.; BAYIR, H.; BELOUSOV, V.; CHANG, C. J.; DAVIES, K. J. A.; DAVIES, M. J.; DICK, T. P.; FINKEL, T.; FORMAN, H. J.; JANSSEN-HEININGER, Y.; GEMS, D.; KAGAN, V. E.; KALYANARAMAN, B.; LARSSON, N. G.; MILNE, G. L.; NYSTRÖM, T.; POULSEN, H. E.; RADI, R.; VAN REMMEN, H.; SCHUMACKER, P. T.; THORNALLEY, P. J.; TOYOKUNI, S.; WINTERBOURN, C. C.; YIN, H.; HALLIWELL, B. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, v. 4, n. 6, p. 651-662, 2022. DOI: https://doi.org/10.1038/S42255-022-00591-Z.

MUSTAPHA, H.; MASSANA-CODINA, J.; WILHELM, M.; FASEL, A.; REINHARD, S.; SONNARD, R.; CHARLES, R.; SAVOYAT, C. M.; BODENHAUSEN, N. Agronomic Performance and Microbial Diversity of Wheat Following Organic and Synthetic Seed Treatments: A Three-Year On-Farm Swiss Field Study. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, v. 5, n. 2, p. e70168, 2026. DOI: https://doi.org/10.1002/sae2.70168.

NANDANA, M. S.; ANITH, K. N. Endospore-producing endophytes: structural adaptations, functional roles, and their significance in plant growth and stress management. *International Journal of Plant & Soil Science*, v. 37, n. 8, p. 298-312, 2025. DOI: https://doi.org/10.9734/IJPSS/2025/V37I85631.

NETTLES, R.; WATKINS, J.; RICKS, K.; BOYER, M.; LICHT, M.; ATWOOD, L. W.; PEOPLES, M.; SMITH, R. G.; MORTENSEN, D. A.; KOIDE, R. T. Influence of pesticide seed treatments on rhizosphere fungal and bacterial communities and leaf fungal endophyte communities in maize and soybean. *Applied Soil Ecology*, v. 102, p. 61–69, 2016. DOI: https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.008.

OSORIO-REYES, J. G.; VALENZUELA-AMARO, H. M.; PIZAÑA-ARANDA, J. J. P.; RAMÍREZ-GAMBOA, D.; MELÉNDEZ-SÁNCHEZ, E. R.; LÓPEZ-ARELLANES, M. E.; CASTAÑEDA-ANTONIO, M. D.; CORONADO-APODACA, K. G.; GOMES ARAÚJO, R.; SOSA-HERNÁNDEZ, J. E.; MELCHOR-MARTÍNEZ, E. M.; IQBAL, H. M. N.; PARRA-SALDIVAR, R.; MARTÍNEZ-RUIZ, M. Microalgae-based biotechnology as alternative biofertilizers for soil enhancement and carbon footprint reduction: advantages and implications. *Marine Drugs*, v. 21, n. 2, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/md21020093.

PANDISELVAM, R.; MAYOOKHA, V. P.; KOTHAKOTA, A.; SHARMILA, L.; RAMESH, S. V.; BHARATHI, C. P.; GOMATHY, K.; SRIKANTH, V. Impact of Ozone Treatment on Seed Germination – A Systematic Review. *Ozone: Science & Engineering*, v. 42, n. 4, p. 331–346, 2020. DOI: https://doi.org/10.1080/01919512.2019.1673697.

PARNELL, J. J.; BERKA, R.; YOUNG, H. A.; STURINO, J. M.; KANG, Y.; BARNHART, D. M.; DILEO, M. V. From the lab to the farm: An industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 209596, 2016. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01110.

PHRINGPAEN, W.; AIEDHET, W.; THITITHANAKUL, S.; KANJANASOPA, D. Ability of phosphate-solubilizing bacteria to enhance the growth of rice in phosphorus-deficient soils. *Trends in Sciences*, v. 20, n. 12, art. 7032, 2023. DOI: https://doi.org/10.48048/tis.2023.7032.

PRADHAN, N.; SINGH, S.; SAXENA, G.; PRADHAN, N.; KOUL, M.; KHARKWAL, A. C.; SAYYED, R. A review on microbe–mineral transformations and their impact on plant growth. *Frontiers in Microbiology*, v. 16, p. 1549022, 2025. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1549022.

PRAJAPATI, S.; KUMAR, N.; KUMAR, S.; LAKHARAN, L.; MAURYA, S. Biological control a sustainable approach for plant disease management: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, v. 9, n. 2, p. 1514-1523, 2020.

RAJINI, S. B.; NANDHINI, M.; UDAYASHANKAR, A. C.; NIRANJANA, S. R.; LUND, O. S.; PRAKASH, H. S. Diversity, plant growth-promoting traits, and biocontrol potential of fungal endophytes of *Sorghum bicolor*. *Plant Pathology*, v. 69, n. 4, p. 642-654, 2020. DOI: https://doi.org/10.1111/ppa.13151.

RANGEL, L. I.; LEVEAU, J. H. J. Applied microbiology of the phyllosphere. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 108, n. 1, art. 211, 2024. DOI: https://doi.org/10.1007/S00253-024-13042-4.

RAO, M. P. N.; BANERJEE, A.; LIU, G. H.; Thamchaipenet, A. Genome-based reclassification of *Bacillus acidicola*, *Bacillus pervagus* and the genera *Heyndrickxia*, *Margalitia* and *Weizmannia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 73, n. 7, art. 005961, 2023. DOI: https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.005961.

REIS, V. U. V.; CARVALHO, E. R.; KHANDAY, I. Seed treatment technologies: effects on physical, functional, and physiological seed quality. *Plant Science*, v. 365, 2026. DOI: https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2026.113013.

REZAEI, S.; BUITINK, J.; HAY, F. R. Seed responses to change in ambient humidity and the consequences for storability. *Journal of Stored Products Research*, v. 109, p. 102477, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jspr.2024.10247.

SAADAOUI, N.; SILINI, A.; CHERIF-SILINI, H.; BOUKET, A. C.; ALENEZI, F. N.; LUPTAKOVA, L.; BOULAHOUAT, S.; BELBAHRI, L. Semi-Arid-Habitat-Adapted Plant-growth-promoting rhizobacteria allows efficient wheat growth promotion. *Agronomy*, v. 12, n. 9, art. 2221, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/AGRONOMY12092221.

SABIROV, R.; VALIEV, A.; KARIMOVA, L.; DMITRIEV, A.; KHALIULLIN, D. Influence of physical factors on viability of microorganisms for plant protection. *Engineering for Rural Development*, v. 18, p. 555-562, 2019. DOI: https://doi.org/10.22616/ERDev2019.18.N211.

SALLEH, N. A. M.; PA'EE, F. Effect of various immersion time and water temperature on seed germination of *Clitoria ternatea* and *Momordica charantia*. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, v. 44, n. 4, p. 745–753, 2021.

SCHMOOCK, I.; LINSLER, D.; POTTHOFF, M. Indicating resilience and sustainability in arable soil systems across Europe. Response of soil microbial biomass to tillage reductions in four European countries. *Geophysical Research Abstract*, v. 20, art. 4508, 2018.

SHAHID, M.; SINGH, U. B.; KHAN, M. S.; SINGH, P.; KUMAR, R.; SINGH, R. N.; KUMAR, A.; SINGH, H. V. Bacterial ACC deaminase: Insights into enzymology, biochemistry, genetics, and potential role in amelioration of environmental stress in crop plants. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, p. 1132770, 2023. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132770.
SHAPOSHNIKOV, A. I.; BELIMOV, A. A.; AZAROVA, T. S.; STRUNNIKOVA, O. K.; VISHNEVSKAYA, N. A.; VOROBYOV, N. I.; YUZIKHIN, O. S.; BESPALOVA, L. A.; TIKHONOVICH, I. A. The Relationship Between the Composition of Root Exudates and the Efficiency of Interaction of Wheat Plants with Microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 59, n. 3, p. 330–343, 2023. DOI:10.1134/S000368382303016X

SIMBERLOFF, D.; STILING, P. How risky is biological control? Reply. *Ecology*, v. 79, n. 5, p. 1834-1836, 1998. DOI: https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[1834:HRIBCR]2.0.CO.

SINGH, P.; SINGH, J.; RAY, S.; RAJPUT, R. S.; VAISHNAV, A.; SINGH, R. K.; SINGH, H. B. Seed biopriming with antagonistic microbes and ascorbic acid induce resistance in tomato against *Fusarium* wilt. *Microbiological Research*, v. 237, art. 126482, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126482.

SODJI, F.; TENGEY, T. K.; KWOSEH, C. K. Identification of new sources of resistance to charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in cowpea. *BMC Plant Biology*, v. 25, n. 1, art. 659, 2025. DOI: https://doi.org/10.1186/S12870-025-06628-1.

SPADETO, C.; MENGARDA, L. H. G.; PAULUCIO, M. C.; LOPES, J. C.; MATHEUS, M. T. Embebição, osmocondicionamento e viabilidade de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel.) J. F. Macbr. *Ciência Florestal*, v. 28, n. 1, p. 80–89, 2018. DOI: https://doi.org/10.5902/1980509831582.

TABACCHIONI, S.; PASSATO, S.; AMBROSINO, P.; HUANG, L.; CALDARA, M.; CANTALE, C.; HETT, J.; DEL FIORE, A.; SCHLÜTER, A.; SCZYRBA, A.; MAESTRI, E.; MARMIROLI, N.; NEUHOFF, D.; NESME, J.; SØRENSEN, S. J.; APREA, G.; NOBILI, C.; PRESENTI, O.; GIOVANNETTI, G.; GIOVANNETTI, C.; PIHLANTO, A.; BRUNORI, A.; BEVIVINO, A. Identification of beneficial microbial consortia and bioactive compounds with potential as plant biostimulants for a sustainable agriculture. *Microorganisms*, v. 9, n. 2, p. 1-23, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/microorganisms9020426.

THAMBUGALA, K. M.; DARANAGAMA, D. A.; PHILLIPS, A. J. L.; KANNANGARA, S. D.; PROMPUTTHA, I. Fungi vs. fungi in biocontrol: an overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, p. 1-19, 2020. DOI: https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923.

TIMMUSK, S.; BEHERS, L.; MUTHONI, J.; MURAYA, A.; ARONSSON, A. C. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 1-10, 2017. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049.

TIMMUSK, S.; PALL, T.; RAZ, S.; FETSIUKH, A.; NEVO, E. The potential for plant growth-promoting bacteria to impact crop productivity in future agricultural systems is linked

to understanding the principles of microbial ecology. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, art. 1141862, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1141862.

VAN ESSE, H. P.; REUBER, T. L.; VAN DER DOES, D. Genetic modification to improve disease resistance in crops. *New Phytologist*, v. 225, n. 1, p. 70-86, 2020. DOI: https://doi.org/10.1111/nph.15967.

VASQUES, N. C.; NOGUEIRA, M. A.; HUNGRIA, M. Increasing application of multifunctional *Bacillus* for biocontrol of pests and diseases and plant growth promotion: lessons from Brazil. *Agronomy*, v. 14, n. 8, art. 1654, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/agronomy14081654.

WANG, B.; LI, L.; LIN, Y.; SHEN, D.; SHAO, X.; ZHONG, C.; QIAN, G. Targeted isolation of biocontrol agents from plants through phytopathogen co-culture and pathogen enrichment. **Phytopathology Research 2022 4:1**, v. 4, n. 1, p. 19-, 26 maio 2022.DOI: https://doi.org/10.1186/s42483-022-00124-2

WANG, Y. *et al.* PEG-6000 Priming Improves Aged Soybean Seed Vigor via Carbon Metabolism, ROS Scavenging, Hormone Signaling, and Lignin Synthesis Regulation. *Agronomy*, v. 13, n. 12, p. 3021, 1 dez. 2023. DOI:**https://doi.org/10.3390/agronomy13123021**

XING, W.; LI, Y.; ZHOU, L.; HONG, H.; LIU, Y.; LUO, S.; ZOU, J.; ZHAO, Y.; YANG, Y.; XU, Z.; TAN, B. Deciphering Seed Deterioration: Molecular Insights and Priming Strategies for Revitalizing Aged Seeds. *Plants* 2025, Vol. 14, Page 1730, v. 14, n. 11, p. 1730, 5 jun. 2025. DOI: **https://doi.org/10.3390/plants14111730**

XU, W.; LU, H.; YUAN, Y.; DENG, Z.; ZHENG, L.; LI, H. The Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids from Propolis via Nrf2 and NF-κB Pathways. *Foods*, v. 11, n. 16, p. 2439, 1 ago. 2022.DOI: **https://doi.org/10.3390/foods11162439**

YOUSEFI, A. R.; RASHIDI, S.; MORADI, P.; MASTINU, A. Germination and seedling growth responses of zygophyllum fabago, salsola kali l. And atriplex canescens to peg-induced drought stress. *Environments* - MDPI, v. 7, n. 12, p. 1–10, 1 dez. 2020. DOI: **https://doi.org/10.3390/environments7120107**

4. ARTIGO 1
GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE SOJA TRATADAS COM FORMULAÇÃO MICROBIANA MULTICOMPONENTE

Tecnologia associada ao pedido de patente de invenção BR 10 2025 018270 0, depositado no INPI em 28 de agosto de 2025.

RESUMO

O condicionamento fisiológico associado à inoculação microbiana (*biopriming*) pode favorecer a germinação e o estabelecimento de plântulas provenientes de sementes armazenadas, embora seus efeitos dependam das características do tratamento, do tempo de exposição e da qualidade inicial do lote. Neste estudo, foi avaliado um tratamento experimental multicomponente aplicado a sementes armazenadas de soja da cultivar M-SOY 8808. Inicialmente, três estirpes bacterianas — *Bacillus amyloliquefaciens* (BA), *Bacillus licheniformis* (BL) e *Priestia aryabhattai* (ARY) — e duas combinações bacterianas (ARY + BA e ARY + BL) foram avaliadas quanto à recuperação de células cultiváveis após a exposição à solução de condicionamento e à capacidade de solubilização *in vitro* de fósforo inorgânico. As três estirpes permaneceram cultiváveis após a exposição, e a combinação ARY + BA apresentou a maior área de crescimento colonial, sendo selecionada para as etapas subsequentes. O período de embebição de 4 h favoreceu o vigor das plântulas, sem redução detectável da porcentagem de germinação. A inclusão da combinação ARY + BA aumentou a proporção de plântulas normais de 50,0% para 68,0% e reduziu a proporção de plântulas anormais de 48,0% para 24,5%. De modo geral, o tratamento apresentou potencial para favorecer o desempenho inicial de plântulas provenientes de sementes de soja armazenadas. Entretanto, sua validação agronômica requer ensaios adicionais com diferentes lotes, ambientes e condições de cultivo.

Palavras-chave: *Glycine max*, bioinsumos, condicionamento fisiológico, bactérias promotoras do crescimento vegetal, tratamento de sementes.

4.1. Introdução

A qualidade fisiológica das sementes exerce papel determinante no estabelecimento da lavoura, especialmente em culturas como a soja, nas quais a emergência rápida e uniforme contribui para a formação adequada do estande. Durante o armazenamento, entretanto, as sementes são submetidas a um processo natural de deterioração, cuja intensidade depende da qualidade inicial do lote, do teor de água, da temperatura, da umidade relativa do ar e do período de armazenamento. Assim, lotes com porcentagens de germinação semelhantes podem diferir quanto ao vigor e à capacidade de originar plântulas normais após o armazenamento (Tekrony *et al*., 1993; Fabrizius *et al*., 1999; Mbofung *et al*., 2013; Zuchi *et al*., 2013; Ferreira *et al*., 2017; Mangena; Mokwala, 2019; Gebeyehu, 2020; Da Silva André *et al*., 2022; Souza *et al*., 2023).

Nesse contexto, o tratamento de sementes pode ser utilizado como estratégia complementar para favorecer a expressão do potencial fisiológico remanescente em lotes armazenados para uso próprio. Essa abordagem é particularmente relevante para sementes mantidas em condições não controladas de temperatura e umidade, situação comum em propriedades rurais que conservam parte da produção para utilização em safras posteriores. O tratamento, contudo, não deve ser compreendido como uma forma de recuperar sementes

inviáveis, mas como uma alternativa para favorecer o desempenho daquelas que ainda preservam sua capacidade germinativa (Mbofung *et al*., 2013; Giasson *et al*., 2021).

Entre as técnicas empregadas para essa finalidade, destaca-se o condicionamento fisiológico, que consiste na hidratação controlada das sementes, permitindo a ativação de processos metabólicos pré-germinativos sem que ocorra a protrusão da raiz primária. Durante esse período, podem ocorrer a reorganização das membranas celulares, a retomada da atividade respiratória, a ativação enzimática e o reparo de danos celulares acumulados durante o armazenamento. Quando conduzido adequadamente, esse processo pode favorecer uma germinação mais rápida e uniforme e contribuir para a formação de plântulas mais vigorosas (Matsushima; Sakagami, 2013; Ma *et al*., 2024).

Em sementes de soja, o condicionamento osmótico com soluções de PEG 6000 tem produzido respostas favoráveis, especialmente em lotes envelhecidos ou com menor qualidade fisiológica. A magnitude desses efeitos, entretanto, varia conforme o genótipo, a condição fisiológica inicial das sementes, o potencial osmótico da solução e o período de exposição (Braccini *et al*., 1999; Braccini *et al*., 2000; Bejandi *et al*., 2009). Há também evidências de que o condicionamento com PEG 6000 pode induzir alterações em processos relacionados ao metabolismo do carbono, aos sistemas de eliminação de espécies reativas de oxigênio, à sinalização hormonal e à biossíntese de lignina em sementes envelhecidas de soja (Wang *et al*., 2023).

O PEG 6000 reduz o potencial osmótico da solução e limita a velocidade de absorção de água pelas sementes, permitindo a ativação das etapas iniciais da germinação sem a protrusão da raiz primária. Essa resposta, entretanto, depende do potencial osmótico empregado e do período de exposição. Potenciais excessivamente negativos ou períodos prolongados podem intensificar o estresse osmótico, aumentar o consumo de reservas e comprometer o vigor das sementes. Em estudos com soja, soluções com potencial osmótico de -0,8 MPa têm sido utilizadas para simular condições de deficiência hídrica, o que reforça a necessidade de interpretar seus efeitos considerando a finalidade, a duração e as demais condições do tratamento (Moraes; Menezes, 2003).

Além de controlar a hidratação, a solução de condicionamento pode atuar como veículo para a aplicação de microrganismos selecionados por suas características de interesse agrícola. Essa associação permite integrar, em uma mesma etapa, a ativação inicial do metabolismo das sementes e a inoculação microbiana, caracterizando o chamado biocondicionamento. Os efeitos do tratamento, entretanto, dependem da compatibilidade entre os componentes da formulação, da qualidade fisiológica do lote, da concentração do inóculo e do período de contato das sementes com a solução (Fiodor *et al*., 2023).

Neste estudo, foi avaliado um tratamento experimental multicomponente que associou o condicionamento fisiológico das sementes à inoculação bacteriana. Os componentes foram selecionados considerando atividades biológicas previamente descritas na literatura e seu potencial de aplicação em sistemas biológicos (Tiveron *et al*., 2016; Xu *et al*., 2022). Como a formulação integra uma tecnologia objeto de proteção patentária, sua composição detalhada, as proporções dos componentes e os parâmetros específicos de preparo não são apresentados nesta versão pública da tese, com a finalidade de resguardar as informações tecnológicas e os direitos de propriedade intelectual. Além disso, como não foram incluídos tratamentos com todos os componentes avaliados isoladamente, as respostas observadas devem ser atribuídas ao tratamento completo, não sendo possível determinar a contribuição individual de cada componente nem afirmar a ocorrência de efeitos sinérgicos.

A combinação de diferentes microrganismos requer avaliação prévia, pois a presença de mais de uma espécie não implica, por si só, compatibilidade ou sinergismo. Dependendo das condições de cultivo, podem ocorrer interações complementares, neutras, competitivas ou antagônicas. Portanto, antes da aplicação nas sementes, é necessário verificar se as bactérias permanecem cultiváveis após a exposição às condições do tratamento e se as combinações mantêm sua capacidade de crescimento em cocultivo (Hu *et al*., 2021; Braccini *et al*., 2023).

Outro aspecto central é o tempo de embebição das sementes no tratamento experimental. Períodos muito curtos podem ser insuficientes para desencadear respostas fisiológicas mensuráveis, enquanto exposições prolongadas podem intensificar excessivamente a hidratação, alterar o equilíbrio metabólico e comprometer o vigor. Portanto, a definição do período de embebição deve considerar, de forma integrada, a resposta fisiológica das sementes e a manutenção da viabilidade dos microrganismos durante o tratamento.

Apesar dos avanços no uso de bioinsumos e tratamentos biológicos, ainda são limitados os estudos que integram o condicionamento fisiológico e combinações bacterianas no tratamento de sementes armazenadas de soja. Permanecem lacunas relacionadas à sobrevivência dos microrganismos nas condições de tratamento, à definição do período adequado de contato e aos efeitos de formulações multicomponentes sobre a germinação, a formação de plântulas, o estabelecimento inicial e o desempenho posterior das plantas.

Assim, neste estudo, avaliaram-se a sobrevivência das bactérias após a exposição ao tratamento multicomponente, o efeito dessa exposição sobre a capacidade de solubilização de fósforo inorgânico, os efeitos de diferentes períodos de embebição e a contribuição do cocultivo bacteriano para a qualidade das plântulas provenientes de sementes de soja armazenadas.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Local de execução e material biológico

As avaliações da qualidade fisiológica das sementes foram realizadas no Laboratório de Ensino em Tecnologia de Sementes (LENTES) da Universidade Federal de Sergipe. Em todas as etapas do estudo, utilizou-se o mesmo lote de sementes de soja da cultivar M-SOY 8808, proveniente de sementes reservadas para uso próprio em uma propriedade rural localizada no município de Luís Eduardo Magalhães, Bahia.

Antes do envio ao laboratório, as sementes permaneceram armazenadas durante três meses em um armazém da propriedade, sob condições ambientais não controladas. Após o recebimento, o lote foi caracterizado quanto à porcentagem de germinação e ao teor de água, de acordo com os procedimentos estabelecidos nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2025). O lote apresentou germinação inicial de 73% e teor de água de 12,5%.

4.2.2. Preparação da solução de potencial hídrico controlado (PS)

A solução de condicionamento utilizada no estudo foi preparada de acordo com a tecnologia descrita no pedido de patente de invenção BR 10 2025 018270 0, depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial em 28 de agosto de 2025. Por integrarem o conteúdo tecnológico objeto de proteção patentária, a composição, as proporções dos componentes e os parâmetros específicos de preparo da formulação não são apresentados nesta versão pública da tese.

Em cada tratamento, 100 sementes foram mantidas em contato com 300 mL da solução de condicionamento durante os períodos definidos em cada etapa experimental. A mesma solução foi utilizada como veículo para a incorporação da combinação bacteriana selecionada, e o tratamento foi preparado imediatamente antes de sua aplicação às sementes.

4.2.3. Sobrevivência bacteriana após exposição à solução PS e solubilização de fósforo inorgânico

Foram utilizadas as estirpes *P. aryabhattai* CCT 4005 (ARY), *B. amyloliquefaciens* ATCC 23350 (BA) e *B. licheniformis* ATCC 14580 (BL), cedidas pela empresa Bioworld Soluções Regenerativas Ltda. Inicialmente, cada estirpe foi cultivada separadamente em 20 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB), a 28 °C, sob agitação de 140 rpm, durante 12 h. Após esse período, as suspensões foram ajustadas para a concentração aproximada de 10^8 células mL^{-1}, estimada por meio da densidade óptica a 600 nm.

Para avaliar a manutenção de células cultiváveis após o contato com a solução de condicionamento, uma alíquota de 100 µL de cada suspensão bacteriana foi inoculada separadamente em 20 mL da solução. As amostras foram mantidas a 28 °C, sob agitação constante de 140 rpm, durante 48 h. Alíquotas de 100 µL foram distribuídas em placas contendo meio LB, as quais foram incubadas em câmara do tipo BOD, a 28 °C, durante 24 h. Em seguida, realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

Para avaliar qualitativamente a capacidade de solubilização de fósforo inorgânico após a exposição à solução de condicionamento, alíquotas de 100 µL de cada cultivo foram transferidas para poços de 5 mm de diâmetro, previamente confeccionados no centro de placas de Petri de 90 mm contendo meio ágar Pikovskaya modificado.

O meio de cultura foi composto, por litro, por 10 g de dextrose, 5 g de fosfato bicálcico, 0,5 g de sulfato de amônio, 0,5 g de extrato de levedura, 0,2 g de cloreto de potássio, 0,1 g de sulfato de magnésio, 18 g de ágar e 0,025 g de vermelho do Congo. O pH foi ajustado para 7,0, conforme adaptação do protocolo de Pikovskaya (1948). As placas foram incubadas em câmara do tipo BOD, a 28 °C, durante 48 h.

A formação de colônias no meio Pikovskaya foi considerada evidência qualitativa da presença de células cultiváveis após a exposição à solução de condicionamento. Não foi possível estimar a população bacteriana por densidade óptica após essa exposição, pois as alterações na coloração da solução interferiram nas leituras espectrofotométricas. Essa interferência produziu valores inferiores aos obtidos para o branco, constituído pela solução de condicionamento sem bactérias, impossibilitando a obtenção de estimativas confiáveis da densidade celular por esse método.

A formação de zonas de clareamento ao redor das colônias foi registrada como indicação qualitativa do fenótipo associado à solubilização de fosfato. Também foram mensuradas a área ocupada pelas colônias e a área das respectivas zonas de clareamento. As imagens foram obtidas com o equipamento GroundEye® e analisadas no software ImageJ®, utilizando-se a relação de 140 pixels cm^{-1} para a calibração da escala.

O ensaio com os cultivos individuais foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, tendo as três estirpes bacterianas ARY, BA e BL como tratamentos. Foram utilizadas três repetições biológicas e cinco placas por repetição. As placas constituíram unidades técnicas pertencentes às respectivas repetições biológicas.

4.2.4. Cocultivo bacteriano e preparação da formulação multicomponente

Com base no crescimento colonial e na capacidade de solubilização de fósforo inorgânico apresentados pelas estirpes após a exposição à solução de condicionamento, foram definidas duas combinações bacterianas: *P. aryabhattai* com *B. amyloliquefaciens* (ARY + BA) e *P. aryabhattai* com *B. licheniformis* (ARY + BL). Para o preparo de cada combinação, utilizaram-se suspensões previamente cultivadas em meio líquido Luria-Bertani (LB) e ajustadas para a concentração aproximada de 10^8 células mL^{-1}.

Em cada repetição, alíquotas de 100 µL das suspensões de cada uma das duas bactérias foram inoculadas conjuntamente em 20 mL da solução de condicionamento. O mesmo procedimento foi realizado em 20 mL de meio LB, utilizado como meio de referência. Os cocultivos foram mantidos a 28 °C, sob agitação de 140 rpm, durante 48 h.

Após esse período, alíquotas de 100 µL de cada cocultivo foram transferidas para poços de 5 mm de diâmetro, confeccionados em placas contendo meio Pikovskaya modificado. As placas foram incubadas a 28 °C durante 48 h. A formação de colônias no meio sólido foi considerada evidência qualitativa da presença de células cultiváveis após a incubação na solução de condicionamento ou no meio LB. A presença e a área das zonas de clareamento foram avaliadas conforme descrito para os cultivos individuais. Os meios de cultura, as soluções e os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 120 °C durante 15 min.

A ausência de sinais aparentes de contaminação e a manutenção das características fenotípicas dos cultivos foram verificadas por meio da avaliação da morfologia colonial, da reação de Gram e da micromorfologia celular por microscopia óptica.

Com base no crescimento colonial observado após a exposição à solução de condicionamento, a combinação ARY + BA foi selecionada para as etapas subsequentes. O tratamento contendo essa combinação bacteriana foi preparado imediatamente antes de sua aplicação às sementes, conforme os procedimentos vinculados à tecnologia descrita no pedido de patente de invenção BR 10 2025 018270 0. As proporções dos componentes e os demais parâmetros específicos de preparo não são apresentados nesta versão pública da tese, por integrarem o conteúdo tecnológico objeto de proteção patentária.

O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 × 2, constituído por duas combinações bacterianas (ARY + BA e ARY + BL) e duas condições prévias de cultivo (solução de condicionamento e meio LB), além de um controle sem inoculação bacteriana. Foram utilizadas três repetições biológicas, cada uma composta por seis placas consideradas unidades técnicas.

4.2.5. Determinação do período de embebição das sementes em solução de potencial hídrico controlado

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos: controle sem contato com a solução de condicionamento e quatro períodos de embebição: 0, 2, 4 e 6 h. No tratamento correspondente a 0 h, as sementes foram imersas na solução e retiradas imediatamente. Cada tratamento foi constituído por quatro repetições de 25 sementes.

Antes da embebição, as sementes foram submetidas à desinfestação superficial em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% durante 1 min e, posteriormente, em álcool a 70% durante 1 min. Em seguida, foram lavadas em água corrente durante 3 min. Durante os tratamentos, a solução foi mantida sob aeração contínua por meio de um minicompressor com vazão de 3 L h^{-1} e pressão de 0,012 MPa. Ao final de cada período, as sementes foram retiradas da solução e submetidas à secagem superficial em temperatura ambiente de aproximadamente 26 °C.

O teste de germinação foi conduzido em rolos de papel germitest umedecidos com volume de água equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram mantidos a 25 °C. Na primeira contagem e na contagem final do teste, foram registrados os números de plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas, de acordo com Brasil (2025). Na contagem final, as plântulas normais foram analisadas no equipamento GroundEye® Série L, determinando-se os comprimentos da raiz primária, do hipocótilo e total da plântula.

O experimento completo foi realizado três vezes, em períodos distintos, constituindo três repetições biológicas independentes. Em cada repetição biológica, foram mantidas as quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento.

4.2.6. Germinação e vigor das sementes tratadas com a formulação multicomponente

Após a definição do período de embebição, avaliou-se o efeito da inclusão da combinação bacteriana ARY + BA no tratamento experimental. As suspensões bacterianas foram preparadas conforme descrito no item 1.2.3 e ajustadas para a concentração aproximada de 10^8 células mL^{-1} antes de sua incorporação ao tratamento. Sementes submetidas apenas à solução de condicionamento, durante o mesmo período de embebição, foram utilizadas como controle de referência para avaliar o efeito da inclusão da combinação bacteriana.

O teste de germinação foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com dois tratamentos: solução de condicionamento sem a combinação bacteriana e solução de condicionamento com a combinação ARY + BA. Cada tratamento foi constituído por quatro repetições de 25 sementes. Foram determinadas as porcentagens de plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas. As plântulas normais foram analisadas no equipamento

GroundEye® quanto ao comprimento da raiz primária, ao comprimento acumulado das raízes secundárias e ao comprimento total.

O experimento completo foi realizado três vezes, em períodos distintos, constituindo três repetições biológicas independentes. Em cada repetição biológica, foram mantidas quatro repetições de 25 sementes por tratamento.

4.2.7. Análise estatística

Para explorar conjuntamente as relações entre as variáveis de germinação e vigor e identificar padrões multivariados associados aos tratamentos, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA). Antes da análise, os dados foram centrados e escalonados, de modo que cada variável apresentasse média igual a zero e variância igual a um. A PCA foi calculada por decomposição em valores singulares (SVD), utilizando-se a função prcomp do software R. Os autovalores, a variância explicada e os biplots foram obtidos e representados com auxílio do pacote factoextra.

Os dados de expansão radial e de solubilização de fosfato foram inicialmente avaliados quanto à normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando os pressupostos da análise paramétrica não foram atendidos, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido de comparações pareadas pelo teste de Wilcoxon para comparações múltiplas.

Para as demais variáveis, foram ajustados modelos lineares generalizados (GLM), com distribuições definidas de acordo com a natureza dos dados. Para as variáveis contínuas e estritamente positivas, utilizou-se a distribuição Gamma com função de ligação log. Para os dados de contagem, utilizou-se a distribuição de Poisson com ligação log. As comparações entre as médias marginais estimadas foram realizadas com ajuste de Šídák. A adequação dos modelos foi avaliada por meio da análise dos resíduos e da verificação da dispersão dos dados. Adotou-se o nível de significância de 5%, e todas as análises foram realizadas no software R (R Core Team, 2024).

4.3. Resultados

4.3.1. Recuperação bacteriana e potencial de solubilização de fósforo inorgânico após exposição à solução PS

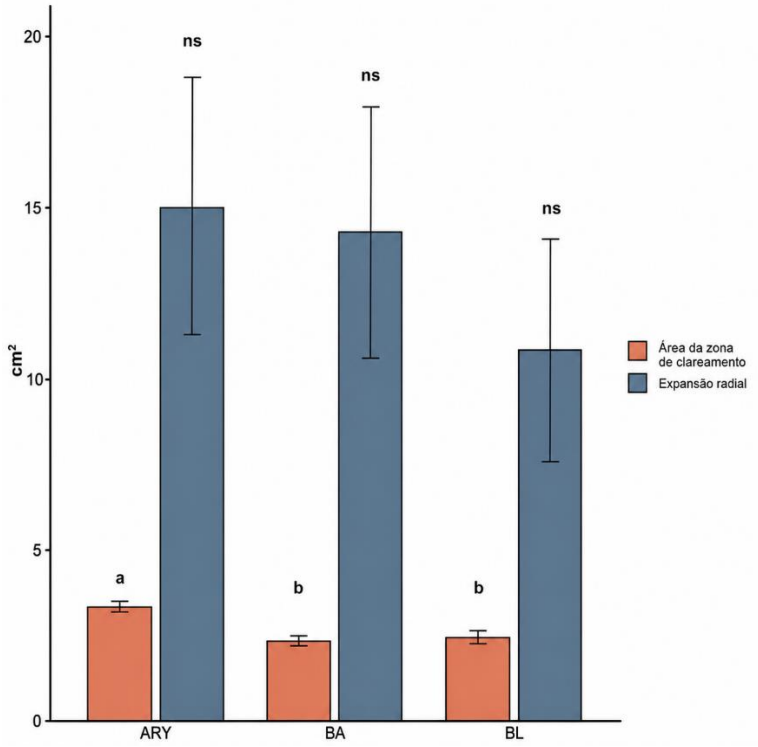
Foram recuperadas células cultiváveis das três estirpes bacterianas após 48 h de exposição à solução de potencial hídrico controlado (PS). Não foram detectadas diferenças significativas entre as estirpes quanto à formação de colônias, considerando as comparações entre as médias marginais estimadas com ajuste de Šídák ($p = 0,05$). As três estirpes formaram colônias a partir da diluição 10^{-3}. As populações médias foram de $1,38 \times 10^{6} \pm 9,89 \times 10^{5}$ UFC mL^{-1} para ARY, $1,52 \times 10^{5} \pm 1,34 \times 10^{5}$ UFC mL^{-1} para BL e $8,11 \times 10^{3} \pm 2,42 \times 10^{3}$ UFC mL^{-1} para BA.

As três estirpes também formaram colônias em meio Pikovskaya após a exposição à solução PS. As áreas de crescimento colonial foram superiores a 10 cm^2 e não diferiram significativamente entre os cultivos individuais ($p = 0,05$). As células cultiváveis das três estirpes foram recuperadas após o período de exposição.

Foram observadas zonas de clareamento em todas as placas, indicando a manutenção do fenótipo associado à solubilização de fosfato nas condições do ensaio em meio sólido. A área das zonas de clareamento diferiu entre as estirpes. *P. aryabhattai* apresentou a maior média, com $3,25 \pm 0,11$ cm^2, enquanto *B. licheniformis* e *B. amyloliquefaciens* apresentaram médias de $2,40 \pm 0,15$ e $2,30 \pm 0,08$ cm^2, respectivamente, sem diferença significativa entre estas duas últimas estirpes (Figura 1).

Figura 1 - Área da zona de clareamento e da expansão radial das cepas bacterianas Priestia aryabhattai (ARY), *Bacillus amyloliquefaciens* (BA) e *Bacillus licheniformis* (BL), expressas

em cm². Letras distintas indicam diferença significativa entre as cepas quanto à área da zona de clareamento, enquanto “ns” indica ausência de diferença significativa para a expansão radial.

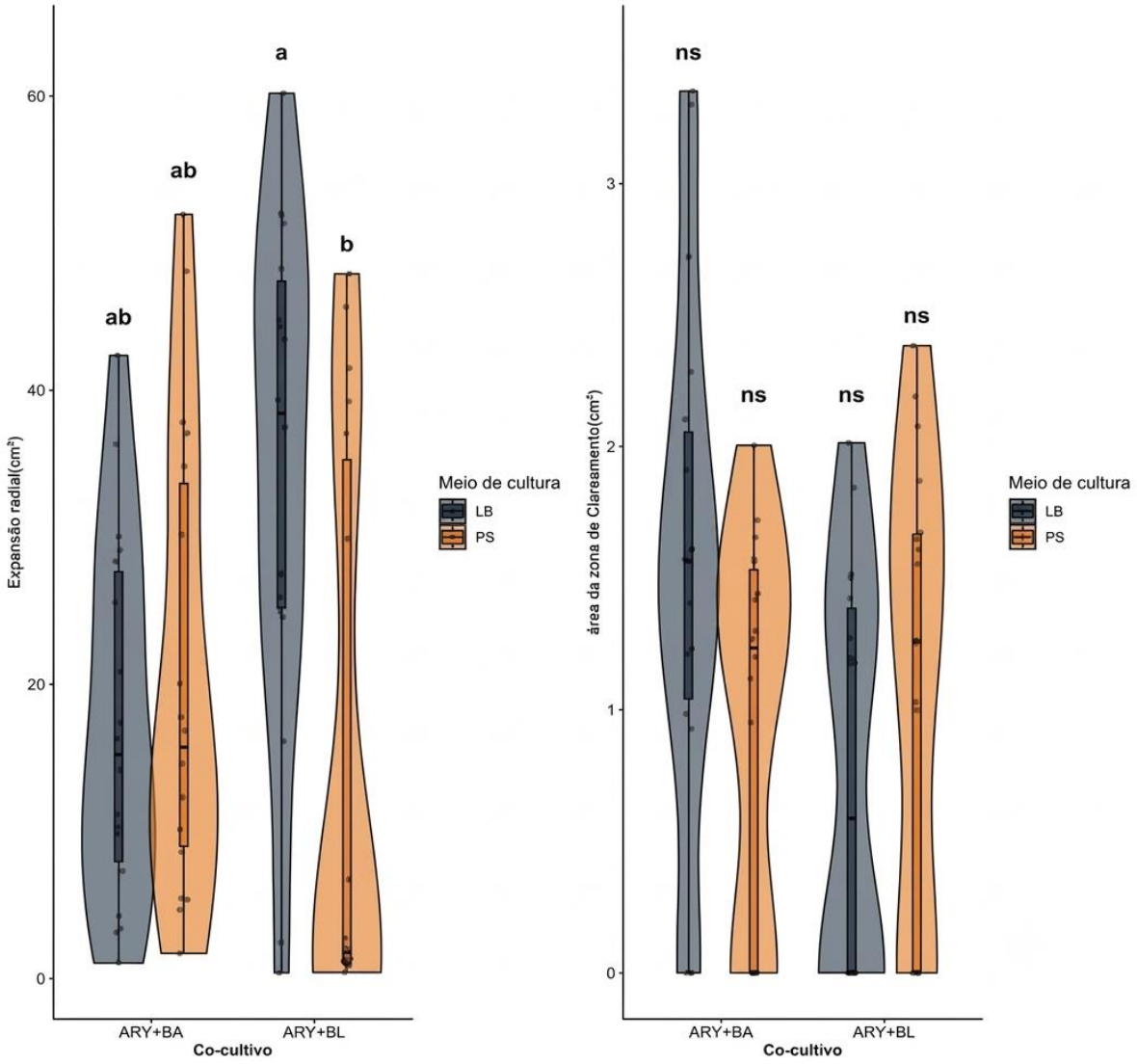


A maior área da zona de clareamento apresentada por *P. aryabhattai* indica maior expressão do fenótipo associado à solubilização de fosfato, nas condições do ensaio em meio sólido, em comparação com as demais estirpes avaliadas. Esse resultado constitui um indício de uma característica relacionada à promoção do crescimento vegetal e fundamentou a seleção da estirpe para a composição das combinações bacterianas.

Na avaliação dos cocultivos, a combinação *P. aryabhattai* + *B. amyloliquefaciens* apresentou áreas de crescimento colonial numericamente próximas após a incubação prévia em meio LB e na solução PS, com 15,2 e 15,7 cm², respectivamente. Para a combinação *P. aryabhattai* + *B. licheniformis*, foram observadas áreas de 38,4 cm² após a incubação em meio LB e de 1,78 cm² após a exposição à solução PS, indicando redução acentuada do crescimento colonial nessa última condição (Figura 2). A manutenção do crescimento da combinação *P. aryabhattai* + *B. amyloliquefaciens* após a exposição à solução PS fundamentou sua seleção para as etapas subsequentes.

Figura 2 - Área de expansão radial das combinações de *Priestia aryabhattai* com *Bacillus amyloliquefaciens* ou *Bacillus licheniformis* em meio Pikovskaya, após incubação prévia em meio LB ou na solução PS. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Wilcoxon ao nível de 5% de probabilidade. LB = Luria-Bertani; PS = solução com potencial

hídrico controlado; ARY+BA = *Priestia aryabhattai* e *Bacillus amyloliquefaciens*; ARY+BL = *P. aryabhattai* e *Bacillus licheniformis*; ns = não significativo.



4.3.2. Efeito do período de embebição sobre a germinação e a formação de plântulas

Os diferentes períodos de embebição das sementes na solução PS não influenciaram significativamente as proporções de plântulas normais (p = 0,253) e de sementes não germinadas (p = 0,754). Para a proporção de plântulas anormais, também não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos (p = 0,086), embora o resultado indique uma possível variação a ser investigada em estudos posteriores.

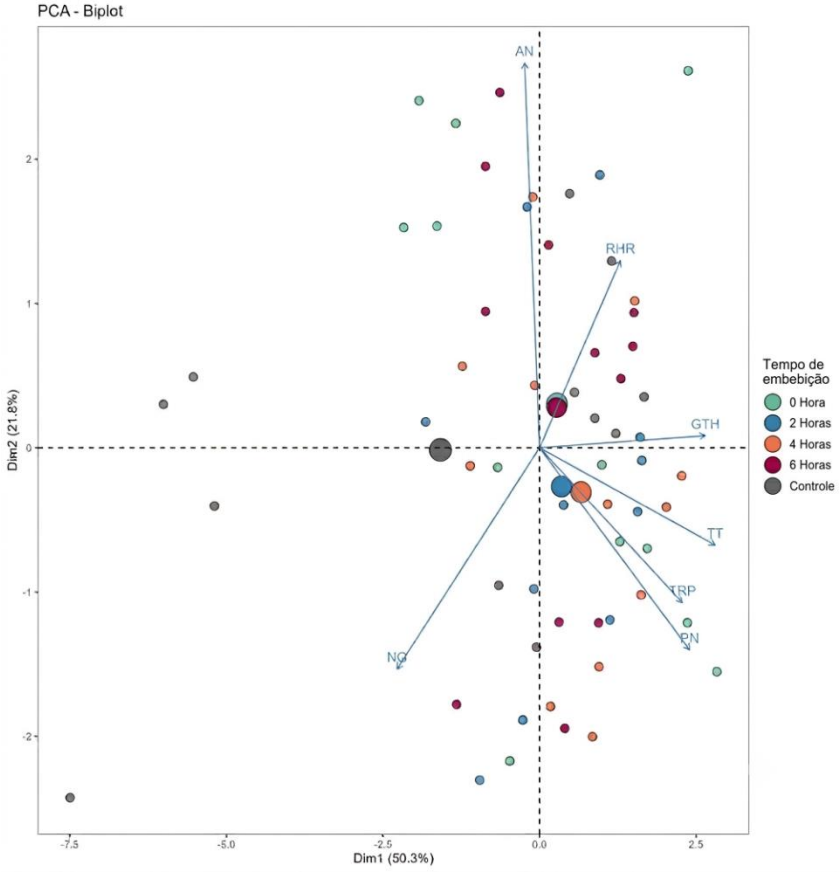
Na análise da resposta ao tempo de embebição, foram considerados apenas os períodos de 0, 2, 4 e 6 h, uma vez que o controle sem contato com a solução não integra a escala quantitativa de tempo. O componente linear para a proporção de plântulas normais apresentou p = 0,049. Entretanto, como o teste global entre os períodos não foi significativo, esse resultado foi interpretado com cautela e não foi considerado evidência conclusiva de aumento consistente da proporção de plântulas normais em função do tempo de embebição.

Portanto, não foi possível afirmar que o aumento do período de embebição promoveu maior formação de plântulas normais. De modo geral, os períodos avaliados apresentaram comportamento semelhante quanto às proporções de plântulas normais, plântulas anormais e sementes não germinadas.

Na Análise de Componentes Principais (Figura 3), os componentes principais 1 e 2 explicaram, respectivamente, 50,3% e 21,8% da variação total dos dados, totalizando 72,1%. No espaço multivariado, os tratamentos submetidos à embebição posicionaram-se à direita do

primeiro componente e apresentaram associação com as variáveis relacionadas ao vigor e à germinação. Em contrapartida, o controle, constituído por sementes não tratadas, posicionou-se à esquerda e mostrou associação com o número de sementes não germinadas (NG). Essas relações apresentam caráter descritivo e exploratório e devem ser interpretadas em conjunto com as análises univariadas, que não detectaram diferenças significativas entre os tratamentos para essas variáveis.

Figura 3 - Análise de Componentes Principais da germinação e vigor de plântulas de soja embebidas em diferentes tempos na solução de potencial hídrico controlado. AN = Plântula anormal, GHT = Tamanho do Hipocótilo (cm), NG = Número de plântulas não germinadas, PN = Número de plântulas normais, RHR = Razão Hipocotilo/Raiz, TT = Tamanho Total (cm), TRP = Tamanho da Raiz Principal (cm).



Entre as variáveis analisadas, as que apresentaram os maiores tamanhos de efeito e diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos foram o Tamanho Total (TT; η^2=0,228, p=0,0057), o Tamanho da Raiz Primária (TRP; η^2=0,194, p=0,016), e o Tamanho do Hipocótilo (GTH; η^2=0,184, p=0,021). Esses resultados confirmam que o vigor das plântulas foi a característica mais sensível aos tempos de tratamento com o PS.

Ao observar as médias obtidas pelos tempos de embebição para essas variáveis, o tempo de 4 horas se destaca por ter sido o único que para as variáveis GTH, TRP e TT não apresentou semelhança com o controle (Tabela 1).

Tabela 1. Médias e erro padrão de plântulas de soja embebidas em diferentes tempos em solução osmoprotetora. GHT = Tamanho do Hipocótilo, TT = Tamanho Total, TRP = Tamanho da Raiz Principal. Letras iguais não diferem estatisticamente a 5 % pelo teste de Sidak.

Tratamentos	GTH (cm)	TRP (cm)	TT (cm)
C	6,59 (±0,62) b	7,56 (±0,41) b	14,2 (±0,76) b
0	8,87 (±0,64) ab	12,67 (±1,08) a	21,54 (±0,47) a
2	10,26 (±0,58) a	11,31(±0,45) ab	21,58 (±1,01) a
4	10,31(±0,55) a	13,02(±0,65) a	23,42 (±0,15) a
6	9,91(±0,39) ab	10,99 (±0,35) ab	20,90 (±0,38) ab

Esse tempo de embebição na solução resultou em plântulas 9,4% maiores que o controle (Figura 4).

Figura 4 - Plântulas de soja germinadas a partir de sementes tratadas em solução com potencial hídrico controlado em diferentes tempos de embebição. Plântulas de soja obtidas nos diferentes tratamentos.



As imagens foram adquiridas no sistema GroundEye® e posteriormente organizadas no BioRender®, utilizado para a montagem da figura, o ajuste de resolução e a inserção da escala em centímetros. A = Controle; B = 0 horas; C = 2 horas; D = 4 horas; E = 6 horas.

4.3.3. Efeito da inclusão do cocultivo na formulação multicomponente

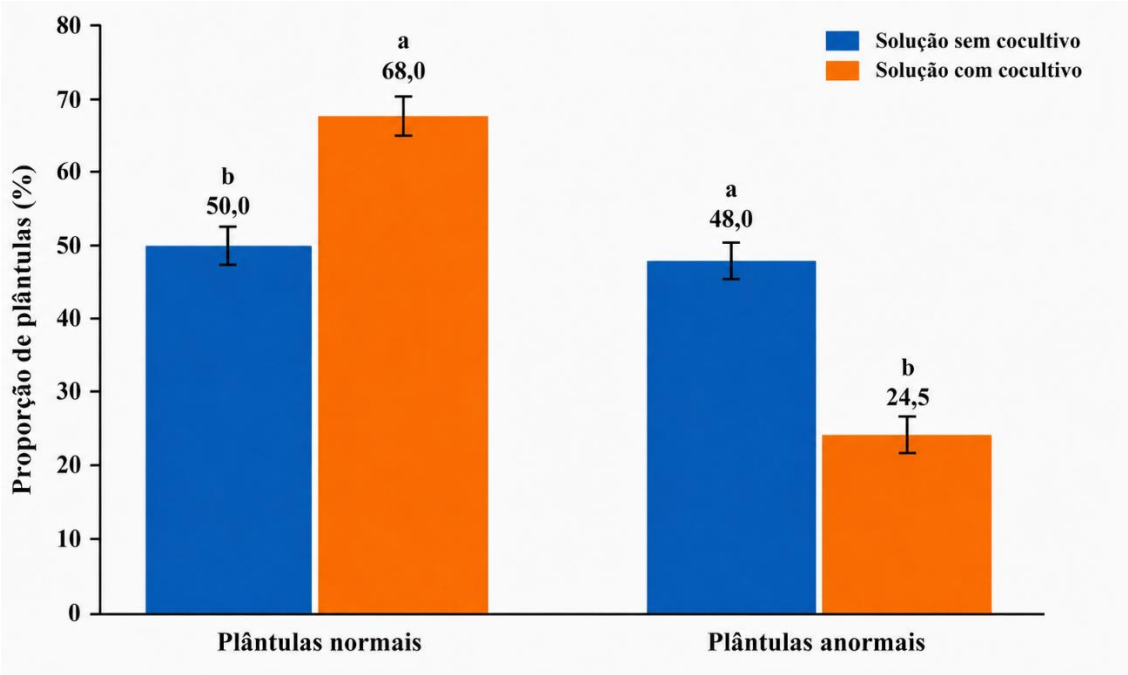
A inclusão do cocultivo de *P. aryabhattai* e *B. amyloliquefaciens* modificou a distribuição das plântulas entre as categorias normal e anormal. No tratamento contendo o cocultivo bacteriano, 68,0% ± 4,40% das plântulas foram classificadas como normais e 24,5% ± 3,33% como anormais. No tratamento sem o cocultivo, essas proporções foram de 50,0% ± 1,69% e 48,0% ± 1,55%, respectivamente.

A inclusão do cocultivo aumentou em 18,0 pontos percentuais a proporção de plântulas normais e reduziu em 23,5 pontos percentuais a proporção de plântulas anormais. As comparações entre as médias marginais estimadas, com ajuste de Šídák, indicaram diferenças significativas entre os tratamentos para ambas as categorias ($p < 0,05$).

O número de ramificações radiculares, o comprimento da raiz primária, o comprimento acumulado das raízes secundárias e o comprimento total das plântulas normais não diferiram significativamente entre os tratamentos. Portanto, o principal efeito associado à inclusão do cocultivo foi o aumento da proporção de plântulas normais e a redução da proporção de

plântulas anormais, sem alteração significativa do crescimento das plântulas classificadas como normais (Figura 5).

Figura 5 - Proporção de plântulas normais e anormais após 4 horas de embebição em solução multicomponente, na ausência e na presença do cocultivo de *Priestia aryabhattai* e *Bacillus amyloliquefaciens*. Diferenças entre as formulações foram avaliadas por comparações com ajuste de Šidák, a 5% de significância.



4.4. Discussão

Neste estudo, utilizou-se um lote de sementes de soja armazenado durante três meses em uma propriedade rural, sob condições não controladas de temperatura e umidade. O lote apresentou germinação inicial de 73% e elevada ocorrência de plântulas anormais, indicando comprometimento de sua qualidade fisiológica. Entretanto, como não foram realizadas avaliações antes do armazenamento nem o monitoramento das condições ambientais durante esse período, não é possível atribuir diretamente essa condição ao armazenamento.

A embebição das sementes em uma solução de potencial hídrico controlado não alterou significativamente as proporções de plântulas normais e de sementes não germinadas nos períodos avaliados. Apesar disso, foram observadas diferenças em características relacionadas ao vigor das plântulas. A hidratação controlada pode permitir a ativação de processos metabólicos pré-germinativos, incluindo a reorganização das membranas, a retomada da atividade respiratória e a atuação de mecanismos celulares de reparo, sem que ocorra a protrusão da raiz primária. Esses processos podem contribuir para o desempenho posterior das plântulas, embora não tenham sido mensurados diretamente neste estudo (Lei *et al.*, 2021; Ma *et al.*, 2024; Sajid *et al.*, 2025).

Entre os períodos avaliados, o tratamento de 4 h apresentou a maior média de comprimento total das plântulas, com 23,42 ± 0,15 cm, aproximadamente 2 cm superior à média observada no controle sem embebição. Esse resultado indica que o período de contato pode influenciar características relacionadas ao vigor, mesmo quando a porcentagem final de germinação não é alterada. A resposta ao condicionamento depende da espécie, da qualidade inicial do lote, do potencial hídrico e do período de exposição. Períodos insuficientes podem limitar a ativação dos processos pré-germinativos, enquanto exposições prolongadas podem intensificar o estresse osmótico e comprometer o vigor (Chakraborti *et al.*, 2022).

A recuperação de células cultiváveis após a exposição à solução de condicionamento constituiu um aspecto importante para avaliar a compatibilidade inicial das estirpes com o tratamento. Foram recuperadas células cultiváveis das três estirpes nas condições avaliadas. Entretanto, como não foram comparadas quantitativamente as populações antes e após a exposição, não é possível determinar se houve manutenção, redução ou multiplicação das células bacterianas. O resultado demonstra apenas que parte da população permaneceu capaz de formar colônias em meio sólido após o tratamento.

Entre as estirpes avaliadas, *P. aryabhattai* apresentou a maior área de clareamento em meio Pikovskaya, indicando maior expressão do fenótipo associado à solubilização de fosfato inorgânico *in vitro*. Esse resultado constitui uma evidência qualitativa, pois não foi realizada a quantificação do fósforo efetivamente solubilizado no meio.

A combinação de *P. aryabhattai* e *B. amyloliquefaciens* apresentou áreas de crescimento colonial semelhantes após a incubação prévia em meio LB e na solução de condicionamento, o que fundamentou sua seleção para as etapas subsequentes. Em contrapartida, a combinação contendo *B. licheniformis* apresentou menor crescimento em meio sólido após a exposição à solução, em comparação com o observado após o cultivo em LB. Esse resultado sugere que as condições de exposição influenciaram o desempenho posterior do cocultivo. As diferenças nas zonas de clareamento podem estar relacionadas ao crescimento colonial, à acidificação do meio ou à produção de ácidos orgânicos, processos associados à solubilização de fosfatos inorgânicos (Timofeeva *et al*., 2022; Vitorino *et al*., 2024). Esses mecanismos, contudo, não foram avaliados diretamente neste estudo.

Na avaliação da germinação, a inclusão do cocultivo de *P. aryabhattai* e *B. amyloliquefaciens* aumentou a proporção de plântulas normais e reduziu a proporção de plântulas anormais, em comparação com o tratamento sem bactérias. Esse foi o efeito mais consistente associado à inclusão do cocultivo durante a fase inicial de desenvolvimento.

Bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Priestia* podem produzir compostos relacionados ao crescimento, mobilizar nutrientes e participar das interações iniciais entre sementes, raízes e microrganismos (Cardarelli *et al*., 2022; Liu *et al*., 2019; Pappalettere *et al*., 2024). Entretanto, esses mecanismos não foram mensurados e não podem ser apontados como causas diretas das respostas observadas.

Em conjunto, os resultados demonstram que células cultiváveis da combinação bacteriana selecionada foram recuperadas após a exposição às condições do tratamento e que a inclusão do cocultivo favoreceu a formação de plântulas normais. Entretanto, a validação da tecnologia requer experimentos adicionais com maior número de unidades experimentais, diferentes lotes e cultivares, avaliação dos componentes isolados, quantificação da população microbiana antes e após o tratamento e ensaios em condições de campo. Essas etapas são necessárias para verificar a consistência dos efeitos e a aplicabilidade agronômica da tecnologia (Parnell *et al*., 2016; Timmusk *et al*., 2017; Díaz-Rodríguez *et al*., 2025).

4.5. Conclusões

A formulação multicomponente apresentou potencial para o *biopriming* de sementes armazenadas de soja. O período de embebição de 4 h favoreceu características relacionadas ao vigor das plântulas, sem alterar significativamente a germinação, enquanto a inclusão do cocultivo bacteriano aumentou a proporção de plântulas normais e reduziu a de plântulas anormais. Entretanto, a recomendação agronômica da tecnologia requer ensaios adicionais com diferentes lotes e cultivares, ambientes e condições de cultivo.

4.6. Referências Bibliográficas

Bejandi, T. K.; Sedghi, M.; Sharifi, R. S.; Namvar, A.; Molaei, P. Seed priming and sulfur effects on soybean cell membrane stability and yield in saline soil. *Pesquisa Agropecuária*

Brasileira, v. 44, n. 9, p. 1114-1117, 2009. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000900007

Braccini, A. De L. E; Reis, M. S.; Moreira, M. A.; Sediyama, C. S.; Scapim, C. A. Biochemical changes associated to soybean seeds osmoconditioning during storage. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 2, p. 433-447, 2000. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-204X2000000200022.

Braccini, A. De L. E; Reis, M. S.; Sediyama, C. S.; Scapim, C. A.; Braccini, M. Do C. L. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, após o processo de hidratação-desidratação e envelhecimento acelerado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 6, p. 1053-1066, 1999. DOI: https://doi.org/10.1590/S0100-204X1999000600018.

Braccini, A. L.; Milléo, M. V. R.; Alleoni, B.; Rondina, A. B. L.; Paulitsch, F.; Martins, L. M.; Gravina, F.; Yoshida, T. H.; Ávila, V. T.; Figueiredo, F. M. R. S. De; Almeida, R. Influence of seed co-inoculation with *Bradyrhizobium* species and *Azospirillum brasilense* on soybean development in Southern and Southeastern Brazil. *African Journal of Agricultural Research*, v. 19, n. 1, p. 81-90, 2023. DOI: https://doi.org/10.5897/AJAR2022.16234.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. *Regras para análise de sementes*. Brasília, DF: MAPA, 2025. Disponível em: portal oficial do Ministério da Agricultura e Pecuária. Acesso em: 29 jun. 2026.

Cardarelli, M.; Woo, S. L.; Rouphael, Y.; Colla, G. Seed treatments with microorganisms can have a biostimulant effect by influencing germination and seedling growth of crops. *Plants*, v. 11, n. 3, art. 259, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/plants11030259.

Chakraborti, S., Bera, K., Sadhukhan, S.; Dutta, P. Bio-priming of seeds: Plant stress management and its underlying cellular, biochemical and molecular mechanisms. *Plant Stress*, v. 3, art. 100052, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.stress.2021.100052.

Da Silva André, G.; Coradi, P. C.; Teodoro, L. P. R.; Teodoro, P. E. Predicting the quality of soybean seeds stored in different environments and packaging using machine learning. *Scientific Reports*, v. 12, art. 8793, 2022. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-022-12863-5.

Díaz-Rodríguez, A. M. *et al*. Microbial inoculants in sustainable agriculture: advancements, challenges, and future directions. *Plants*, v. 14, n. 2, art. 191, 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/plants14020191.

Fabrizius, E.; Tekrony, D.; Egli, D. B.; Rucker, M. Evaluation of a viability model for predicting soybean seed germination during warehouse storage. *Crop Science*, v. 39, n. 1, p. 194-201, 1999. DOI: https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900010030x.

Ferreira, F. C.; Villela, F. A.; Meneghello, G. E.; Soares, V. N. Cooling of soybean seeds and physiological quality during storage. *Journal of Seed Science*, v. 39, n. 4, p. 385-392, 2017. DOI: https://doi.org/10.1590/2317-1545v39n4177535.

Fiodor, A.; Ajijah, N.; Dziewit, L.; Pranaw, K. Biopriming of seed with plant growth-promoting bacteria for improved germination and seedling growth. *Frontiers in Microbiology*, v. 14, art. 1142966, 2023. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1142966.

Gebeyehu, B. Review on: effect of seed storage period and storage environment on seed quality. *International Journal of Applied Agricultural Sciences*, v. 6, n. 6, p. 185-190, 2020. DOI: https://doi.org/10.11648/j.ijaas.20200606.14.

Giasson, L. A.; Contreiras-Rodrigues, A. P. D.; Dalla-Costa, D. A.; Bortolli, B. B. De; Coelho, A. F.; Pereira, S. R. Physiological quality and seed storage potential of four soybean cultivars. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 4, e7910413635, 2021. DOI: https://doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13635.

Hu, J.; Yang, T.; Friman, V. P.; Kowalchuk, G. A.; Hautier, Y.; Li, M.; Wei, Z.; Xu, Y.; Shen, Q.; Jousset, A. Introduction of probiotic bacterial consortia promotes plant growth via impacts on the resident rhizosphere microbiome. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 288, n. 1960, art. 20211396, 2021. DOI: https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1396.

Lei, C., Bagavathiannan, M., Wang, H., Sharpe, S. M., Meng, W.; Yu, J.. Osmopriming with Polyethylene Glycol (PEG) for Abiotic Stress Tolerance in Germinating Crop Seeds: A Review. *Agronomy*, v. 11, n. 11, art. 2194, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/AGRONOMY11112194.

Liu, X.; Chen, Z.; Gao, Y.; Liu, Q.; Zhou, W.; Zhao, T.; Jiang, W.; Cui, X.; Cui, J.; Wang, Q. A newly discovered ageing-repair bacterium, *Pseudomonas geniculata*, isolated from rescuegrass (*Bromus carthariticus* Vahl) promotes the germination and seedling growth of aged seeds. *Botany*, v. 97, n. 3, p. 167-178, 2019. DOI: https://doi.org/10.1139/cjb-2018-0151.

Ma, L.; Wei, J.; Han, G.; Sun, X.; Yang, X. Seed osmopriming with polyethylene glycol (PEG) enhances seed germination and seedling physiological traits of *Coronilla varia* L. under water stress. *PLOS ONE*, v. 19, n. 5, e0303145, 2024. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0303145.

Mangena, P.; Mokwala, P. W. The influence of seed viability on the germination and in vitro multiple shoot regeneration of soybean (*Glycine max* L.). *Agriculture*, v. 9, n. 2, art. 35, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/agriculture9020035.

Matsushima, K.-I.; Sakagami, J.-I. Effects of seed hydropriming on germination and seedling vigor during emergence of rice under different soil moisture conditions. *American Journal of Plant Sciences*, v. 4, n. 8, p. 1584-1593, 2013. DOI: https://doi.org/10.4236/ajps.2013.48191.

Mbofung, G. C. Y.; Goggi, A. S.; Leandro, L. F. S.; Mullen, R. E. Effects of storage temperature and relative humidity on viability and vigor of treated soybean seeds. *Crop Science*, v. 53, n. 3, p. 1086-1095, 2013. DOI: https://doi.org/10.2135/cropsci2012.09.0530.

Moraes, G. A. F. De; Menezes, N. L. de. Desempenho de sementes de soja sob condições diferentes de potencial osmótico. *Ciência Rural*, v. 33, n. 2, p. 219-226, 2003. DOI: https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000200007.

Pappalettere, L.; Bartolini, S.; Toffanin, A. Enhancement of tomato seed germination and growth parameters through seed priming with auxin-producing plant growth-promoting

bacteria strains. *Seeds*, v. 3, n. 3, p. 479-492, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/seeds3030032.

Parnell, J. J. *et al*. From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, art. 1110, 2016. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01110.

Pikovskaya, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, v. 17, p. 362-370, 1948.

R CORE TEAM. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024.

Sajid, M., Ahmed, S., Sardar, R., Ali, A.; Yasin, N. A. Role of polyethylene glycol to alleviate lead stress in Raphanus sativus. *PeerJ*, v. 13, n. 1, e18147, 2025. https://doi.org/10.7717/PEERJ.18147/SUPP-1.

Silva-Mann, R.; Nunes, V. V.; Rabbani, A. R. C.; Freitas, B. A. L. De; Candido, I. De J.; Souza, J. L. *Solução e processo para conservação de sementes recalcitrantes*. Depositante: Universidade Federal de Sergipe. BR 10 2021 009165-7 A2. Depósito: 11 maio 2021. Publicação: 16 nov. 2022.

Silva-Mann, R.; Vieira, M. E. O.; Nunes, V. V.; Oliveira, D. S. de; SANTOS, A. V. G. *Bioinsumo e processo de tratamento de sementes de soja*. Depositante: Universidade Federal de Sergipe. Pedido de patente de invenção BR 10 2025 018270 0. Depósito: 28 ago. 2025.

Souza, A. D. V.; Santos, D.; Rodrigues, A. A.; Zuchi, J.; Vieira, M. C.; Sales, J. F. Physical and physiological soybean seed qualities stored under different environmental conditions and storage bag depths. *Brazilian Journal of Biology*, v. 83, e277916, 2023. DOI: https://doi.org/10.1590/1519-6984.277916.

Tekrony, D. M.; Nelson, C.; Egli, D. B.; White, G. M. Predicting soybean seed germination during warehouse storage. *Seed Science and Technology*, v. 21, n. 1, p. 127-137, 1993.

Timmusk, S. *et al*. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, art. 49, 2017. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00049.

Timofeeva, A.; Galyamova, M.; Sedykh, S. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture. *Plants*, v. 11, n. 16, art. 2119, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/plants11162119.

Tiveron, A. P.; Rosalen, P. L.; Franchin, M.; Lacerda, R. C. C.; Bueno-Silva, B.; Benso, B.; Denny, C.; Ikegaki, M.; Alencar, S. M. de. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of south Brazilian organic propolis. *PLOS ONE*, v. 11, n. 11, e0165588, 2016. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165588.

Vitorino, L. C.; Silva, E. J. Da; Oliveira, M. S.; Silva, I. De O.; Santos, L. Da S.; Mendonça, M. A. C.; Oliveira, T. C. S.; Bessa, L. A. Effect of a *Bacillus velezensis* and *Lysinibacillus fusiformis*-based biofertilizer on phosphorus acquisition and grain yield of soybean. *Frontiers in Plant Science*, v. 15, art. 1433828, 2024. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1433828.

Wang, Y.; Zhou, E.; Yao, M.; Xue, D.; Zhao, N.; Zhou, Y.; Li, B.; Wang, K.; Miao, Y.; Gu, C.; Wang, X.; Wei, L. PEG-6000 priming improves aged soybean seed vigor via carbon metabolism, ROS scavenging, hormone signaling, and lignin synthesis regulation. *Agronomy*, v. 13, n. 12, art. 3021, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/agronomy13123021.

Xu, W.; Lu, H.; Yuan, Y.; Deng, Z.; Zheng, L.; Li, H. The antioxidant and anti-inflammatory effects of flavonoids from propolis via Nrf2 and NF-kB pathways. *Foods*, v. 11, n. 16, art. 2439, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/foods11162439.

Zuchi, J.; França-Neto, J. B.; Sediyama, C. S.; Lacerda Filho, A. F. De; Reis, M. S. Physiological quality of dynamically cooled and stored soybean seeds. *Journal of Seed Science*, v. 35, n. 3, p. 353-360, 2013. DOI: https://doi.org/10.1590/S2317-15372013000300012.

5. ARTIGO 2
IMERSÃO EM BIOINSUMO À BASE DE *Bacillus amyloliquefaciens* MODULA O VIGOR E A ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLÂNTULAS DE MILHO

RESUMO

O tempo de contato das sementes com bioinsumos pode influenciar a eficiência do tratamento e o estabelecimento inicial das plantas. Neste estudo, avaliou-se como a imersão de sementes do híbrido de milho AS 1850 PRO4 em um bioinsumo à base de *Bacillus amyloliquefaciens* influenciou a germinação, o vigor e a atividade de enzimas antioxidantes. As sementes foram submetidas ao contato imediato com o produto ou mantidas em imersão durante 2, 4 ou 6 h, além do controle sem tratamento. A germinação permaneceu acima de 95% e não diferiu entre os tratamentos. Entretanto, os períodos de imersão estiveram associados a diferentes padrões de crescimento das plântulas. Os dois primeiros componentes da Análise de Componentes Principais explicaram, conjuntamente, 85,1% da variação dos dados. Nessa análise, o tratamento de 4 h foi associado aos maiores comprimentos da parte aérea e total das plântulas. O contato imediato foi associado à maior área projetada e ao maior número de raízes, enquanto o tratamento de 2 h modificou a relação entre o crescimento radicular e o da parte aérea. Para a imersão durante 6 h, houve os menores valores para diversas características relacionadas ao vigor. Na avaliação enzimática dos tratamentos contrastantes, a atividade da ascorbato peroxidase foi maior após 6 h, a superóxido dismutase apresentou maior atividade no controle e a catalase não diferiu entre os tratamentos. Assim, o período de imersão influenciou o crescimento inicial e a resposta antioxidante das plântulas. Nas condições avaliadas, o período de 4 h favoreceu o crescimento das plântulas sem comprometer a germinação.

Palavras-chave: bioinsumos, análise de imagens, estresse oxidativo, tratamento de sementes, vigor.

5.1. Introdução

O milho (*Zea mays* L.) ocupa posição central na alimentação humana e animal e abastece diferentes cadeias industriais. Para expressar o potencial produtivo da cultura, é fundamental o estabelecimento rápido e uniforme do estande. Nesse processo, a qualidade das sementes e as práticas adotadas antes da semeadura desempenham papel determinante, pois influenciam a germinação, o vigor e a capacidade das plântulas de superar as condições adversas encontradas durante o estabelecimento.

O tratamento de sementes realizado na propriedade tem se expandido por permitir ao produtor ajustar os produtos, as doses e os métodos de aplicação às condições do sistema produtivo. Paralelamente, o uso de bioinsumos tem ampliado as possibilidades de aplicação localizada de microrganismos benéficos, promovendo o contato direto com as sementes e podendo reduzir a quantidade de inóculo necessária por unidade de área, em comparação com determinadas formas de aplicação no solo (Medeiros *et al.*, 2023; Castiglione *et al.*, 2021). Entretanto, a eficiência dessa prática não depende apenas do microrganismo utilizado. A composição do produto, a concentração do inóculo, a qualidade fisiológica do lote e o método de aplicação também podem influenciar a resposta das sementes.

Entre os microrganismos utilizados na agricultura, espécies do gênero *Bacillus* destacam-se pela capacidade de formar endósporos, pela estabilidade em formulações e pela diversidade de mecanismos associados à promoção do crescimento vegetal e ao controle de fitopatógenos (Dame; Rahman; Islam, 2021; Etesami; Jeong; Glick, 2023). Estirpes de *Bacillus amyloliquefaciens* podem produzir compostos relacionados à regulação do crescimento vegetal,

modificar a arquitetura radicular e favorecer as interações entre as plantas e a microbiota presente na região próxima às sementes (Idris *et al*., 2007; Poveda; González-Andrés, 2021). Essas respostas, contudo, variam entre estirpes, culturas e condições de aplicação.

Quando o bioinsumo é aplicado por imersão, o tratamento também promove a hidratação das sementes e compartilha características com o biocondicionamento. A absorção de água reativa o metabolismo, favorece a reorganização das membranas celulares e altera a produção de espécies reativas de oxigênio. Em concentrações controladas, essas moléculas participam da sinalização associada à germinação; entretanto, quando se acumulam excessivamente, podem provocar peroxidação lipídica, alterações em proteínas e enzimas e redução do vigor (Adetunji *et al*., 2021; Cortés *et al*., 2023). Enzimas como a superóxido dismutase, a ascorbato peroxidase e a catalase participam da regulação desse equilíbrio durante a germinação e o crescimento das plântulas.

Apesar do uso crescente de produtos biológicos à base de *Bacillus*, ainda são limitadas as informações sobre como o período de imersão das sementes em uma solução aerada contendo o bioinsumo influencia simultaneamente a germinação, a morfologia das plântulas e a atividade do sistema antioxidante. Partiu-se da hipótese de que períodos intermediários de contato favoreceriam o desenvolvimento inicial, enquanto uma exposição prolongada poderia alterar o equilíbrio oxidativo e comprometer o vigor. Assim, neste estudo, avaliaram-se os efeitos de diferentes períodos de imersão de sementes de milho do híbrido AS 1850 PRO4 em uma solução aerada contendo bioinsumo à base de *B. amyloliquefaciens* sobre a germinação, o vigor, a morfologia das plântulas e a atividade de enzimas antioxidantes.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Material vegetal e caracterização do bioinsumo

Foram utilizadas sementes de milho do híbrido AS 1850 PRO4, provenientes do lote UMH0076, com germinação inicial de 95%. Antes da instalação do primeiro experimento, as sementes foram submetidas à desinfestação superficial em solução de hipoclorito de sódio a 2% durante 1 min e, posteriormente, em álcool a 70% durante 1 min. Em seguida, foram enxaguadas três vezes com água destilada.

Utilizou-se o bioinsumo comercial BA Raiz, formulado à base de *Bacillus amyloliquefaciens*, com concentração declarada de 10^8 UFC mL^{-1}. O produto foi fornecido pela empresa Bioworld Soluções Regenerativas.

5.2.2. Tratamentos e sistema aerado de imersão

Os tratamentos foram constituídos por sementes não submetidas à imersão, utilizadas como controle, e por sementes colocadas em contato com o bioinsumo e imediatamente retiradas da solução, correspondendo ao tratamento de 0 h, ou mantidas em imersão por 2, 4 ou 6 h. Em cada tratamento, 800 sementes foram acondicionadas em recipiente de vidro com capacidade de 2 L, contendo uma solução composta por 400 mL de água destilada e 100 mL do bioinsumo. Durante o tratamento, a solução foi mantida a 28 °C e sob aeração contínua, fornecida por um minicompressor com vazão de 3 L h^{-1}. Ao término de cada período de imersão, as sementes foram retiradas da solução e mantidas em ambiente a 28 °C para secagem superficial, até não apresentarem umidade aparente na superfície.

5.2.3. Germinação e avaliação do vigor em diferentes tempos de imersão

Após a aplicação dos tratamentos, as sementes foram distribuídas em rolos de papel para germinação, previamente umedecidos com água destilada em volume equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram mantidos em germinador regulado a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro. A avaliação foi realizada no sétimo dia após a instalação do teste, determinando-se a porcentagem de plântulas normais conforme os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2025).

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e oito repetições de 25 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento.

5.2.4. Análise digital das plântulas

Cinco plântulas normais de cada repetição foram selecionadas aleatoriamente e analisadas por meio do sistema GroundEye® Série L. As imagens foram processadas utilizando-se o modelo de cores HSV, com valores de matiz entre 209,7 e 266,2, saturação entre 0,548 e 1,000 e brilho entre 0,000 e 0,842.

Foram determinados o comprimento da parte aérea, o comprimento da raiz principal e o comprimento total da plântula, além da área projetada, do número de raízes e da razão entre os comprimentos da raiz e da parte aérea. As cinco plântulas avaliadas em cada repetição foram consideradas subamostras, sendo a respectiva média utilizada como unidade observacional nas análises estatísticas.

5.2.5. Ensaio com tempos contrastantes de imersão

Com base nos resultados do primeiro experimento, foram selecionados os tratamentos controle, 4 h e 6 h, por apresentarem respostas contrastantes quanto ao vigor e à morfologia das plântulas. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% por 1 min e, em seguida, em álcool a 70% por 1 min. Posteriormente, foram lavadas três vezes com água destilada esterilizada.

Nos tratamentos de 4 e 6 h, as sementes foram mantidas em recipientes de vidro com capacidade de 2 L, contendo uma solução composta por 400 mL de água destilada e 100 mL do bioinsumo, sob aeração contínua de 3 L h^{-1} e à temperatura de 28 °C. As sementes do tratamento controle foram submetidas ao mesmo procedimento de desinfestação, mas não entraram em contato com o bioinsumo. Ao término de cada período de imersão, as sementes foram retiradas da solução e mantidas em ambiente a 28 °C para secagem superficial, até não apresentarem umidade aparente na superfície.

O teste de germinação e a análise digital das plântulas foram realizados conforme os procedimentos descritos anteriormente. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e oito repetições de 25 sementes. Foram realizados dois ensaios biologicamente independentes, mantendo-se as mesmas condições experimentais.

5.2.6. Proteínas totais e extração das enzimas antioxidantes

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976) e utilizado para normalizar as atividades enzimáticas. Amostras de 60 mg de plântulas de milho foram maceradas em nitrogênio líquido e submetidas a três extrações sucessivas com 350 µL de etanol nas concentrações de 100, 80 e 50% (v/v). Em cada etapa, o material foi homogeneizado, incubado a 70 °C por 20 min e centrifugado a 14.000 rpm por 5 min, a 4 °C.

Alíquotas de 5 µL do extrato foram adicionadas a 180 µL do reagente de Bradford em microplaca. A absorbância foi determinada a 595 nm em leitor Epoch-Biotek®, e os resultados foram estimados por curva padrão de albumina sérica bovina.

Para a extração enzimática, foram utilizadas três amostras biológicas independentes por tratamento. Cada amostra foi constituída por 200 mg de tecido fresco de plântulas com 7 dias, composta por 2 plântulas. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido, trituradas manualmente e, em seguida, homogeneizadas em 1,5 mL de tampão contendo fosfato de potássio 400 mM, pH 7,8, EDTA 10 mM e ácido ascórbico 200 mM. Após centrifugação a 13.000 rpm por 10 min, a 4 °C, o sobrenadante foi armazenado a -20 °C até as determinações.

5.2.7. Determinação das atividades antioxidantes

5.2.7.1. Ascorbato peroxidase

A atividade da ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) foi determinada conforme Nakano e Asada (1981), por meio do monitoramento da oxidação do ascorbato a 290 nm. A mistura reacional foi constituída por 9 µL do extrato enzimático, 90 µL de tampão fosfato de potássio 200 mM, pH 7,0, contendo ácido ascórbico 10 mM, 9 µL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 54 µL de água destilada, perfazendo um volume final de 162 µL por poço.

As leituras de absorbância foram realizadas em intervalos de 15 s, durante 3 min, a 30 °C. Cada amostra biológica foi analisada em triplicata técnica. A atividade enzimática foi calculada a partir da redução linear da absorbância por unidade de tempo, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do ascorbato de 2,8 mM^{-1} cm^{-1}, e expressa em µmol de ascorbato oxidado min^{-1} mg^{-1} de proteína.

5.2.7.2. Superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1) foi determinada conforme Beauchamp e Fridovich (1971), com base na capacidade da enzima de inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). A mistura reacional foi constituída por 10 µL do extrato enzimático e 190 µL de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, metionina 70 mM, EDTA 10 µM, NBT 1 mM e riboflavina 0,2 mM, perfazendo um volume final de 200 µL por poço.

A reação foi iniciada pela exposição das microplacas à iluminação artificial com intensidade de 100 µmol m^{-2} s^{-1}, durante 7 min, a 28 °C. Após esse período, a absorbância foi mensurada a 560 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para promover 50% de inibição da fotorredução do NBT. A atividade enzimática foi expressa em unidades de SOD por miligrama de proteína (U mg^{-1} de proteína).

5.2.7.3. Catalase

A atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6) foi determinada conforme Havir e McHale (1987), por meio do monitoramento da decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 240 nm. A mistura reacional foi constituída por 9 µL do extrato enzimático, 162 µL de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, e 9 µL de H_2O_2 250 mM, perfazendo um volume final de 180 µL por poço.

As leituras de absorbância foram realizadas em intervalos de 15 s, durante 3 min, a 30 °C. A atividade enzimática foi calculada a partir da redução linear da absorbância por unidade de tempo, utilizando-se o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 de 0,036 mM^{-1} cm^{-1}, e expressa em µmol de H_2O_2 decomposto min^{-1} mg^{-1} de proteína.

5.2.8. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas separadamente para o experimento com os tempos de contato com o bioinsumo, constituído por cinco tratamentos, e para o experimento com os três tratamentos contrastantes. As cinco plântulas avaliadas em cada repetição foram consideradas subamostras, sendo a respectiva média utilizada como unidade observacional nas análises.

A normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro–Wilk e pela inspeção dos gráficos quantil-quantil (Q-Q), enquanto a homogeneidade das variâncias foi verificada pela análise gráfica dos resíduos e pelo teste de Bartlett. Para as variáveis que atenderam aos pressupostos da análise paramétrica, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5%. Para as variáveis que não atenderam ao pressuposto de normalidade, empregou-se o teste de Kruskal–Wallis, seguido de comparações pareadas pelo teste de Wilcoxon, com ajuste dos valores de *p* para comparações múltiplas.

A germinação foi analisada com base no número de sementes que originaram plântulas normais e no número de sementes que não originaram plântulas normais em cada unidade experimental. Para isso, ajustou-se um modelo linear generalizado misto (GLMM), com distribuição binomial e função de ligação logit. O tratamento foi considerado efeito fixo, enquanto o ensaio biologicamente independente foi incluído como efeito aleatório quando aplicável.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com as médias das unidades experimentais. Previamente, as variáveis foram centralizadas e escalonadas para média igual a zero e variância igual a um, a fim de eliminar os efeitos decorrentes das diferenças de escala entre os atributos avaliados. A PCA foi obtida por decomposição em valores singulares (SVD), utilizando-se os pacotes FactoMineR e factoextra para o processamento dos dados e a elaboração dos gráficos biplot. Todas as análises foram realizadas no ambiente estatístico R (R Core Team, 2023).

5.3. Resultados

5.3.1. Germinação das sementes

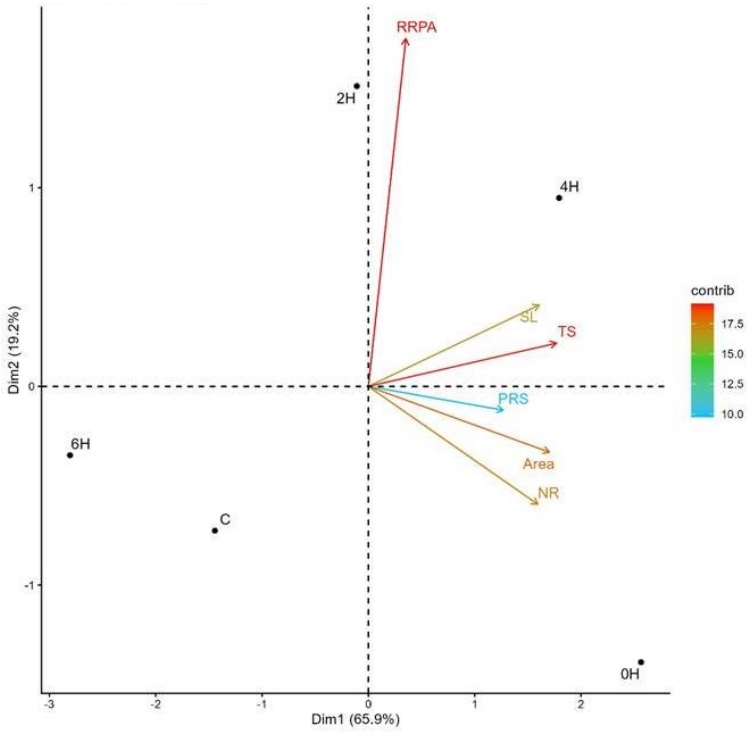
A germinação permaneceu acima de 95% em todos os tratamentos, sem diferença significativa entre os tempos de contato das sementes com o bioinsumo ($p > 0,05$). Esses resultados indicam que, nas condições avaliadas, tanto o contato imediato quanto a permanência das sementes na solução aerada por até 6 h não comprometeram a formação de plântulas normais.

5.3.2. Vigor e padrões morfológicos em diferentes tempos de imersão

Embora a germinação tenha permanecido estável, os tempos de contato com o bioinsumo apresentaram padrões distintos quanto às características de crescimento das plântulas. Os dois primeiros componentes principais explicaram conjuntamente 85,1% da variância total, dos quais 65,9% foram explicados pelo primeiro componente (CP1) e 19,2% pelo segundo (CP2).

Os tratamentos de 4 h e 0 h foram projetados no lado positivo do CP1, na mesma direção da maioria dos vetores correspondentes às características morfológicas. O tratamento de 4 h posicionou-se no quadrante superior direito, próximo aos vetores de comprimento total da plântula (TS) e comprimento da parte aérea (SL). O tratamento de 0 h, por sua vez, foi projetado no quadrante inferior direito, associado aos vetores de área projetada, número de raízes (NR) e comprimento da raiz principal (PRS). O tratamento de 2 h posicionou-se no quadrante superior esquerdo, na direção do vetor correspondente à razão entre os comprimentos da raiz e da parte aérea (RRPA). Em contraste, o controle (C) e o tratamento de 6 h foram projetados no lado negativo do CP1, em direção oposta aos vetores da maioria das características de crescimento (Figura 1).

Figura 1 - Análise de componentes principais das características de vigor de plântulas de milho oriundas de sementes submetidas ao controle sem tratamento (C), contato imediato (0 h) ou imersão por 2, 4 e 6 h em bioinsumo à base de *Bacillus amyloliquefaciens*.



RRPA: razão entre raiz e parte aérea; SL: comprimento da parte aérea; TS: comprimento total; PRS: comprimento da raiz principal; NR: número de raízes; Área: área projetada da plântula.

Os resultados das análises univariadas corroboraram os padrões observados na análise multivariada. De modo geral, os tratamentos de 0, 2 e 4 h não diferiram significativamente entre si quanto à maioria das características morfológicas. A única exceção foi a área projetada, para a qual o tratamento de 0 h apresentou média significativamente superior à observada no tratamento de 4 h. Por sua vez, o tratamento de 6 h apresentou comportamento semelhante ao controle e diferiu dos demais tratamentos, com menores médias de área projetada e comprimento total da plântula.

Tabela 1. Características morfológicas de plântulas de milho oriundas de sementes submetidas a diferentes tempos de imersão em bioinsumo à base de *Bacillus amyloliquefaciens*. Os valores representam média ± erro-padrão.

Trat.	Área (cm²)	Parte aérea (cm)	RRPA	Raiz principal (cm)	Tamanho Total (cm)	Nº de raízes
C	6,68±0,36 c	6,32±0,38 c	2,48±0,17 b	13,96±0,47 a	20,28±0,67 bc	53,09±5,56 ab
0 h	12,97±0,57 a	9,25±0,29 a	1,57±0,10 a	14,04±0,74 a	23,30±0,73 ab	75,78±11,01 a
2 h	8,77±0,92 abc	8,56±0,53 ab	6,14±0,46ab	12,86±0,94 a	21,42±1,06 abc	51,66±6,48 ab
4 h	10,04±0,47 b	9,21±0,15 a	1,72±0,05ab	14,98±0,67 a	24,19±0,73 a	55,63±11,67 ab
6 h	6,54±0,22c	6,82±0,45 bc	2,03±0,20ab	12,53±0,79 a	19,35±0,94 c	32,64±8,78 b

C: Controle; RRPA: razão entre os comprimentos da raiz e da parte aérea. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si. As variáveis área e RRPA foram avaliadas pelo teste de Wilcoxon, e as demais variáveis, pelo teste de Tukey, ambos ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

As diferenças morfológicas observadas entre os tratamentos podem ser visualizadas na Figura 2, que apresenta plântulas de milho provenientes de sementes submetidas a diferentes tempos de contato com o bioinsumo à base de *B. amyloliquefaciens*.

Figura 2 - Plântulas de milho oriundas de sementes submetidas a bioinsumo à base de *Bacillus amyloliquefaciens*.

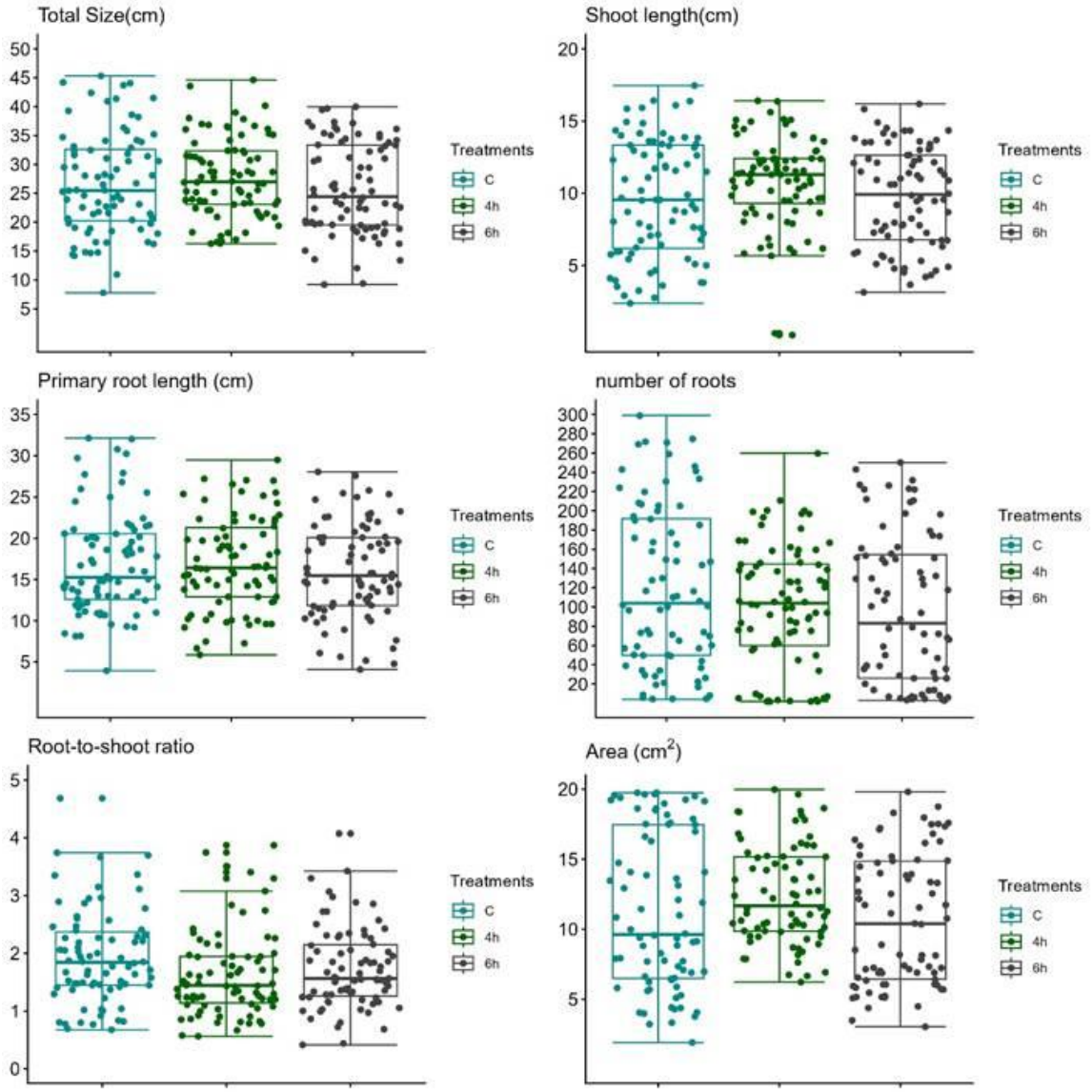


5.3.3. Vigor das plântulas em tempos contrastantes

Na comparação entre o controle e os tempos de exposição de 4 e 6 h, as plântulas provenientes de sementes submetidas ao tratamento de 4 h apresentaram medianas numericamente superiores às observadas no tratamento de 6 h para o comprimento total da plântula, o comprimento da parte aérea, o comprimento da raiz principal e a área projetada. Para o número de raízes, a distribuição dos valores no tratamento de 4 h foi semelhante à observada no controle. Além disso, o tratamento de 4 h apresentou menor amplitude interquartil para a

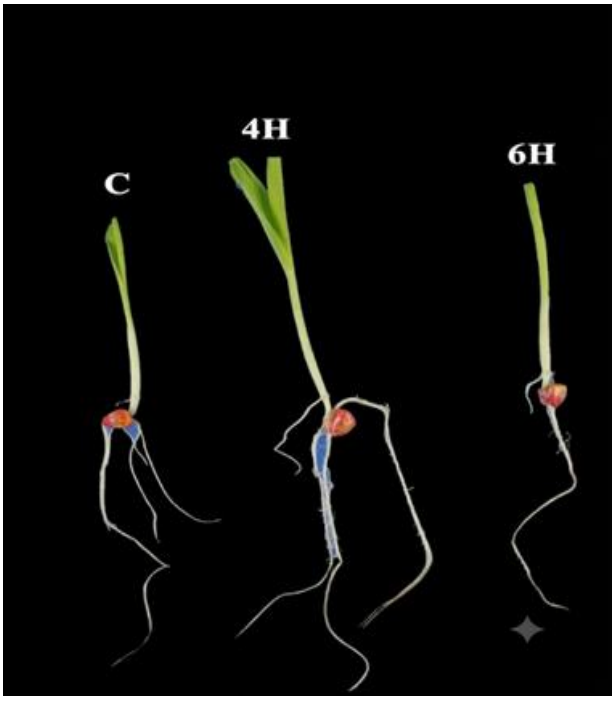
maioria das características avaliadas, exceto para o comprimento da raiz principal, indicando menor dispersão dos dados e maior uniformidade de crescimento nessa condição (Figura 3).

Figura 3 - Distribuição das características morfológicas de plântulas de milho nos tratamentos controle (C), 4 h e 6 h. Cada ponto representa uma plântula analisada.



A distribuição dos dados evidencia ampla sobreposição entre os tratamentos, mas indica que o período de 4 h proporcionou, de modo geral, maior crescimento e menor dispersão para a maioria das características avaliadas. Esse tratamento apresentou medianas mais elevadas para o comprimento total, o comprimento da parte aérea, o comprimento da raiz principal e a área projetada, especialmente em comparação ao tratamento de 6 h. Em contrapartida, as plântulas do tratamento de 6 h apresentaram maior variabilidade e menores valores centrais para algumas características, sem evidenciar vantagem em relação ao controle. Esses resultados sugerem que o contato com o bioinsumo por 4 h pode favorecer o crescimento mais uniforme das plântulas, enquanto o prolongamento da imersão por 6 h não proporciona benefício morfológico adicional (Figura 4).

Figura 4 - Plântulas de milho oriundas dos tratamentos controle (C), 4 h e 6 h de imersão em bioinsumo à base de *Bacillus amyloliquefaciens*.

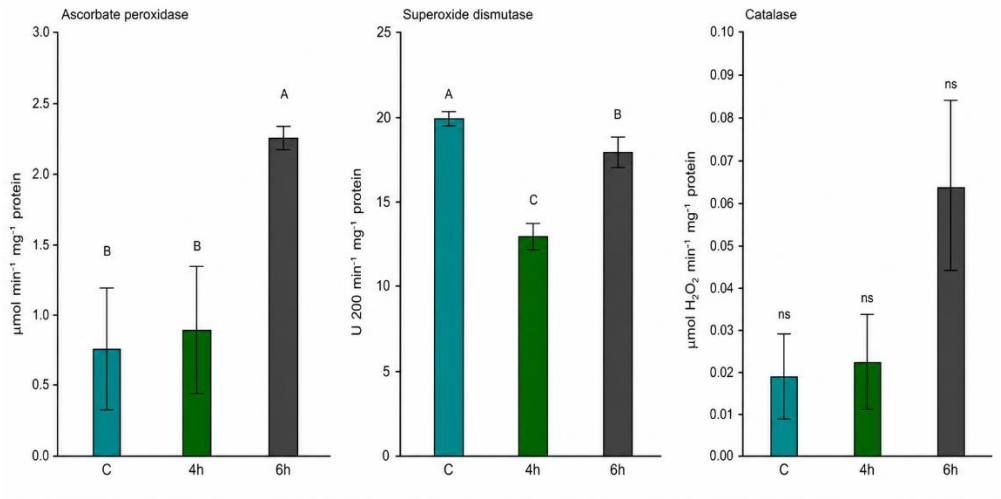


A avaliação visual das plântulas representativas evidencia diferenças na arquitetura e no desenvolvimento dos sistemas aéreo e radicular entre os tratamentos. A plântula proveniente do tratamento de 4 h apresentou parte aérea mais desenvolvida e sistema radicular mais extenso e ramificado, enquanto a plântula do tratamento de 6 h exibiu menor desenvolvimento radicular. O controle apresentou padrão intermediário. Essa representação visual é coerente com as tendências observadas nas análises morfológicas, mas possui caráter exclusivamente ilustrativo, uma vez que as conclusões devem ser fundamentadas no conjunto de plântulas e nas unidades experimentais avaliadas.

5.3.4. Atividade das enzimas antioxidantes

Os tempos de imersão influenciaram de maneira distinta as atividades das enzimas antioxidantes. A atividade da ascorbato peroxidase (APX) foi maior após 6 h de imersão, enquanto a superóxido dismutase (SOD) apresentou maior atividade no controle e menor atividade no tratamento de 4 h. A atividade da catalase (CAT) aumentou numericamente com o prolongamento do período de imersão; entretanto, não foram detectadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Figura 5).

Figura 5 - Atividade da ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em plântulas de milho em bioinsumo à base de *Bacillus amyloliquefaciens*.



O padrão enzimático observado sugere que os períodos de 4 e 6 h desencadearam respostas fisiológicas distintas. No tratamento de 4 h, a menor atividade da SOD, associada à manutenção da APX em nível semelhante ao controle, coincidiu com o melhor desempenho morfológico das plântulas. Esse resultado pode indicar menor demanda de ativação do sistema antioxidante nessa condição.

Em contraste, o tratamento de 6 h apresentou aumento expressivo da atividade da APX e atividade intermediária da SOD, o que sugere maior necessidade de remoção do H_2O_2 gerado durante o metabolismo celular. Embora a CAT tenha apresentado valor numericamente mais elevado após 6 h, a variabilidade dos dados não permitiu confirmar diferença significativa entre os tratamentos. Assim, a elevação da APX após 6 h pode representar uma resposta compensatória ao prolongamento da imersão; entretanto, essa interpretação deve ser confirmada por indicadores diretos de estresse oxidativo, como os teores de H_2O_2 e malondialdeído.

5.4. Discussão

A manutenção da germinação acima de 95% demonstra que a imersão das sementes em solução aerada por até 6 h não comprometeu sua capacidade de originar plântulas normais. Por outro lado, a ausência de incremento significativo em relação ao controle pode estar relacionada à elevada qualidade fisiológica inicial do lote, que apresentava 95% de germinação. Nessas condições, a proximidade do potencial máximo de germinação reduz a possibilidade de detectar benefícios adicionais decorrentes do condicionamento, caracterizando um possível efeito teto (Ma *et al*., 2024; Zhu *et al*., 2021).

A estabilidade da germinação, contudo, não significou ausência de respostas ao tratamento. Os tempos de contato com o bioinsumo estiveram associados a diferentes padrões de crescimento e de distribuição entre os sistemas radicular e aéreo. Na análise multivariada, o tratamento de 0 h foi projetado na direção dos vetores correspondentes à área projetada, ao número de raízes e ao comprimento da raiz principal. Além disso, apresentou área projetada superior à observada após 4 h. Esses resultados sugerem que mesmo um contato breve com o bioinsumo pode ter sido suficiente para influenciar o crescimento inicial das plântulas.

Estirpes de *Bacillus amyloliquefaciens* podem produzir ácido indolacético e outros metabólitos associados à promoção do crescimento, além de modular a expressão de genes relacionados à expansão celular e à arquitetura do sistema radicular (Idris *et al*., 2007; Irizarry; White, 2018). Tais efeitos podem estar relacionados à produção de compostos com atividade semelhante à de fitormônios, incluindo auxinas, e à alteração de processos fisiológicos

envolvidos na divisão e no alongamento celular (Idris et al., 2007; Devi et al., 2025; Luo et al., 2026). Nas raízes, essas respostas podem favorecer o alongamento, a formação de raízes laterais e o desenvolvimento de pelos radiculares, ampliando a superfície de exploração do substrato (Bhosale et al., 2018; Jan et al., 2024). Esses mecanismos constituem hipóteses plausíveis para explicar parte das alterações morfológicas observadas, embora a produção de fitormônios, a colonização das sementes e a expressão gênica não tenham sido avaliadas neste estudo.

A projeção do tratamento de 2 h na direção do vetor correspondente à razão raiz/parte aérea indica maior investimento relativo no sistema radicular. Esse padrão não deve ser interpretado necessariamente como redução do vigor, mas como uma possível alteração na alocação inicial de recursos entre raízes e parte aérea. O estágio de hidratação alcançado no momento da interrupção do tratamento pode ter contribuído para essa resposta, uma vez que a entrada de água e a reativação do metabolismo ocorrem progressivamente durante a embebição (Upretee; Bandara; Tanino, 2024).

O tratamento de 4 h apresentou o padrão mais favorável de crescimento, especialmente quanto ao comprimento da parte aérea, ao comprimento total da plântula e à uniformidade da maioria das características avaliadas. Em contraste, a imersão por 6 h não proporcionou benefícios morfológicos adicionais e apresentou desempenho semelhante ao controle para algumas variáveis. Como apenas um período superior a 4 h foi avaliado, não é possível estabelecer um limite fisiológico preciso nem afirmar que períodos mais prolongados sejam necessariamente prejudiciais. Ainda assim, os resultados demonstram que o aumento do tempo de contato com o bioinsumo não implica, obrigatoriamente, melhoria progressiva do desempenho das sementes.

A maior atividade da APX após 6 h sugere maior mobilização da via responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio. A APX possui elevada afinidade por esse composto e integra o ciclo ascorbato–glutationa, enquanto a CAT atua de maneira mais expressiva quando o H_2O_2 se encontra em concentrações mais elevadas (Sofo *et al*., 2015; Li, 2023). Embora a atividade da CAT tenha aumentado numericamente com o prolongamento da imersão, a diferença entre os tratamentos não foi significativa. Portanto, não é possível concluir que essa enzima tenha sido estimulada pelo maior tempo de contato com o bioinsumo.

A SOD apresentou maior atividade no controle e menor atividade após 4 h. Essa enzima catalisa a conversão do radical superóxido em H_2O_2 e participa tanto da defesa antioxidante quanto da sinalização associada à germinação e ao crescimento inicial (Puntarulo *et al*., 1991; Singh; Chaudhuri; Kar, 2014). A menor atividade observada após 4 h pode indicar menor demanda pela dismutação do superóxido ou uma regulação distinta do metabolismo oxidativo. Entretanto, a atividade isolada das enzimas não permite determinar diretamente o estado oxidativo das plântulas. Para isso, seriam necessárias avaliações complementares, como a quantificação de H_2O_2, radical superóxido, malondialdeído e antioxidantes não enzimáticos.

Em conjunto, os resultados indicam que 4 h foi o período que proporcionou a resposta mais equilibrada nas condições avaliadas, conciliando manutenção da germinação, maior crescimento e menor dispersão de várias características morfológicas. Contudo, sua recomendação prática requer validação em outros lotes e genótipos, além de testes de emergência em substrato, crescimento em condições de casa de vegetação e desempenho em campo. Também são necessários estudos que confirmem a colonização das sementes por *B. amyloliquefaciens* e esclareçam os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos nessa resposta.

5.5. Conclusão

A imersão das sementes do híbrido AS 1850 PRO4 em bioinsumo aerado à base de *Bacillus amyloliquefaciens* não altera a germinação, mas modifica o crescimento e a atividade antioxidante das plântulas. A imersão no bioinsumo e a embebição por um período de até 4 h promove o crescimento, uniformidade e manutenção do vigor, enquanto o período de 6 h está

associado à redução de várias características de crescimento e a uma maior atividade da ascorbato peroxidase. Os resultados aqui expostos colaboram com futuras investigações para a padronização de tratamentos de sementes de milho com bioinsumos.

5.6. Referências Bibliográficas

Adetunji, A. E.; Adetunji, T. L.; Varghese, B.; Sershen; Pammenter, N. W. Oxidative stress, ageing and methods of seed invigoration: an overview and perspectives. *Agronomy*, v. 11, n. 12, art. 2369, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/agronomy11122369.

Beauchamp, C.; Fridovich, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971. DOI: https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8.

Bhosale, R. *et al.* A mechanistic framework for auxin dependent Arabidopsis root hair elongation to low external phosphate. *Nature Communications* 2018 9:1, v. 9, n. 1, p. 1409-, 12 abr. 2018. DOI: https://doi.org/10.1038/s41467-018-04281-x

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976. DOI: https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária. *Regras para análise de sementes*. Brasília, DF: MAPA, 2025.

Castiglione, A. M.; Mannino, G.; Contartese, V.; Bertea, C. M.; Ertani, A. Microbial biostimulants as response to modern agriculture needs: composition, role and application of these innovative products. *Plants*, v. 10, n. 8, art. 1533, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/plants10081533.

Cortés, A. H.; Barba-Espín, G.; Diaz-Vivancos, P.; Corbineau, F.; Taskiran-Özbingöl, N.; El-Maarouf-Bouteau, H. Improvement of seed quality by priming: concept and biological basis. *Seeds*, v. 2, n. 1, p. 101-115, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/seeds2010008.

Dame, Z. T.; Rahman, M.; Islam, T. Bacilli as sources of agrobiotechnology: recent advances and future directions. *Green Chemistry Letters and Reviews*, v. 14, n. 2, p. 245-270, 2021. DOI: https://doi.org/10.1080/17518253.2021.1905080.

DEVI, T. S.; VIJAY, K.; MYTHILI, R.; WADAAN, M. A.; MANIVINOTH, V.; KIM, W.; KAVITHA, T. Optimized Production and Characterization of Auxin by Bacillus amyloliquefaciens (TSP11) for Plant Growth Promotion. *Journal of Basic Microbiology*, v. 65, n. 5, p. e70010, 1 maio 2025.DOI: **https://doi.org/10.1002/jobm.70010**

Etesami, H.; Jeong, B. R.; Glick, B. R. Biocontrol of plant diseases by *Bacillus* spp. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 126, art. 102048, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102048.

Havir, E. A.; Mchale, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987. DOI: https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450.

Idris, E. S. E.; Iglesias, D. J.; Talon, M.; Borriss, R. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v. 20, n. 6, p. 619-626, 2007. DOI: https://doi.org/10.1094/MPMI-20-6-0619.

Irizarry, I.; White, J. F. *Bacillus amyloliquefaciens* alters gene expression, ROS production and lignin synthesis in cotton seedling roots. *Journal of Applied Microbiology*, v. 124, n. 6, p. 1589-1603, 2018. DOI: https://doi.org/10.1111/jam.13744.

JAN, M. *et al.* Modulating root system architecture: cross-talk between auxin and phytohormones. *Frontiers in Plant Science*, v. 15, p. 1343928, 8 fev. 2024. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1343928

Li, S. Novel insight into functions of ascorbate peroxidase in higher plants: more than a simple antioxidant enzyme. *Redox Biology*, v. 64, art. 102789, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102789.

LUO, H.; HU, Y.; SHEN, H.; ZHANG, X.; LI, N. Promotion of plant growth by endophyte Bacillus amyloliquefaciens N3 through modulation of auxin translocation under nitrate-limited conditions. *Frontiers in Plant Science*, v. 17, p. 1775125, 13 mar. 2026. DOI: https://doi.org/10.3389/fpls.2026.1775125

Ma, L.; Wei, J.; Han, G.; Sun, X.; Yang, X. Seed osmopriming with polyethylene glycol enhances seed germination and seedling physiological traits of *Coronilla varia* L. under water stress. *PLOS ONE*, v. 19, n. 5, e0303145, 2024. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0303145.

Medeiros, J. C.; Carvalho, E. R.; Andrade, D. B. De; Moraes, L. F. De S.; Lima, J. M. E.; Massa, M. A. F. Quality of corn seed industrial seed treatment and on-farm treatment in Brazilian agribusiness. *Journal of Seed Science*, v. 45, e202345017, 2023. DOI: https://doi.org/10.1590/2317-1545v45268856.

Nakano, Y.; Asada, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

Poveda, J.; González-Andrés, F. *Bacillus* as a source of phytohormones for use in agriculture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, n. 23, p. 8629-8645, 2021. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-021-11492-8.

Puntarulo, S.; Galleano, M.; Sanchez, R. A.; Boveris, A. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1074, n. 2, p. 277-283, 1991. DOI: https://doi.org/10.1016/0304-4165(91)90164-C.

R Core Team. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2023. Disponível em: https://www.R-project.org/. Acesso em: 09 jul 2026.

Singh, K. L.; Chaudhuri, A.; Kar, R. K. Superoxide and its metabolism during germination and axis growth of *Vigna radiata* seeds. *Plant Signaling & Behavior*, v. 9, n. 8, e29278, 2014. DOI: https://doi.org/10.4161/psb.29278.

Sofo, A.; Scopa, A.; Nuzzaci, M.; Vitti, A. Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n. 6, p. 13561-13578, 2015. DOI: https://doi.org/10.3390/ijms160613561.

Upretee, P.; Bandara, M. S.; Tanino, K. K. The role of seed characteristics on water uptake preceding germination. *Seeds*, v. 3, n. 4, p. 559-574, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/seeds3040038.

Zhu, Z. H.; Sami, A.; Xu, Q. Q.; Wu, L. L.; Zheng, W. Y.; Chen, Z. P.; Jin, X. Z.; Zhang, H.; Li, Y.; Yu, Y.; Zhou, K. J. Effects of seed priming treatments on germination and development of two rapeseed varieties under low temperature and drought. *PLOS ONE*, v. 16, n. 9, e0257236, 2021. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257236.

6. ARTIGO 3

Composição taxonômica e caracterização funcional *in vitro* de culturas microbianas associadas a endocarpos de umbu e a crescimento espontâneo em cultivo de *Macrophomina phaseolina*

RESUMO

A prospecção de culturas microbianas provenientes de nichos pouco explorados pode revelar funções relevantes para a agricultura; entretanto, seu aproveitamento depende do conhecimento de sua composição taxonômica e de sua segurança biológica. Neste estudo, foram caracterizadas e avaliadas as culturas B6 e EJ115, obtidas, respectivamente, de endocarpos de frutos de umbu e de crescimento espontâneo em placas contendo *Macrophomina phaseolina*. Foram avaliados o crescimento microbiano, a morfologia celular, o antagonismo contra *M. phaseolina*, os efeitos sobre o desenvolvimento inicial de plântulas de feijão e soja, a solubilização de fosfato inorgânico e a formação de biofilme. Na cultura com melhor desempenho funcional, investigou-se, por reação em cadeia da polimerase, a presença dos genes *phoC* e *phoD*, relacionados à mineralização do fósforo orgânico. A composição taxonômica foi determinada por meio do sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossômico *16S*. Os dados foram analisados por modelos lineares e modelos lineares generalizados mistos, adotando-se o nível de significância de 5%. Ambas as culturas reduziram o crescimento de *M. phaseolina*, com maior efeito antagônico promovido por EJ115. Quando aplicadas diretamente às sementes, B6 e EJ115 reduziram a germinação do feijão, embora esse efeito tenha sido menos acentuado com EJ115. Em soja, EJ115 apresentou desempenho superior ao de B6. As duas culturas solubilizaram fosfato inorgânico, sem diferença significativa entre elas. B6 apresentou fraca formação de biofilme, enquanto EJ115 não apresentou essa capacidade nas condições avaliadas. Na cultura EJ115, não houve amplificação definida de *phoC*, enquanto a PCR direcionada a *phoD* produziu múltiplos fragmentos, não permitindo confirmar a presença específica desse gene. O sequenciamento revelou que ambas eram culturas bacterianas mistas. Em B6, as maiores proporções de sequências foram atribuídas a *Azospirillum* (37,76%) e *Serratia* (28,35%), enquanto, em EJ115, predominaram *Bacillus* (67,33%) e *Staphylococcus* (30,94%). Os resultados demonstram que as culturas apresentam atividades funcionais de interesse *in vitro*. Contudo, sua composição mista impede a indicação para uso agrícola antes do isolamento de seus componentes, da identificação taxonômica em maior resolução e da realização de avaliações específicas de biossegurança.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max*, solubilização de fósforo, controle biológico, perfil taxonômico.

6.1. Introdução

A busca por sistemas agrícolas mais sustentáveis tem ampliado o interesse por microrganismos capazes de favorecer a nutrição e o estabelecimento das plantas e reduzir os danos provocados por fitopatógenos. No Brasil, a instituição do Programa Nacional de Bioinsumos, em 2020, e a publicação da Lei nº 15.070, em 2024, refletem a importância dessas tecnologias e estabelecem bases para sua produção, seu registro, sua comercialização e seu uso

A expansão do setor exige o conhecimento preciso da identidade, da pureza e da segurança dos materiais biológicos utilizados. Atividades funcionais detectadas *in vitro*, como antagonismo a fitopatógenos, mobilização de nutrientes ou estímulo ao desenvolvimento vegetal, constituem evidências iniciais de interesse, mas não comprovam a segurança microbiológica de uma cultura. Por essa razão, os procedimentos oficiais incluem a confirmação da identidade do microrganismo declarado e a avaliação da pureza microbiológica.

Na prospecção microbiana, a seleção inicial geralmente se baseia na aparência das colônias, na morfologia celular e nas respostas funcionais. Esses critérios, entretanto, não asseguram a presença de uma única população, pois microrganismos distintos podem apresentar características fenotípicas semelhantes. A presença não intencional de diferentes populações compromete a atribuição das atividades observadas e pode representar risco biológico. Assim, culturas de composição desconhecida devem ter seus componentes isolados, identificados e avaliados quanto à biossegurança antes de qualquer aplicação agrícola. A detecção de microrganismos não alvo em inoculantes produzidos sob controle microbiológico limitado reforça a importância dessa caracterização (Frempong et al., 2024).

O sequenciamento do gene que codifica o RNA ribossômico *16S* permite identificar os principais grupos bacterianos presentes e revelar misturas não detectadas por métodos fenotípicos. Entretanto, mesmo o sequenciamento de regiões próximas à extensão total desse gene pode não diferenciar espécies filogeneticamente próximas. Essa limitação é relevante quando são detectados gêneros que incluem espécies com características ecológicas, biotecnológicas e patogênicas distintas. Nesses casos, são necessários o isolamento dos componentes, a identificação em maior resolução e testes específicos de biossegurança (Aftab et al., 2025).

Plantas nativas do semiárido constituem fontes potenciais de microrganismos com funções de interesse agrícola. A Caatinga apresenta diversidade microbiana ainda pouco explorada, e o umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arruda) representa uma espécie promissora para a investigação de microrganismos associados aos frutos e endocarpo.(Tacca, De et al., 2026) . Da mesma forma, o crescimento bacteriano espontâneo em cultivos de fitopatógenos pode revelar interações antagônicas, mas deve ser tratado inicialmente como uma ocorrência de origem, composição e segurança desconhecidas.

Entre os fitopatógenos de importância agrícola, *Macrophomina phaseolina* apresenta ampla gama de hospedeiros, persistência no solo por meio de microescleródios e difícil manejo. Esse fungo está associado à podridão-do-carvão em diversas culturas, com maior severidade frequentemente observada sob temperaturas elevadas e baixa disponibilidade hídrica (Marquez *et al*., 2021). A prospecção de microrganismos antagônicos pode contribuir para seu manejo, desde que a identidade e a segurança dos materiais sejam demonstradas.

Neste estudo, foram avaliadas as culturas B6 e EJ115, obtidas, respectivamente, de endocarpos de frutos de umbu e de crescimento bacteriano espontâneo em placas contendo *M. phaseolina*. O objetivo foi caracterizar sua composição taxonômica e suas propriedades funcionais, incluindo o antagonismo ao fitopatógeno, os efeitos sobre sementes e plântulas, a solubilização de fosfato inorgânico, a presença de genes associados à mineralização do fósforo orgânico e a formação de biofilme. Buscou-se, assim, verificar se a composição dessas culturas permitia a continuidade da prospecção, considerando a necessidade de isolamento, identificação taxonômica e avaliação de biossegurança antes de qualquer indicação para uso agrícola.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Origem e manutenção das culturas bacterianas

As culturas bacterianas B6 e EJ115 integram a coleção de microrganismos do Laboratório de Ensino em Tecnologia de Sementes (LENTES) da Universidade Federal de Sergipe. Para conservação, foram armazenadas em glicerol a -20 °C. Antes de cada experimento, as culturas foram reativadas em meio Luria-Bertani (LB) e incubadas a 28 ± 2 °C por 48 h.

A cultura B6 foi obtida do arilo esponjoso associado a endocarpos de frutos de umbu (*Spondias tuberosa* Arruda), coletados de plantas localizadas nos municípios de Poço Verde e Gararu, Sergipe, Brasil. A cultura EJ115 foi recuperada após o surgimento espontâneo de crescimento bacteriano em placas contendo *M. phaseolina*. O isolado, originalmente obtido de

plantas de feijão, foi cedido pelo Laboratório de Fitopatologia da Embrapa Tabuleiros Costeiros.

Como a caracterização molecular revelou a presença de mais de um táxon bacteriano em ambas as amostras, B6 e EJ115 foram tratadas, ao longo deste estudo, como culturas bacterianas mistas, e não como estirpes ou isolados puros.

6.2.2. Crescimento microbiano e caracterização morfotintorial

As culturas B6 e EJ115 foram inoculadas separadamente em 20 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido e incubadas a 28 °C, sob agitação orbital de 140 rpm, por 48 h. Após a incubação, a densidade óptica das suspensões foi mensurada a 600 nm em espectrofotômetro e ajustada para DO_{600} de 0,5.

As suspensões padronizadas foram submetidas a diluições seriadas decimais até 10^{-7}. Alíquotas de 100 µL de cada diluição foram distribuídas, em triplicata, em placas contendo meio LB sólido. As placas foram incubadas em câmara de crescimento do tipo BOD, a 28 °C, por 24 h. Após a incubação, as colônias foram contadas, e a concentração de células viáveis foi expressa em unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC mL^{-1}). Foram realizadas três repetições biológicas independentes, cada uma analisada em triplicata técnica.

A caracterização morfotintorial foi realizada por meio da coloração de Gram. Os esfregaços foram preparados em lâminas de vidro, secos ao ar e fixados pelo calor. Em seguida, foram corados com cristal violeta por 1 min, tratados com lugol por 1 min, descoloridos com álcool–acetona por 30 s e contracorados com fucsina de Gram por 1 min. Entre as etapas, as lâminas foram lavadas com água destilada.

As lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo claro, utilizando-se objetiva de imersão de 100× e aumento total de 1.000×. A coloração de Gram foi utilizada como análise preliminar da morfologia celular e do padrão de coloração das populações presentes nas culturas, sem finalidade de identificação taxonômica.

6.2.3. Antagonismo *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina*

A atividade antagônica das culturas B6 e EJ115 contra *M. phaseolina* foi avaliada por meio do confronto direto em placas de Petri contendo meio batata–dextrose–ágar (BDA). Um disco de micélio com 5 mm de diâmetro, retirado da margem de uma colônia do fungo em crescimento ativo, foi depositado próximo a uma das bordas da placa. Na borda oposta, B6 ou EJ115 foi inoculada por estrias em formato de “T”. No tratamento controle, as placas receberam apenas o disco de *M. phaseolina*.

As placas foram incubadas em câmara de crescimento do tipo BOD, a 28 ± 2 °C, no escuro, durante sete dias. Após esse período, o crescimento do fungo foi determinado pela área ocupada pelo micélio em cada placa.

As imagens foram obtidas no sistema GroundEye® e analisadas no software ImageJ®. Para a conversão das medidas em pixels, utilizou-se uma escala previamente calibrada de 145 pixels cm^{-1}. A área de crescimento micelial foi expressa em centímetros quadrados.

6.2.4. Germinação de sementes em cocultivo direto

Os efeitos do contato direto com as culturas B6 e EJ115 sobre a germinação de sementes de feijão-comum foram avaliados em placas de Petri contendo meio Luria-Bertani (LB) sólido. Antes da instalação do experimento, as sementes foram submetidas à desinfestação superficial em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 1 min e, em seguida, em álcool a 70% pelo mesmo período. Posteriormente, foram lavadas três vezes com água destilada esterilizada.

As culturas microbianas foram previamente inoculadas nas placas e incubadas até o estabelecimento do crescimento no meio. Em seguida, cinco sementes foram distribuídas sobre a superfície de cada placa, em contato direto com o crescimento microbiano. No tratamento controle, as sementes foram mantidas em meio LB não inoculado, sob as mesmas condições experimentais.

As placas foram incubadas a 28 °C durante oito dias. Após esse período, foram registrados os números de sementes germinadas e não germinadas em cada placa. Os resultados foram apresentados em porcentagem de germinação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e dez repetições. Cada placa foi considerada uma unidade experimental, e as cinco sementes nela distribuídas foram consideradas subamostras.

6.2.5. Efeito dos compostos voláteis sobre a germinação

O efeito dos compostos voláteis associados às culturas B6 e EJ115 sobre a germinação de sementes de feijão-comum foi avaliado em placas de Petri bipartidas. Em um dos compartimentos, as culturas foram inoculadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido. No compartimento oposto, cinco sementes previamente desinfestadas foram distribuídas sobre o mesmo meio, sem contato direto com as culturas microbianas. As placas foram vedadas com Parafilm® para limitar a dispersão dos compostos voláteis e manter o sistema fechado. No tratamento controle, o compartimento destinado à cultura recebeu apenas meio LB não inoculado.

As placas foram incubadas a 28 °C durante oito dias. Após esse período, foram registrados os números de sementes germinadas e não germinadas em cada placa. Os resultados foram apresentados em porcentagem de germinação.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e dez repetições. Cada placa bipartida foi considerada uma unidade experimental, e as cinco sementes nela distribuídas foram consideradas subamostras.

6.2.6. Efeito na germinação de sementes de soja

As culturas B6 e EJ115 foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) líquido por 24 h, a 28 °C, sob agitação orbital de 140 rpm. Após esse período, as suspensões tiveram a densidade óptica ajustada para DO_{600} de 0,5, correspondente a aproximadamente 10^9 UFC mL^{-1}. Em seguida, uma alíquota de 1 mL de cada suspensão foi aplicada homogeneamente sobre um lote de 100 sementes de soja da cultivar TMG Itaúba. Após a inoculação, as sementes foram mantidas a 28 °C até a secagem superficial.

As sementes foram distribuídas em rolos de papel Germitest®, previamente umedecidos com água destilada em volume equivalente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram mantidos em germinador do tipo Mangelsdorf, a 25 °C, sob luz contínua.

No quarto dia após a instalação do teste, foi determinada a porcentagem de plântulas normais. Posteriormente, dez plântulas normais de cada repetição foram selecionadas aleatoriamente e submetidas à análise digital de imagens no sistema GroundEye® Série L. Foram mensurados o comprimento da raiz primária, o comprimento do hipocótilo e o comprimento total da plântula. As dez plântulas foram consideradas subamostras, sendo a média de cada repetição utilizada nas análises estatísticas.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com três tratamentos e quatro repetições de 25 sementes, totalizando 100 sementes por tratamento.

6.2.7. Solubilização de fosfato inorgânico

A capacidade das culturas B6 e EJ115 de solubilizar fosfato inorgânico foi avaliada em meio Pikovskaya modificado. Para isso, as culturas foram inicialmente inoculadas em 20 mL de meio Luria-Bertani (LB) líquido e incubadas a 28 °C, sob agitação orbital de 140 rpm, por 48 h. Após esse período, alíquotas de 100 µL de cada cultura foram transferidas para orifícios de 5 mm de diâmetro, previamente confeccionados no centro de placas de Petri de 90 mm contendo o meio de avaliação. Placas com orifício sem microrganismo foram utilizadas como controle.

O meio Pikovskaya modificado foi preparado com 10 g L^{-1} de dextrose, 5 g L^{-1} de fosfato bicálcico, 0,5 g L^{-1} de sulfato de amônio, 0,5 g L^{-1} de extrato de levedura, 0,2 g L^{-1} de

cloreto de potássio, 0,1 g L^{-1} de sulfato de magnésio, 18 g L^{-1} de ágar e 0,025 g L^{-1} de vermelho Congo, com pH ajustado para 7,0, conforme adaptação de Pikovskaya (1948).

As placas foram incubadas em câmara de crescimento tipo BOD, a 28 °C, por 48 h. A capacidade de solubilização foi verificada inicialmente pela formação de uma zona de clareamento ao redor do crescimento microbiano.

As imagens das placas foram obtidas no equipamento GroundEye® e analisadas no software ImageJ®, utilizando-se calibração de 140 pixels cm^{-1}. A partir dessas imagens, foram determinadas a área ocupada pelo crescimento microbiano e a área correspondente à zona de clareamento.

O Índice de Solubilização por Área (ISA) foi calculado pela razão entre a área da zona de clareamento e a área ocupada pelo crescimento microbiano, segundo a expressão:

ISA = área da zona de clareamento / área do crescimento microbiano

Por se tratar da razão entre duas áreas, o índice foi considerado adimensional.

O experimento foi conduzido com três repetições biológicas. Em cada repetição, foram utilizadas cinco placas, consideradas subamostras técnicas.

6.2.8. Formação de biofilme

A formação de biofilme foi avaliada em placas de microtitulação de 96 poços, conforme os métodos descritos por Christensen *et al*. (1985) e Stepanović *et al*. (2000).

As culturas B6 e EJ115 foram inoculadas em meio LB e incubadas a 28 °C durante 36 h. Após a incubação, as células planctônicas foram removidas, e os poços foram lavados três vezes com solução salina tamponada com fosfato (pH= 7,0).

O material aderido às paredes dos poços foi corado com cristal violeta a 0,1%. Após a retirada do excesso de corante e a secagem da placa, o cristal violeta retido foi solubilizado com etanol a 95%. A densidade óptica foi medida a 595 nm. Poços contendo apenas o meio de cultura foram utilizados como controle negativo.

O valor de corte foi calculado pela expressão:

DOc = média da DO do controle negativo + 3 x desvio-padrão do controle negativo

As culturas foram classificadas como não produtoras de biofilme quando DO ≤ DOc; produtoras fracas quando DOc < DO ≤ 2DOc; produtoras moderadas quando 2DOc < DO ≤ 4DOc; e produtoras fortes quando DO > 4DOc.

Foram realizadas três réplicas biológicas independentes. Cada réplica biológica foi composta por duas repetições experimentais, analisadas em cinco réplicas técnicas (poços).

6.2.9 Extração de DNA e PCR dos genes *phoC* e *phoD*

A presença dos genes *phoC* e *phoD*, associados à mineralização do fósforo orgânico, foi investigada por reação em cadeia da polimerase (PCR) na cultura que apresentou melhor desempenho funcional.

O DNA foi extraídopor meio da lise em tampão TE, composto por Tris-HCl e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), seguida de tratamento com cloreto de sódio (NaCl), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e clorofórmio:álcool isoamílico. Após a separação das fases, o DNA foi precipitado com isopropanol gelado, lavado com etanol a 70%, seco e ressuspendido em tampão TE 0,1X.

A concentração e a pureza do DNA foram determinadas em espectrofotômetro Epoch (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA), com base na razão entre as absorbâncias a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}). A integridade do material genético foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TBE 1X, composto por Tris, ácido bórico e EDTA, utilizando-se o corante fluorescente GelRed®.

Para a amplificação, foram utilizados os primers gene *phoC*, foram utilizados os iniciadores *phoC*-A-F1 (5’-CGGCTCCTATCCGTCCGG-3’) e *phoC*-A-R1 (5’-CAACATCGCTTTGCCAGTG-3’), e ALPS-F730 (5’-CAGTGGGACGACCACGAGGT-3’) e ALPS-R1101 (5’-GAGGCCGATCGGCATGTCG-3’), direcionados ao gene *phoD*.

A PCR foi realizada com desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 61 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1 min. Ao final, foi realizada uma etapa de extensão final a 72 °C por 7 min.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TBE 1X, sob tensão de 100 V, corados com GelRed® e visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador digital.

6.2.10. Caracterização taxonômica molecular

A caracterização taxonômica das culturas B6 e EJ115 foi realizada na empresa ByMyCell, por meio do sequenciamento do gene *16S* rRNA. O DNA total foi extraído com o kit ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kit, seguindo as recomendações do fabricante.

O gene *16S* rRNA foi amplificado em extensão próxima à total com os iniciadores universais 27F e 1492R, gerando fragmentos de aproximadamente 1,5 a 1,6 kb. Os produtos da amplificação foram verificados por eletroforese em gel de agarose, purificados e utilizados na preparação das bibliotecas com o kit SQK-LSK114.

O sequenciamento foi realizado na plataforma MinION, da Oxford Nanopore Technologies, utilizando-se a Flongle Flow Cell FLO-FLG114. A conversão dos sinais elétricos em sequências de nucleotídeos, denominada *basecalling*, foi feita no programa Dorado Basecaller, versão 0.5.3. Em seguida, as leituras foram submetidas ao controle de qualidade no NanoFilt, versão 2.8.0, adotando-se como critério mínimo o valor Q10. A separação das leituras de acordo com cada amostra, ou demultiplexação, também foi realizada no Dorado.

A classificação taxonômica foi obtida pelo mapeamento das leituras contra um banco interno de referência contendo sequências do gene *16S* rRNA, utilizando-se o programa KMA, versão 1.4.15. As abundâncias dos diferentes táxons foram expressas como porcentagens relativas das leituras classificadas em cada cultura.

As sequências consenso foram construídas no programa NGSpeciesID, versão 0.3.0. Para cada cultura, a sequência consenso sustentada pelo maior número de leituras foi comparada ao banco coreNT do *National Center for Biotechnology Information*, utilizando-se a ferramenta BLASTn. Na interpretação dos alinhamentos, foram considerados a cobertura da sequência, o percentual de identidade e o valor de *e-value*.

Como o sequenciamento revelou composição bacteriana mista nas culturas B6 e EJ115, e considerando as limitações do gene *16S* rRNA para diferenciar espécies filogeneticamente próximas, a interpretação taxonômica foi priorizada em nível de gênero. As atribuições em nível de espécie foram consideradas indicativas e interpretadas com cautela.

6.2.11. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas no ambiente R, adotando-se nível de significância de 5%. Os tratamentos foram considerados efeitos fixos, enquanto as repetições biológicas foram incluídas nos modelos como efeitos aleatórios.

A área de crescimento de *M. phaseolina*, obtida no ensaio de antagonismo, foi analisada por meio de modelo linear generalizado misto, com distribuição Gamma e função de ligação logarítmica.

Os resultados dos ensaios de germinação de sementes de feijão, tanto em contato direto com as culturas quanto sob exposição aos compostos voláteis, foram analisados por modelos lineares generalizados mistos, com distribuição binomial e função de ligação logit. Em cada placa, foram considerados conjuntamente os números de sementes germinadas e não germinadas, mantendo-se a placa como unidade experimental.

A germinação das sementes de soja e as características morfológicas das plântulas foram avaliadas por modelos lineares generalizados, de acordo com a natureza de cada variável.

Os dados de crescimento microbiano e do Índice de Solubilização por Área foram analisados por modelos mistos com distribuição Gaussiana e função de ligação logarítmica. A adequação dos modelos foi verificada por meio da análise dos resíduos e da dispersão.

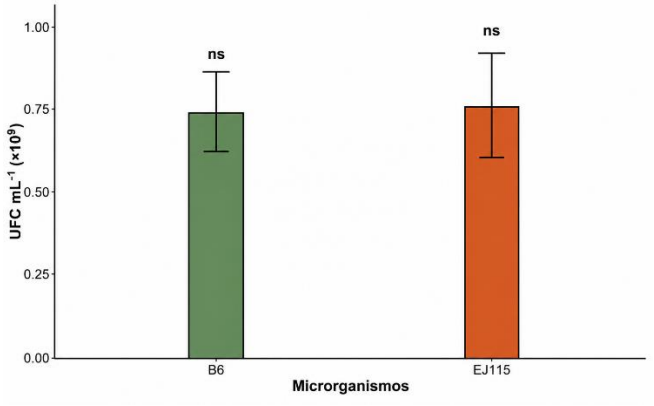
Quando foi detectado efeito significativo dos tratamentos, as médias estimadas foram comparadas com ajuste de Šidák. A formação de biofilme foi analisada de forma descritiva e classificada com base nos valores de corte estabelecidos para a densidade óptica.

6.3. Resultados

6.3.1. Crescimento e caracterização morfotintorial

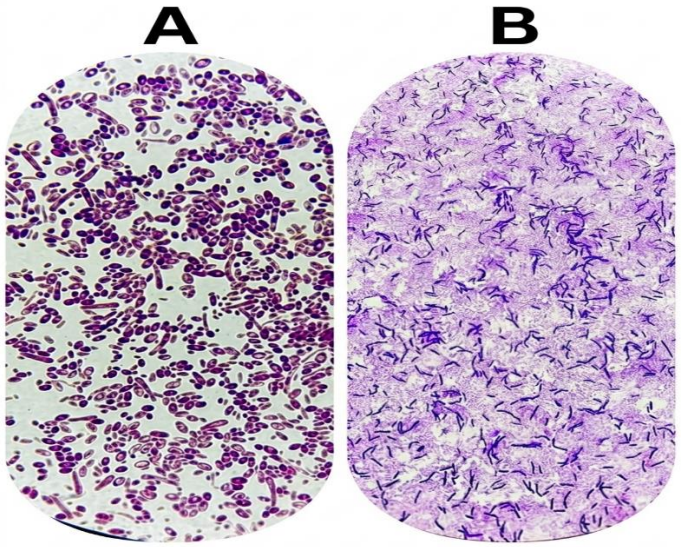
As culturas bacterianas mistas B6 e EJ115 apresentaram densidades populacionais semelhantes após 48 h de cultivo. EJ115 atingiu densidade média de 0,92 x 10^9 UFC mL^{-1}, enquanto B6 apresentou 0,73 x 10^9 UFC mL^{-1}, sem diferença significativa entre as culturas ($p > 0,05$) (Figura 1).

Figura 1 - Densidade populacional das culturas bacterianas mistas B6 e EJ115 após 48 h de cultivo. ns: diferença não significativa entre as culturas ($p > 0,05$).



Na observação microscópica, observaram-se diferenças na morfologia celular das duas culturas. Em B6, foi observado um padrão mais heterogêneo, com células ovais e estruturas alongadas ou filamentosas. Em EJ115, predominaram células com formato de bastonete, que apresentaram coloração púrpura após a coloração de Gram, característica compatível com células Gram-positivas (Figura 2).

Figura 2 - Comparação morfológica por microscopia óptica. (A) B6 com células ovais, brotamento e pseudohifas. (B) EJ115 com células em bastonete e coloração Gram-positiva. Coloração de Gram, 1000× com óleo de imersão.



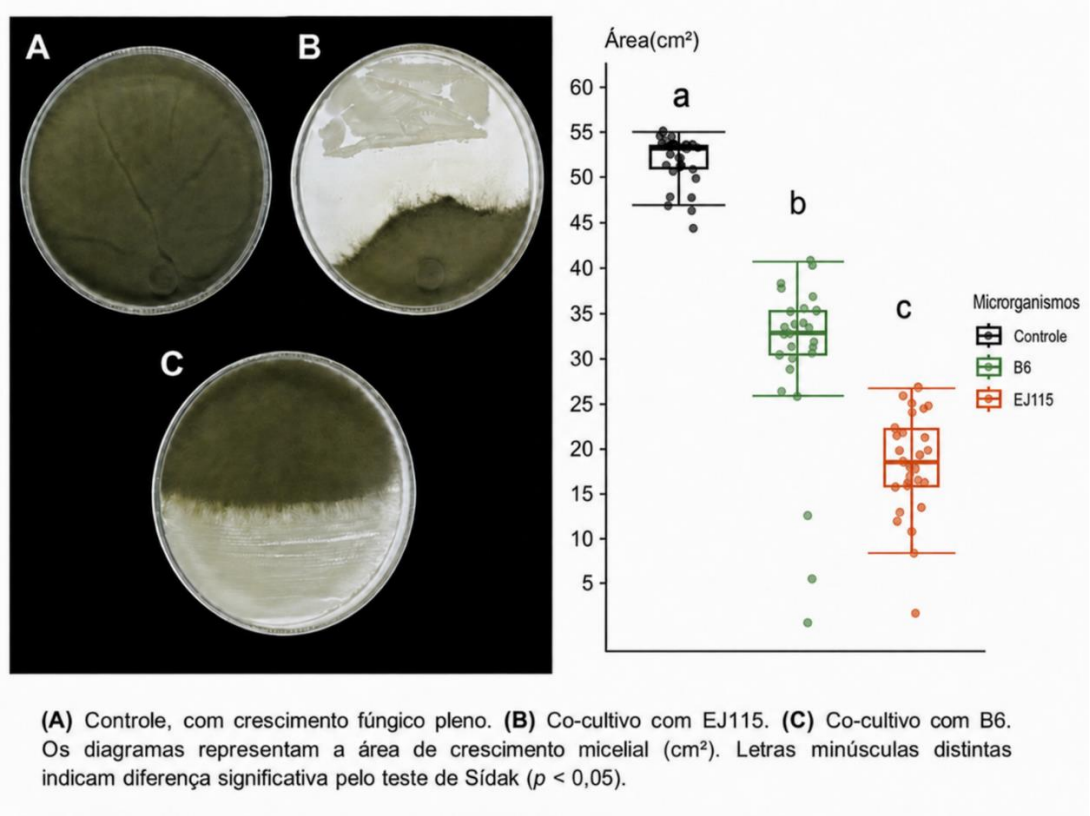
Coloração de Gram, aumento de 1000x (óleo de imersão).

6.3.2. Antagonismo contra *Macrophomina phaseolina*

O uso das culturas B6 e EJ115 reduziu significativamente o crescimento de *M. phaseolina* em comparação com o controle, além de diferirem entre si ($p < 0,05$) (Figura 3).

No tratamento controle, a área ocupada pelo micélio foi de 51,3 ± 0,48 cm². Na presença de B6, essa área foi reduzida para 37,8 ± 8,19 cm², o que correspondeu a uma diminuição de 26,3%. O efeito foi mais acentuado com EJ115, cuja área micelial foi de 18,2 ± 1,09 cm², representando redução de aproximadamente 64,5% em relação ao controle. Com esse resultado comprova-se que ambas as culturas apresentaram atividade antagônica *in vitro*, com maior intensidade para EJ115 nas condições avaliadas.

Figura 3 - Atividade antagônica *in vitro* das culturas bacterianas mistas B6 e EJ115 sobre o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina* após 7 dias de incubação.

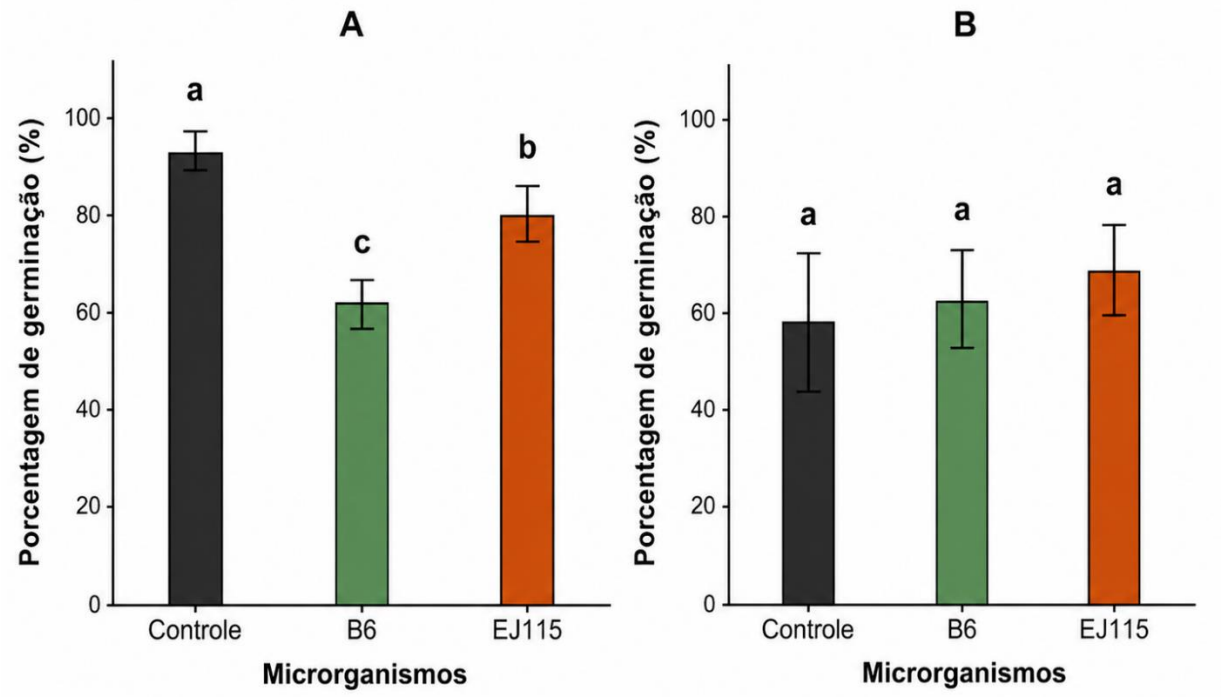


(A) Controle, com crescimento fúngico pleno. **(B)** Co-cultivo com EJ115. **(C)** Co-cultivo com B6. Os diagramas representam a área de crescimento micelial (cm²). Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa pelo teste de Sídak ($p < 0,05$).

6.3.3. Germinação sob contato direto e exposição a compostos voláteis *in vitro* e por tratamento da semente *in vivo*

No ensaio de contato direto, o uso das culturas bacterianas influenciou significativamente a germinação das sementes de feijão ($p < 0,05$). Com o tratamento controle, observou-se 92 ± 1% de germinação, enquanto B6 e EJ115 resultaram em 62 ± 6% e 80 ± 4%, respectivamente. Embora ambas as culturas tenham reduzido a germinação em relação ao controle, o efeito foi menos intenso em EJ115, que apresentou desempenho superior ao de B6 (Figura 4).

Figura 4 - Porcentagem de germinação de sementes de feijão submetidas a diferentes formas de exposição às culturas bacterianas B6 e EJ115.



(A) Contato direto entre sementes e colônias bacterianas. **(B)** Exposição das sementes aos compostos voláteis emitidos pelas bactérias.

Letras minúsculas distintas indicam diferença estatística significativa pelo teste de Šidák ($p < 0,05$).

Quando as sementes de feijão foram expostas apenas aos compostos voláteis, não foram observadas diferenças significativas entre o controle e as culturas avaliadas ($p > 0,05$). A germinação foi de 59 ± 11% no controle, 63 ± 6% em B6 e 68 ± 4% em EJ115.

Na soja, a germinação foi avaliada no quarto dia após a semeadura. Para EJ115, houve o maior valor numérico, com 82 ± 4,72% de germinação, seguida por B6, com 77 ± 1,96%, e pelo controle, com 68 ± 8,91% (Figura 5).

Figura 6 - Germinação de sementes de soja submetidas ao contato direto com as culturas bacterianas B6 e EJ115 após 4 dias de incubação.

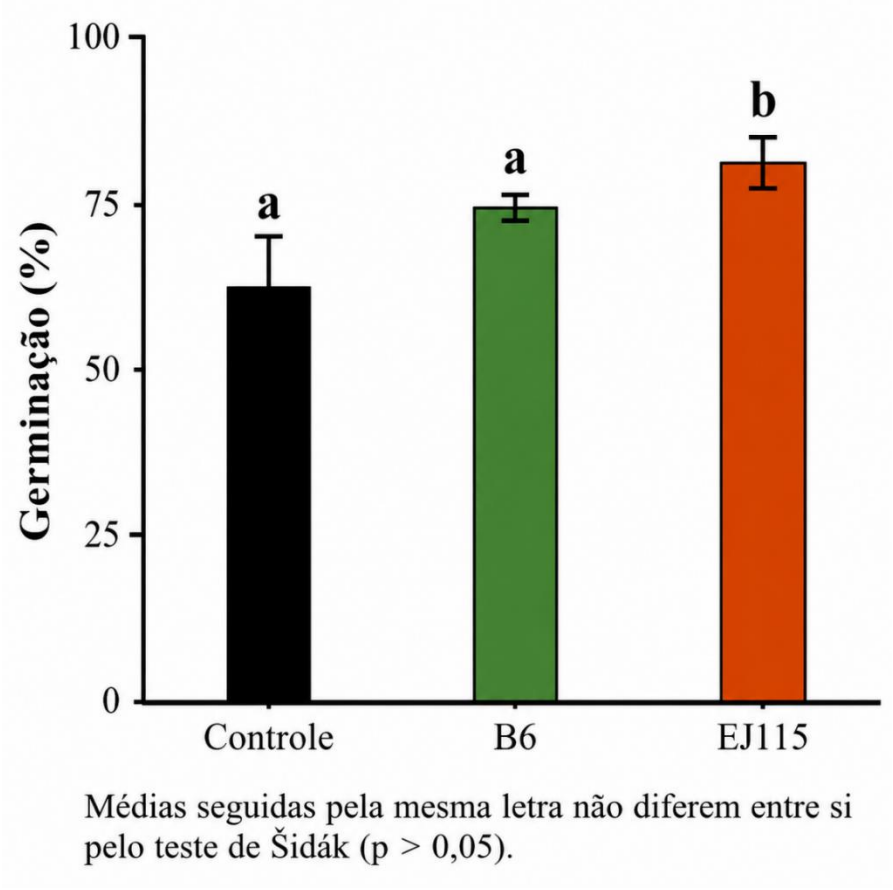
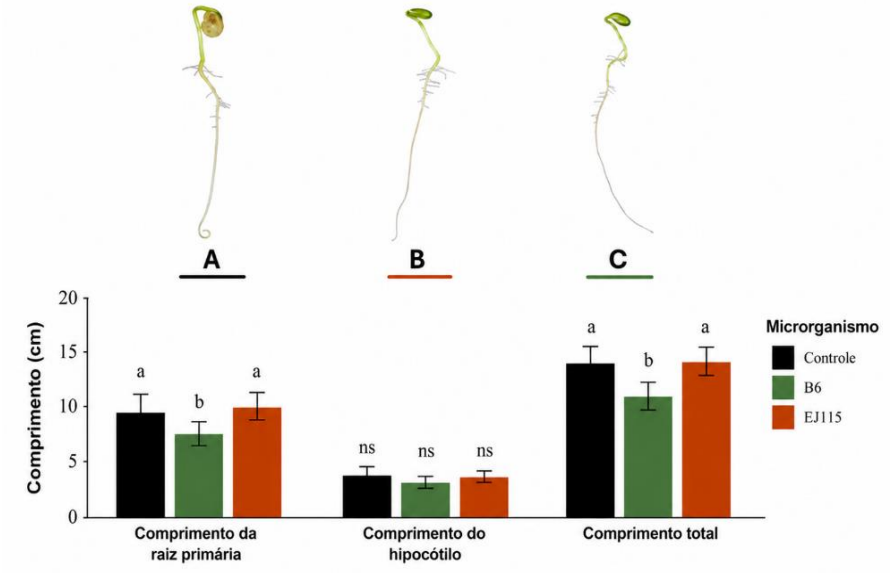


Figura 6 - Plântulas de soja submetidas ao contato direto com as culturas bacterianas B6 e EJ115 após 4 dias de incubação.



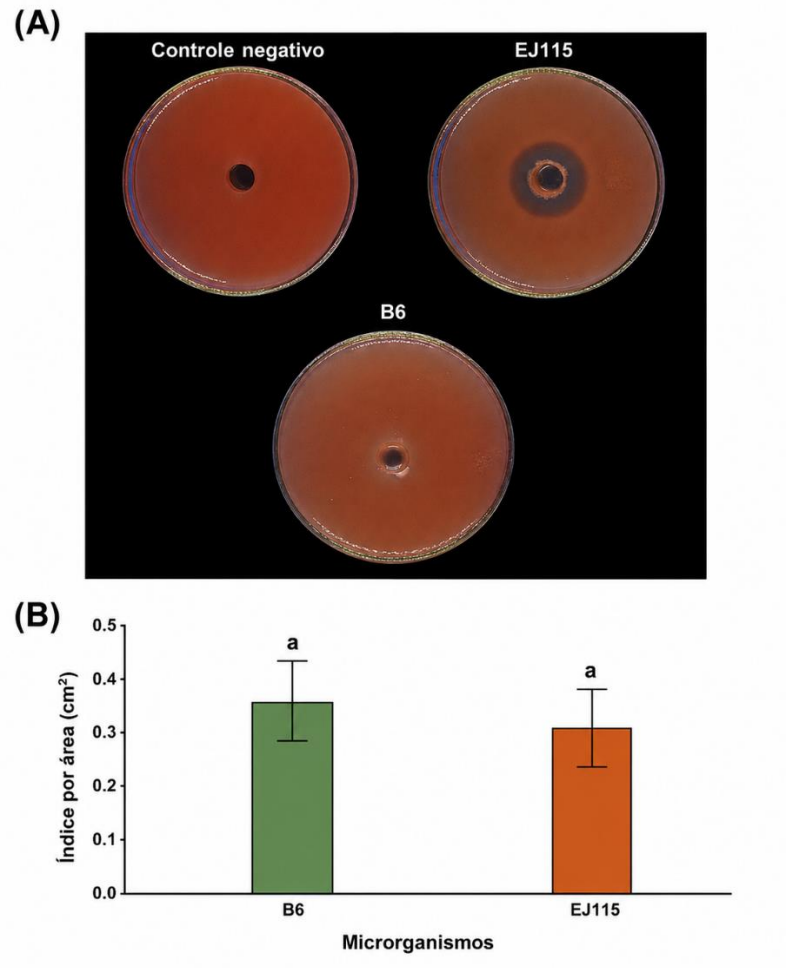
Houve variação no desenvolvimento inicial das plântulas de soja entre os tratamentos. Para B6, observou-se menor comprimento da raiz primária, com 7,86 ± 0,50 cm, em comparação com o controle, com 9,79 ± 0,60 cm, e com EJ115, com 10,00 ± 0,40 cm. Esse efeito, consequentemente, refletiu-se no comprimento total das plântulas, que foi de 11,30 ± 0,60 cm em B6, enquanto, no controle e em EJ115, foi de 14,00±0,80 cm e 14,20±0,60 cm, respectivamente. Para o comprimento do hipocótilo, não foram observadas diferenças

significativas entre os tratamentos. Assim, nas condições avaliadas, em EJ115 houve o crescimento das plântulas semelhante ao controle, enquanto em B6 houve redução do comprimento da raiz primária e o comprimento total.

6.3.4. Solubilização de fosfato inorgânico

As duas cepas formaram zonas de clareamento no meio Pikovskaya modificado, demonstrando capacidade de solubilizar fosfato cálcico nas condições avaliadas. O Índice de Solubilização por Área foi de 0,355 ± 0,06 para B6 e 0,303 ± 0,06 para EJ115. Não houve diferença significativa entre as culturas ($p > 0,05$) (Figura 7).

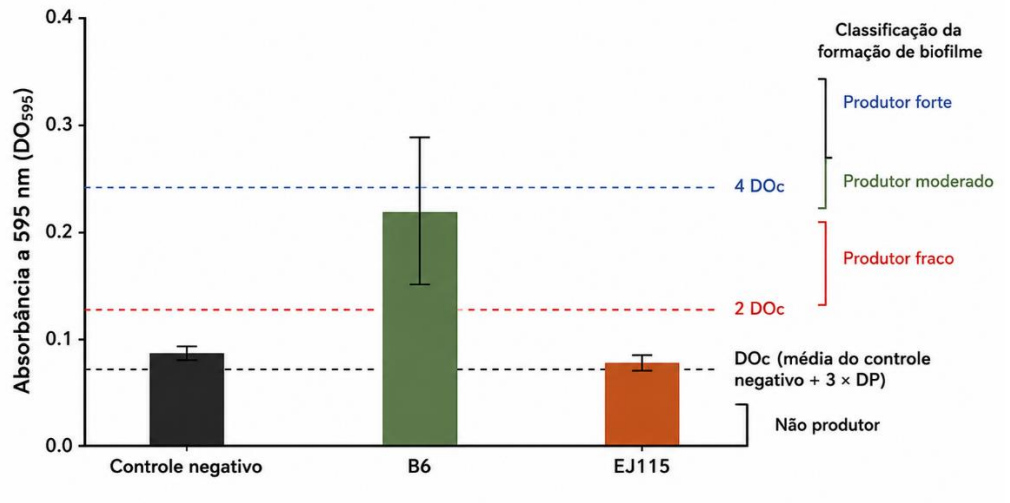
Figura 7 - Solubilização de fosfato inorgânico pelas culturas bacterianas mistas B6 e EJ115 em meio Pikovskaya modificado. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Šidák ($p > 0,05$).



6.3.5. Formação de biofilme

As culturas apresentaram comportamentos distintos quanto à formação de biofilme (Figura 8).

Figura 8 - Formação de biofilme pelas culturas bacterianas mistas pelo método do cristal violeta em placas de microtitulação.



A linhagem B6 apresentou absorbância/densidade óptica média superior à dos demais tratamentos, sendo enquadrada como produtora fraca de biofilme. Em contraste, EJ115 apresentou valor médio próximo ao controle, sendo classificada como não produtora nas condições do ensaio (Tabela 1).

Tabela 1. Síntese dos resultados quantitativos (média ± erro-padrão) das culturas bacterianas B6 e EJ115 nos ensaios funcionais.

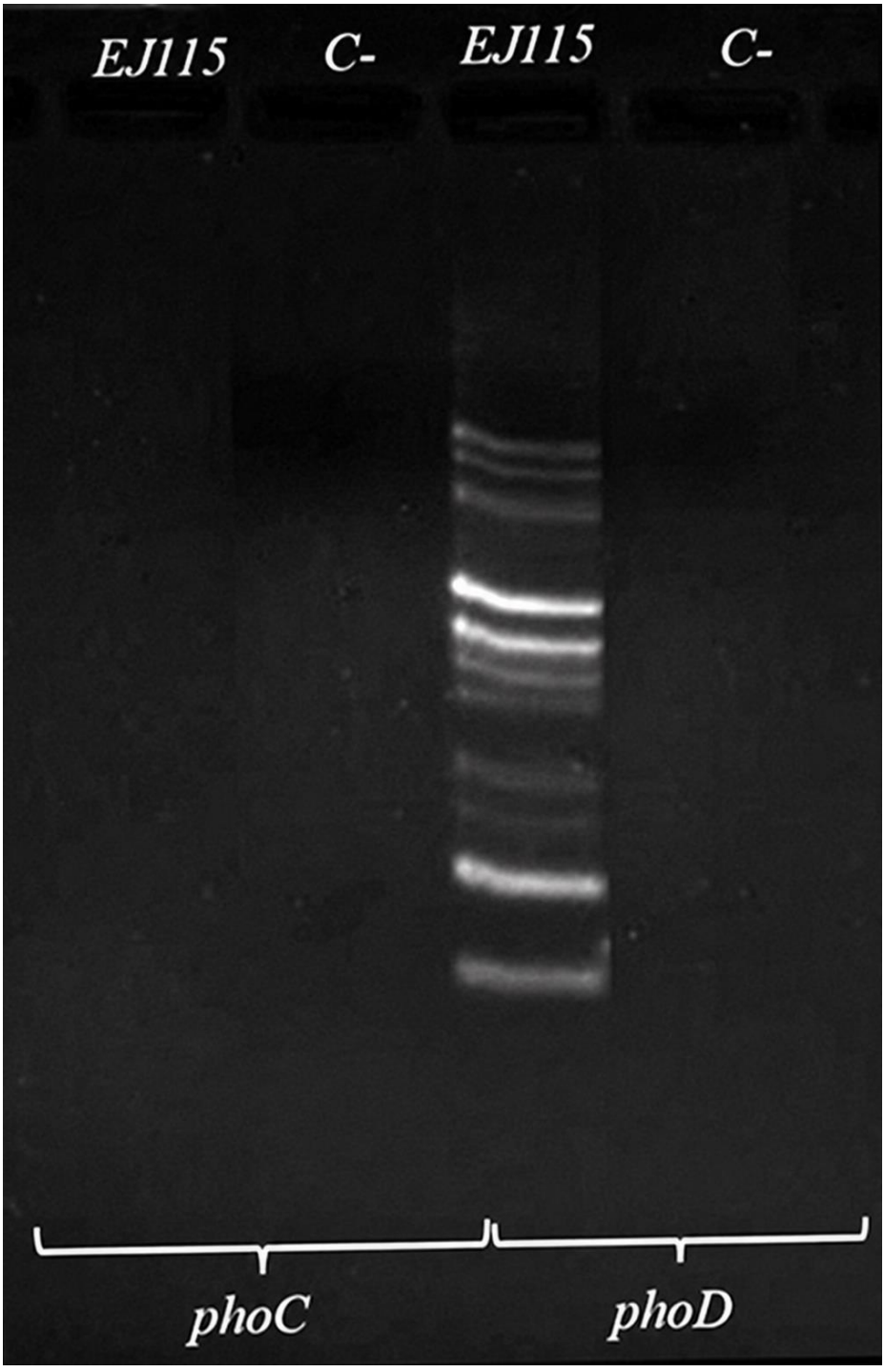
Variável	Controle	B6	EJ115	Resultado estatístico
Densidade populacional, UFC mL^{-1} ($\times 10^9$)	-	0,73	0,75	$p > 0,05$
Área da colônia de *M. phaseolina* (cm^2)	51,3±0,48	37,8±8,19	18,2±1,09	$p < 0,05$
Germinação: contato direto (%)	92±1	62±6	80±4	$p < 0,05$
Germinação: compostos voláteis (%)	59±11	63±6	68±4	$p > 0,05$
Índice de solubilização por área	-	0,355±0,06	0,303±0,06	$p > 0,05$
Biofilme, DO_{595}	-	0,221±0,109	0,090±0,007	Análise descritiva

Nota: O símbolo "-" indica ausência de controle ou variável não aplicável ao tratamento. Para a formação de biofilme, B6 foi classificada como produtora fraca e EJ115 como não produtora nas condições do ensaio.

6.3.6 Amplificação dos genes *phoC* e *phoD*

Com a PCR realizada com primers direcionados aos genes *phoC* e *phoD*, observaram-se padrões distintos na cultura bacteriana mista EJ115. Não foi observada amplificação definida para *phoC*. Para *phoD*, foram detectados múltiplos produtos de amplificação, enquanto o controle negativo não apresentou bandas visíveis (Figura 9).

Figura 9 - Perfil eletroforético de produtos obtidos com iniciadores direcionados a *phoC* e *phoD* na cultura bacteriana mista EJ115.



Esse perfil demonstra que os primers amplificaram diferentes fragmentos do DNA da cultura EJ115, podendo refletir sua composição bacteriana mista e a ocorrência de amplificação inespecífica. Dessa forma, a presença específica do gene *phoD* não pôde ser confirmada apenas pelo perfil eletroforético, sendo necessária a purificação e o sequenciamento dos amplicons para sua identificação.

6.3.7. Caracterização taxonômica das culturas bacterianas

Com o sequenciamento do gene *16S* rRNA, observou-se que as culturas B6 e EJ115 são formadas por diferentes grupos bacterianos. Em B6, os gêneros mais abundantes foram *Azospirillum* (37,76%) e *Serratia* (28,35%), enquanto 14,32% das leituras não puderam ser

classificadas. Em nível de classe, houve predomínio de Alphaproteobactéria (40,25%) e Gammaproteobactéria (31,14%).

Na cultura EJ115, a composição foi dominada por *Bacillus* (67,33%) e *Staphylococcus* (30,94%), que juntos representaram 98,27% das leituras classificadas. Esse resultado também se refletiu na predominância da classe Bacilli, correspondente a 98,19% das sequências.

Embora o sequenciamento tenha permitido reconhecer os principais grupos presentes em cada cultura, as identificações em nível de espécie foram interpretadas com cautela, devido às limitações do gene *16S* rRNA para separar microrganismos filogeneticamente próximos. Assim, os resultados foram apresentados prioritariamente em nível de gênero. A composição observada também indica que as atividades funcionais de B6 e EJ115 devem ser atribuídas às culturas como um todo, e não a um único componente bacteriano.

6.4. Discussão

A busca por alternativas mais sustentáveis para a agricultura tem ampliado o interesse por microrganismos capazes de contribuir para a nutrição das plantas e para o manejo de fitopatógenos. Nesse contexto, regiões ambientalmente heterogêneas, como o SEALBA, podem abrigar comunidades microbianas adaptadas a diferentes condições de temperatura, disponibilidade hídrica e fertilidade do solo. A prospecção desses materiais, no entanto, deve ser acompanhada de caracterização taxonômica e funcional, especialmente quando se considera seu possível uso no desenvolvimento de bioinsumos.

As bactérias estão entre os microrganismos mais estudados para aplicações agrícolas, devido à diversidade de funções que podem desempenhar, incluindo a disponibilização de nutrientes, a produção de compostos associados ao desenvolvimento vegetal e o antagonismo a fitopatógenos (Pathania *et al*., 2020; Ansabayeva *et al*., 2025). No presente estudo, as culturas bacterianas mistas B6 e EJ115 alcançaram densidades populacionais da ordem de 10^9 UFC mL^{-1} após 48 h de cultivo em meio LB. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre as culturas, esse crescimento demonstra que ambas se multiplicaram nas condições experimentais utilizadas. Entretanto, a capacidade de crescimento em meio de cultura representa apenas uma característica inicial de interesse e, isoladamente, não permite concluir sobre sua viabilidade para produção em larga escala ou aplicação biotecnológica.

O ambiente de origem pode influenciar as características funcionais dos microrganismos associados às plantas. Nesse sentido, espécies nativas do semiárido podem abrigar comunidades microbianas adaptadas às condições locais de temperatura, disponibilidade hídrica e nutrientes (Alkahtani *et al*., 2020; Eida *et al*., 2018; Rahman *et al*., 2025). A cultura B6 foi obtida de arilo de endocarpos de frutos de umbuzeiro, uma estrutura interna e lenhosa que pode representar um nicho particular para a manutenção de microrganismos associados.

A partir do sequenciamento do gene *16S* rRNA, observou-se que B6 corresponde a uma cultura bacteriana mista, com predominância dos gêneros *Azospirillum* e *Serratia*. Esse resultado amplia o interesse pela microbiota associada aos endocarpos de umbu, mas não permite afirmar que todos os componentes sejam endofíticos, simbiontes ou especificamente adaptados a esse tecido. Ainda assim, a origem da cultura e as atividades observadas *in vitro* indicam que esse ambiente pode constituir uma fonte relevante para estudos de prospecção microbiana.

A cultura EJ115 foi recuperada após o surgimento espontâneo de crescimento bacteriano em placas contendo *Macrophomina phaseolina*. Essa ocorrência chamou atenção para uma possível interação antagônica, posteriormente avaliada em ensaio de confronto direto. O aparecimento da cultura em associação com o fitopatógeno pode estar relacionado à competição por espaço e nutrientes, à produção de metabólitos inibitórios ou a outros mecanismos de interação microbiana. No entanto, como esses processos não foram investigados diretamente, devem ser considerados hipóteses para estudos posteriores (Sawant; Song; Seo, 2022; Wang *et al*., 2022a).

No confronto direto, as culturas B6 e EJ115 reduziram significativamente o crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, com maior efeito observado para EJ115. O sequenciamento do gene *16S* rRNA mostrou que essa cultura foi dominada por bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus*. Representantes de *Bacillus* podem produzir lipopeptídeos e outros metabólitos com atividade antifúngica, capazes de contribuir para a inibição de fitopatógenos (Zhang; Sun, 2018; Wang *et al*., 2022b; Bakker *et al*., 2024). No entanto, como a produção desses compostos não foi avaliada e EJ115 apresenta composição bacteriana mista, o mecanismo responsável pelo antagonismo não pode ser atribuído a um único gênero, podendo resultar da ação de um ou mais componentes da cultura ou das interações entre eles.

A redução do crescimento de *Macrophomina phaseolina* promovida por B6 pode estar relacionada a diferentes mecanismos de interação, como competição por espaço e nutrientes e produção de enzimas hidrolíticas, entre elas glucanases e quitinases, frequentemente associadas à degradação da parede celular de fungos fitopatogênicos (Ribeiro *et al*., 2019; Takashima *et al*., 2023). Também é possível que respostas do próprio fungo, como mecanismos de detoxificação e alterações no pH do meio, tenham influenciado a intensidade do antagonismo observado (Thambugala *et al*., 2020; Pellan *et al*., 2021).

Nesse contexto, o menor efeito antagônico de B6 em comparação com EJ115 pode refletir diferenças na composição das culturas, na produção de metabólitos ou na capacidade de competição com o fitopatógeno.

A atividade antagônica contra *Macrophomina phaseolina* não se refletiu necessariamente em uma resposta favorável das sementes. No ensaio de contato direto com feijão, B6 e EJ115 reduziram a germinação em relação ao controle, embora o efeito tenha sido menos intenso em EJ115. Essa resposta pode estar relacionada à elevada concentração do inóculo, ao tempo prolongado de contato, à produção de metabólitos ou a alterações nas condições do meio.

No ensaio com soja, por outro lado, o tratamento das sementes com EJ115, na concentração de 1 X 10^9 UFC mL^{-1}, resultou em maior valor numérico de germinação em comparação com B6 e com o controle. Essa diferença entre os ensaios sugere que a resposta pode variar conforme a espécie vegetal, a forma de aplicação e as condições experimentais.

No ensaio com compostos voláteis, não foram observadas diferenças significativas entre as culturas B6 e EJ115 e o tratamento controle. A germinação também foi relativamente baixa no controle, o que sugere que características do próprio sistema experimental podem ter influenciado os resultados.

O crescimento fúngico observado visualmente em algumas sementes pode ter contribuído para essa resposta, embora essa relação não tenha sido quantificada. Além disso, o ambiente fechado das placas bipartidas, a elevada umidade e a proximidade entre as sementes podem ter favorecido a deterioração e reduzido a germinação de forma geral (Kong *et al*., 2020; Massawe *et al*., 2018).

Dessa forma, nas condições avaliadas, não foi possível demonstrar efeito positivo ou negativo dos compostos voláteis produzidos por B6 e EJ115 sobre a germinação das sementes.

As duas culturas formaram zonas de clareamento no meio Pikovskaya modificado, indicando capacidade de mobilizar fosfato inorgânico nas condições do ensaio. Como não houve diferença significativa entre os valores do Índice de Solubilização por Área, B6 e EJ115 apresentaram desempenho semelhante para essa característica. A solubilização de fosfatos pode ocorrer por diferentes mecanismos, incluindo a acidificação do meio e a produção de ácidos orgânicos, que favorecem a liberação do fósforo presente em formas pouco solúveis (Sanchez-Gonzalez *et al*., 2022; Zuluaga *et al*., 2023; Pang *et al*., 2024).

Na cultura EJ115, a PCR com primers direcionados ao gene *phoD* resultou na formação de múltiplos produtos de amplificação. Esse perfil, isoladamente, não permite confirmar a presença específica do gene, pois pode decorrer tanto da composição bacteriana mista da cultura quanto de amplificações inespecíficas. Ressalta-se que os ensaios avaliam mecanismos distintos de disponibilização de fósforo. No meio Pikovskaya, investigou-se a solubilização de fósforo

inorgânico, geralmente associada à produção de ácidos orgânicos, à redução do pH e à quelação de cátions ligados ao fosfato. Por sua vez, o gene *phoD* está relacionado à produção de fosfatase alcalina e, consequentemente, à mineralização de compostos orgânicos de fósforo. Assim, os resultados devem ser interpretados de forma independente. Caso ambos os mecanismos sejam confirmados, a cultura EJ115 apresentará maior potencial biotecnológico, por atuar em vias complementares de disponibilização de fósforo. Entretanto, a confirmação de seu potencial genético para a mineralização do fósforo orgânico dependerá da purificação e do sequenciamento dos *amplicons* obtidos.

A avaliação da formação de biofilme permite identificar distintas ações entre as culturas. B6 foi classificada como produtora fraca, enquanto EJ115 foi considerada não produtora nas condições avaliadas. No entanto, a formação de biofilme pode variar de acordo com o meio de cultivo, a fonte de carbono, a temperatura, o tempo de incubação e o tipo de superfície utilizada (González-Rodríguez *et al*., 2023; Zhou *et al*., 2023). Dessa forma, a ausência de biofilme detectável em EJ115 não permite concluir que a cultura seja incapaz de aderir ou colonizar superfícies em outras condições. Da mesma maneira, a produção fraca observada em B6 não comprova, por si só, sua capacidade de colonizar o endocarpo do umbu ou outros tecidos vegetais.

De modo geral, as culturas bacterianas mistas B6 e EJ115 apresentaram atividades funcionais de interesse *in vitro*, especialmente na redução do crescimento de *M. phaseolina* e na solubilização de fosfato inorgânico. Entre as duas culturas, EJ115 apresentou maior atividade antagônica contra o fitopatógeno e melhor desempenho em parte dos ensaios com sementes e plântulas. O sequenciamento do gene *16S* rRNA, entretanto, permitiu identificar que EJ115 é formada principalmente por bactérias dos gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus*, enquanto B6 apresentou predomínio de *Azospirillum* e *Serratia*. Assim, os efeitos observados não podem ser atribuídos a um único gênero bacteriano, pois podem resultar da atuação de diferentes componentes ou das interações estabelecidas entre eles. Embora representantes de *Bacillus*, *Azospirillum* e outros gêneros detectados apresentem reconhecido interesse agrícola, a continuidade da prospecção dessas culturas depende do isolamento de seus componentes, da confirmação taxonômica e da avaliação de biossegurança.

6.5. Conclusões

As culturas bacterianas mistas B6 e EJ115 apresentam capacidade de reduzir o crescimento de *M. phaseolina* e de solubilizar fosfato inorgânico. EJ115 se destaca pelo maior efeito antagônico, pelo menor impacto sobre a germinação do feijão e pelo melhor desempenho inicial em soja. B6 é classificada como produtora fraca de biofilme, enquanto EJ115 é não produtora nas condições avaliadas.

O sequenciamento do gene *16S* rRNA mostra que B6 é composta por *Azospirillum* e *Serratia*, enquanto EJ115 apresenta predominância de *Bacillus* e *Staphylococcus*. Assim, as atividades observadas não podem ser atribuídas a um único microrganismo.

As duas culturas são relevantes para estudos de prospecção, mas sua composição mista exige isolamento dos componentes, identificação mais precisa e avaliação de biossegurança antes de qualquer aplicação agrícola.

6.6. Referências Bibliográficas

Aftab, H. *et al.* Next Generation Sequencing Improves Diagnostic 16S rRNA Amplicon-Based Microbiota Analyses of Clinical Samples Compared to Sanger Sequencing. *APMIS*, v. 133, n. 9, p. e70067, 1 set. 2025. DOI: **https://doi.org/10.1111/apm.70067**

Alkahtani, M. D. F. *et al.* Isolation and Characterization of Plant Growth Promoting Endophytic Bacteria fromDesert Plants and Their Application as Bioinoculants for

Sustainable Agriculture. *Agronomy*, v. 10, n. 9, p. 1325, 2020. DOI: https://doi.org/10.3390/agronomy10091325.

Ansabayeva, A. *et al.* Plant Growth-Promoting Microbes for Resilient Farming Systems: Mitigating Environmental Stressors and Boosting Crops Productivity - A Review. *Horticulturae*, v. 11, n. 3, p. 260, 2025. DOI: https://doi.org/10.3390/horticulturae11030260.

Bakker, C. *et al.* Fungal membrane determinants affecting sensitivity to antifungal cyclic lipopeptides from *Bacillus* spp. *Fungal Biology*, v. 128, p. 2080–2088, 2024. DOI: https://doi.org/10.1016/j.funbio.2024.08.006.

Christensen, G. D. *et al.* Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 22, n. 6, p. 996-1006, 1985. DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985.

Eida, A. A. *et al.* Desert plant bacteria reveal host influence and beneficial plant growth properties. *PLOS ONE*, v. 13, p. e0208223, 2018. DOI: https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0208223.

FREMPONG, S.J. *et al*. Illuminating the Tiny World: A Navigation Guide for Proper Raman Studies on Microorganisms. **Molecules 2024, Vol. 29, Page 1077**, v.29, p.1077, 2024. DOI: https://doi.org/10.3390/MOLECULES29051077

González-Rodríguez, V. E. *et al.* Biofilm-Forming Ability of Phytopathogenic Bacteria: A Review of its Involvement in Plant Stress. *Plants*, v. 12, n. 11, p. 2207, 2023. DOI: https://doi.org/10.3390/PLANTS12112207.

Kong, W. L. *et al.* Antifungal Effects of Volatile Organic Compounds Produced by Rahnella aquatilis JZ-GX1 Against *Colletotrichum gloeosporioides* in *Liriodendron chinense* × *tulipifera*. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 542393, 2020. DOI: https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.01114/TEXT.

Marquez, N. *et al. Macrophomina phaseolina*: General Characteristics of Pathogenicity and Methods of Control. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, p. 634397, 2021. DOI: https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.634397/PDF.

Massawe, V. C. *et al.* Volatile Compounds of Endophytic Bacillus spp. have Biocontrol Activity Against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, v. 108, p. 1373–1385, 2018. DOI: https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0118-R.

Pang, F. *et al.* Soil phosphorus transformation and plant uptake driven by phosphate-solubilizing microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1383813, 2024. DOI: https://doi.org/10.3389/FMICB.2024.1383813/FULL.

Pathania, P. *et al.* Role of plant growth-promoting bacteria in sustainable agriculture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 30, p.101842, 2020. DOI: https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2020.101842

Pellan, L. *et al.* Biocontrol Agents: Toolbox for the Screening of Weapons against *Mycotoxigenic Fusarium*. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 6, p. 446, 2021. DOI: https://doi.org/10.3390/JOF7060446 .

Pikovskaya, R. I. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology*, v. 17, p. 362-370, 1948.

Rahman, S. *et al.* Identification of Endophytic Bacterial Community Associated With Roots of Desert Vegetation. *Journal of Sustainable Agriculture and Environment*, v. 4, p. e70065, 2025. DOI: https://doi.org/10.1002/SAE2.70065.

Ribeiro, M. S. *et al.* Endo-β-1,3-glucanase (GH16 Family) from *Trichoderma harzianum* Participates in Cell Wall Biogenesis but Is Not Essential for Antagonism Against Plant Pathogens. *Biomolecules*, v. 9, n. 12, p. 781, 2019. DOI: https://doi.org/10.3390/BIOM9120781

Sanchez-Gonzalez, M. E. *et al.* Effect of pH and Carbon Source on Phosphate Solubilization by Bacterial Strains in Pikovskaya Medium. *Microorganisms*, v. 11, n. 1, p. 49, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS11010049.

Sawant, S. S.; Song, J.; Seo, H. J. Characterization of *Bacillus velezensis* RDA1 as a Biological Control Agent against White Root Rot Disease Caused by *Rosellinia necatrix*. *Plants*, v. 11, n. 19, p. 2486, 2022. DOI: https://doi.org/10.3390/PLANTS11192486.

Stepanović, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000. DOI: https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6.

Tacca, L.M.A. *et al.*. The soil microbiome of the Caatinga drylands in Brazil. *Scientific Reports*, 2026 ,16:1, v.16, p.22588-, 2026. DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-026-50433-1.

Takashima, T.; Komori, N.; Uechi, K.; Taira, T. Characterization of an antifungal β-1,3-glucanase from *Ficus microcarpa* latex and comparison of plant and bacterial β-1,3-glucanases for fungal cell wall β-glucan degradation. *Planta*, v. 258, 2023. DOI: https://doi.org/10.1007/S00425-023-04271-4.

Thambugala, K. M. *et al.* Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 10, 2020. DOI: https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.604923/PDF.

Wang, B. *et al.* Targeted isolation of biocontrol agents from plants through phytopathogen co-culture and pathogen enrichment. *Phytopathology Research*, v. 4, p. 19, 2022a. DOI: https://doi.org/10.1186/S42483-022-00124-2.

Wang, J. *et al.* Identification of Lipopeptide Iturin A Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* NCPSJ7 and Its Antifungal Activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Foods*, v. 11, p. 2996, 2022b. DOI: https://doi.org/10.3390/FOODS11192996.

Zhang, L.; Sun, C. Fengycins, Cyclic Lipopeptides from Marine *Bacillus subtilis* Strains, Kill the Plant-Pathogenic Fungus *Magnaporthe grisea* by Inducing Reactive Oxygen Species

Production and Chromatin Condensation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 84, 2018. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.00445-18.

Zhou, J. *et al.* The effect of carbon source and temperature on the formation and growth of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus cereus* biofilms. *LWT*, v. 186, p. 115239, 2023. DOI: https://doi.org/10.1016/J.LWT.2023.115239.

Zuluaga, M. Y. A. *et al.* An insight into the role of the organic acids produced by *Enterobacter* sp. strain 15S in solubilizing tricalcium phosphate: in situ study on cucumber. *BMC Microbiology*, v. 23, p. 184, 2023. DOI: https://doi.org/10.1186/S12866-023-02918-6.

7. ARTIGO 4
DESVENDANDO AS DEFESAS DAS PLANTAS: O POTENCIAL DE MICRORGANISMOS BENÉFICOS PARA A RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA EM HORTALIÇAS - UMA REVISÃO SISTEMÁTICA

Artigo publicado no periódico Biological Control, v. 188, art. 105428, 2024. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2023.105428.

Matheus Emannuel Oliveira Vieira[1]; Valdinete Vieira Nunes[1]; Crislaine Costa Calazans[1]; Renata Silva-Mann[2]*
[1]Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.
[2]Departamento de Engenharia Agronômica, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil. *Autora para correspondência: renatamann@academico.ufs.br.

Destaques
• Espécies dos gêneros *Trichoderma*, *Bacillus* e *Pseudomonas* induzem resistência sistêmica nas plantas.
• *Solanum lycopersicum* foi a espécie vegetal mais estudada em trabalhos sobre resistência sistêmica induzida.
• Foram identificados 143 genes vegetais relacionados à resistência sistêmica induzida.
• Hormônios, enzimas, proteínas e espécies reativas de oxigênio estão associados à resistência sistêmica induzida.

RESUMO

As plantas são suscetíveis ao ataque de patógenos, que empregam estratégias capazes de superar suas defesas e causar danos e perdas. O uso de microrganismos benéficos pode induzir resistência sistêmica e aumentar a eficiência do controle de doenças. Este estudo teve como objetivo identificar os principais microrganismos associados à indução de resistência sistêmica, bem como os genes e metabólitos envolvidos nesse processo. Foi realizada uma busca bibliográfica nas bases Scopus e Web of Science, e os metadados foram analisados no programa R, com o pacote Bibliometrix. Em seguida, investigaram-se os microrganismos, as espécies vegetais e os patógenos empregados nos estudos, além das relações com a expressão gênica e os metabólitos de defesa. Os gêneros mais citados foram *Trichoderma*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. A espécie vegetal mais estudada foi *Solanum lycopersicum*, seguida de *Arabidopsis thaliana*. Entre os patógenos, destacaram-se *Botrytis cinerea*, *Pseudomonas syringae*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. Foram identificados 143 genes vegetais relacionados à resistência sistêmica induzida. Os microrganismos benéficos influenciaram genes envolvidos na sinalização por ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno, além da produção de enzimas associadas ao controle de espécies reativas de oxigênio. Os resultados evidenciam a diversidade de mecanismos mobilizados por microrganismos benéficos e sua relevância para o desenvolvimento de estratégias sustentáveis de controle de doenças.

Palavras-chave: controle biológico, expressão gênica, sistema de defesa vegetal, agricultura sustentável.

Nota editorial: esta é uma tradução para composição da tese. Os rótulos internos das figuras foram mantidos conforme a versão publicada em inglês; títulos, chamadas e legendas foram traduzidos.

7.1. Introdução

As plantas desenvolveram um sistema de defesa capaz de responder a estresses bióticos e abióticos. Esse sistema é ativado por meio da sinalização de hormônios e metabólitos, desencadeando uma série de reações que auxiliam a planta a enfrentar condições adversas (Pandey *et al*., 2017; Tiwari *et al*., 2022). Durante a infecção por patógenos, por exemplo, são ativadas enzimas envolvidas na modificação e no reforço das paredes celulares, formando barreiras que limitam o avanço da infecção (Anjali *et al*., 2023). Paralelamente, diferentes genes passam a ser expressos e, em conjunto, contribuem para a resistência da planta contra organismos prejudiciais (Li *et al*., 2022; Yu *et al*., 2022).

Os patógenos, por sua vez, também ativam genes de virulência responsáveis pela produção de proteínas efetoras capazes de suprimir a imunidade vegetal (Hale *et al*., 2023; Nirwan *et al*., 2023; Wu *et al*., 2021; Person *et al*., 1962). Alguns deles produzem ainda pequenos RNAs de interferência que modificam a expressão gênica das plantas e afetam a sinalização e a síntese de metabólitos envolvidos na defesa (Wang *et al*., 2018; Weiberg *et al*., 2013). A rápida evolução desses genes efetores, em comparação com os genes de resistência do hospedeiro, pode conferir vantagem seletiva aos patógenos (Schulze-Lefert e Panstruga, 2011; Zhang *et al*., 2023).

As plantas também estabelecem relações simbióticas com microrganismos benéficos, que podem favorecer o crescimento, fornecer nutrientes e auxiliar no controle de pragas e doenças (Abedini *et al*., 2021; Mourouzidou *et al*., 2023). O controle pode ocorrer diretamente, pela redução da população do fitopatógeno por competição ou pela produção de substâncias letais ou inibitórias (Jack e Nelson, 2018; Sharma *et al*., 2018; Wei *et al*., 2023), ou indiretamente, pela resistência sistêmica induzida - RSI (Akram *et al*., 2023; Morales-Cedeño *et al*., 2021; Poulaki e Tjamos, 2023).

A RSI foi inicialmente distinguida da resistência sistêmica adquirida - RSA, geralmente desencadeada por patógenos (Knoester *et al*., 1999). Ambas ampliam a capacidade de defesa da planta, mas envolvem padrões de sinalização distintos. A RSA costuma iniciar uma reação localizada, com acúmulo de ácido salicílico, expressão de genes relacionados à patogênese e resposta de hipersensibilidade, frequentemente acompanhada por sintomas visíveis no local da infecção. A RSI, por outro lado, envolve principalmente vias de sinalização por ácido jasmônico e etileno ou combinações de etileno e ácido salicílico. Essas vias ativam genes e proteínas relacionadas à proteção dos tecidos e à redução de danos causados por radicais livres, geralmente sem provocar sintomas visíveis (Elhamouly *et al*., 2022; Hemmati *et al*., 2023; Salwan *et al*., 2022, 2023).

Embora o conhecimento sobre a RSI tenha avançado, ainda há aspectos importantes a esclarecer. Identificar quais microrganismos induzem essa resposta e compreender como interferem no sistema de defesa vegetal favorece o desenvolvimento de produtos biotecnológicos mais eficientes para o controle de doenças. Essas soluções podem contribuir para o controle biológico e para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável 2, 3 e 15 das Nações Unidas. Nesse contexto, esta revisão sistemática buscou identificar os principais microrganismos indutores de resistência, assim como os genes e metabólitos envolvidos nesse processo.

7.2. Material e Métodos

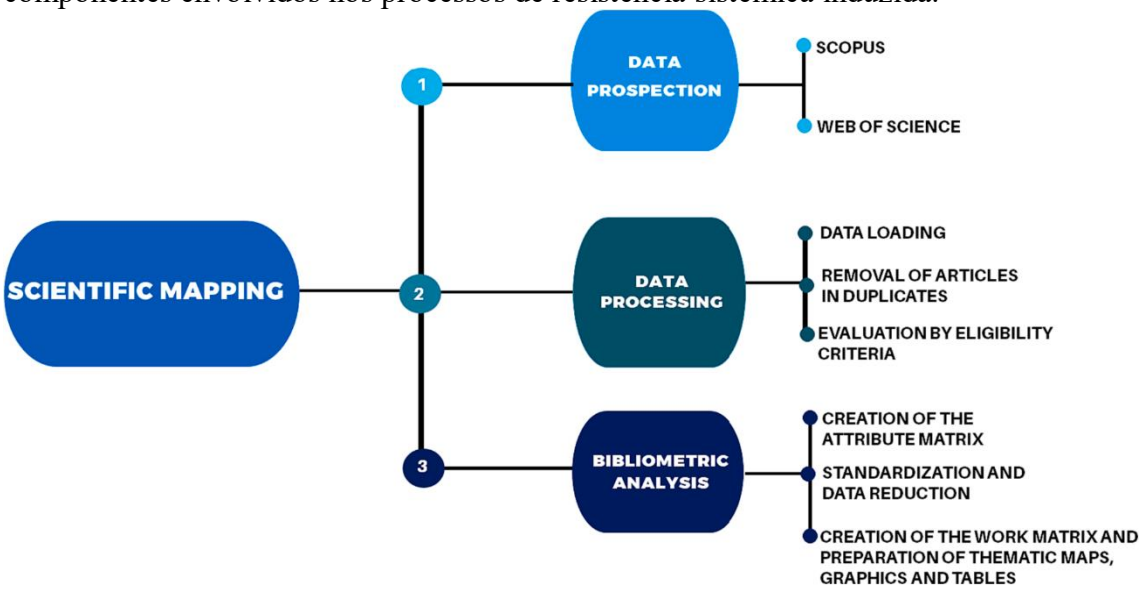
7.2.1. Revisão de literatura

A revisão foi realizada em março de 2023 nas bases de indexação Scopus e Web of Science. Utilizou-se a estratégia booleana ((induced systemic resistance) AND (secondary metabolites) AND (beneficial microorganism OR antagonist) AND (resistance genes)), aplicada aos campos título, resumo e palavras-chave. Foram considerados artigos publicados em português, inglês e espanhol, sem restrição de período.

Os metadados foram exportados em formato BibTeX e analisados no programa R, com o pacote Bibliometrix (Aria e Cuccurullo, 2017). Os registros duplicados foram removidos e os

artigos foram avaliados segundo os seguintes critérios de inclusão: a) abordar resistência sistêmica induzida; b) apresentar a RSI induzida por microrganismo benéfico; e c) tratar de genes ou metabólitos secundários envolvidos no sistema de defesa vegetal. Também foram avaliadas a produção científica anual, a influência das publicações e o número de citações (Aria *et al*., 2020).

Figura 1 - Fluxograma do mapeamento científico utilizado para identificar os principais componentes envolvidos nos processos de resistência sistêmica induzida.



7.2.2. Estrutura social e conceitual

Para compreender as relações entre autores e instituições e identificar temas predominantes e tendências da produção científica, foram analisadas as estruturas social e conceitual. A estrutura social foi examinada por meio de redes de coautoria (McCain, 1991), que permitem visualizar a interação entre autores e instituições. Foram geradas a rede de colaboração entre autores e a distribuição mundial das colaborações, conforme Aria e Cuccurullo (2017) e Aria *et al*. (2020).

A estrutura conceitual foi utilizada para identificar associações entre conceitos e palavras presentes no conjunto de publicações. Foram avaliadas a centralidade e as conexões com outros temas a partir das palavras-chave dos autores (Aria e Cuccurullo, 2017; Mumu *et al*., 2021; Nunes *et al*., 2022). Empregaram-se redes de coocorrência de palavras e análise de correspondência múltipla. As estruturas foram construídas com o Biblioshiny, interface do pacote Bibliometrix, e com o programa VOSviewer (Van Eck e Waltman, 2010).

7.2.3. Microrganismos, genes e metabólitos envolvidos na defesa vegetal

A partir do arquivo gerado no Bibliometrix, os metadados foram extraídos para uma nova matriz. Nela, foram identificados os principais microrganismos benéficos, em nível de gênero e espécie, as espécies vegetais e os patógenos utilizados nos estudos de RSI, além dos genes e metabólitos associados ao processo.

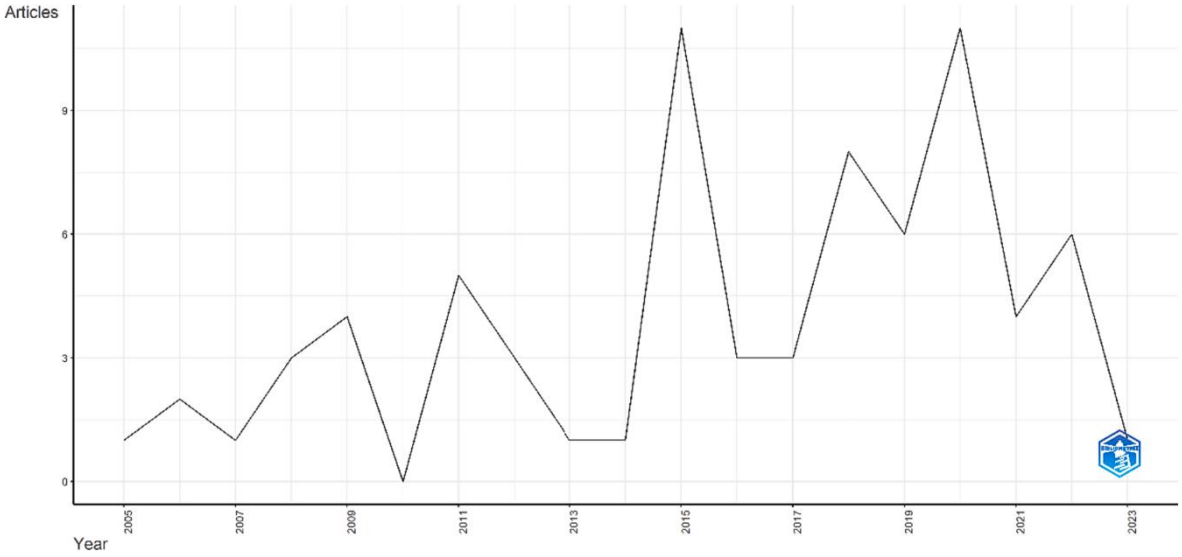
Quando um mesmo estudo avaliou mais de uma espécie de microrganismo benéfico, patógeno ou planta, cada ocorrência foi tratada separadamente. Em seguida, calculou-se a proporção de espécies microbianas, plantas, patógenos, genes expressos e metabólitos em relação ao número total de trabalhos. Os gráficos e tabelas foram elaborados no GraphPad Prism 8.

7.3. Resultados

7.3.1. Bibliometria dos estudos sobre resistência sistêmica induzida

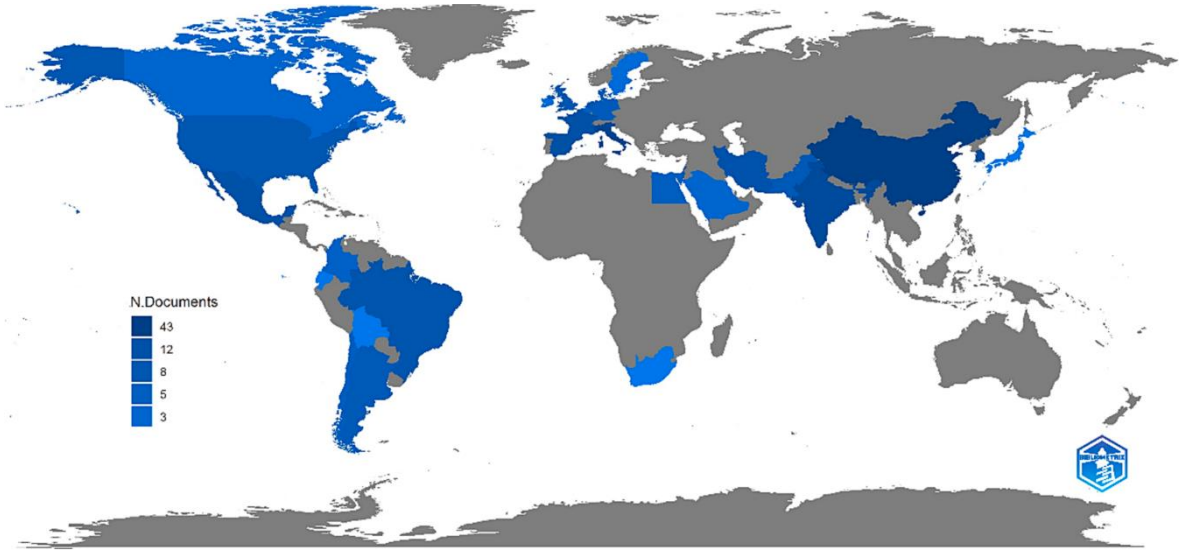
A busca nas bases de dados recuperou 136 artigos. Após a remoção de 23 duplicatas e a exclusão de 38 trabalhos que não atenderam aos critérios de elegibilidade, permaneceram 75 publicações. Os estudos abrangeram um período de 18 anos, e o ano de 2015 apresentou o maior número de publicações (Figura 2).

Figura 2 - Produção científica anual dos estudos relacionados à resistência sistêmica induzida.



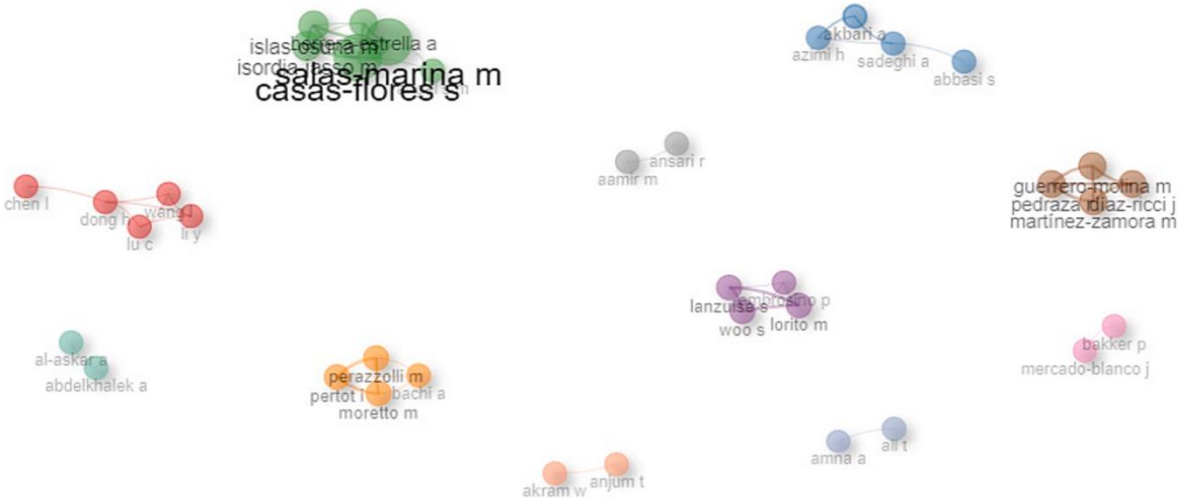
Autores de 29 países contribuíram para as publicações no período analisado. A China apresentou o maior número de autores, com 43, seguida por Itália, com 27, Índia, com 20, Coreia do Sul, com 16, e Espanha, com 13 (Figura 3).

Figura 3 - Produção científica por país: principais contribuições para a pesquisa sobre resistência sistêmica induzida entre 2005 e 2023.



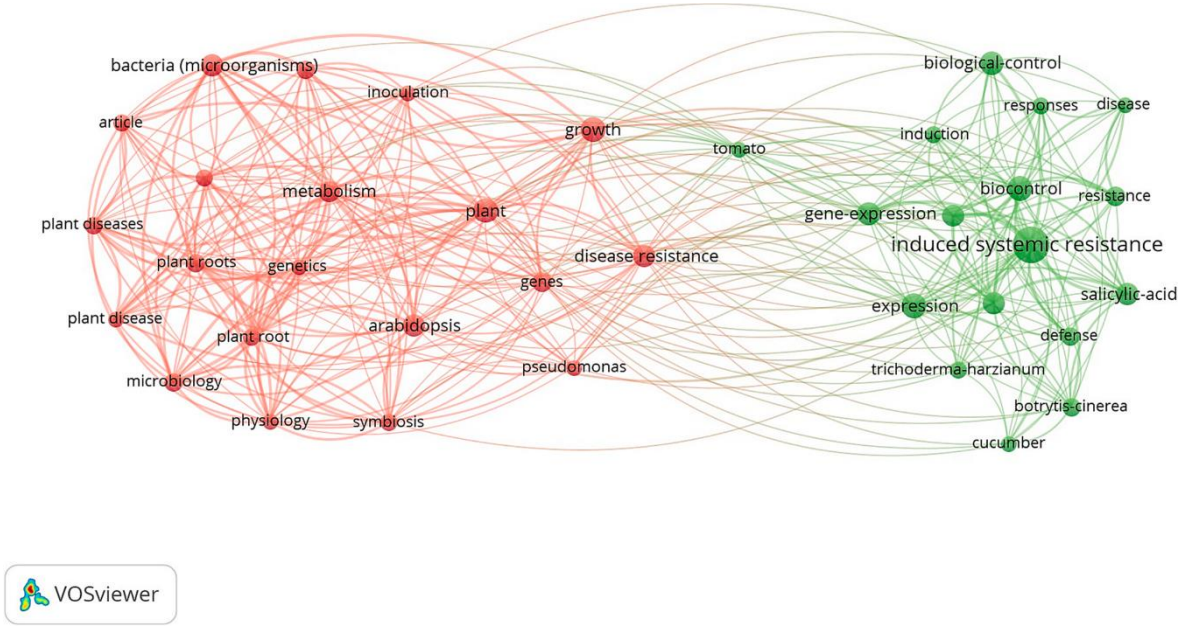
Foram identificadas 11 redes de colaboração. Entre os países com maior articulação esteve o México, reunindo 11 autores, entre eles Flores S., Salas Arina M., Herrera Estrella A., Isla Osuna M., Isordia Jasso M. e Angel S. (Figura 4).

Figura 4 - Rede de colaboração: principais autores e grupos de colaboração na pesquisa sobre resistência sistêmica induzida.



A rede das palavras mais frequentes formou dois agrupamentos, centrados nos termos “metabolismo” e “resistência sistêmica induzida”. Os termos se associaram a diferentes palavras dentro de seus respectivos grupos, mas apresentaram menor ligação direta entre si. “Resistência a doenças” manteve conexões com termos dos dois agrupamentos, enquanto “tomate” ocupou posição intermediária e estabeleceu relações com ambos (Figura 5).

Figura 5 - Relações entre as palavras mais frequentes nos estudos sobre resistência sistêmica induzida.



A análise de correspondência múltipla gerou uma representação bidimensional que explicou 86,51% da variabilidade dos termos mais utilizados. A Dimensão 1 respondeu por 81,33% e a Dimensão 2 por 5,28% da variação (Figura 6). Termos próximos no gráfico apresentaram associação mais forte, enquanto termos distantes mostraram menor relação. “Biossíntese”, “rizobactérias”, “mecanismo”, “resistência sistêmica” e “respostas” integraram um mesmo conjunto com correlações negativas e de baixa magnitude em ambas as dimensões.

Em contraste, “doença de plantas”, “doenças de plantas” e “imunologia” apresentaram valores positivos superiores a 1 nas duas dimensões (Tabela 1).

Figura 6 - Análise de correspondência múltipla dos termos mais utilizados nos estudos sobre resistência sistêmica induzida. A proximidade entre os pontos representa maior associação entre as categorias.

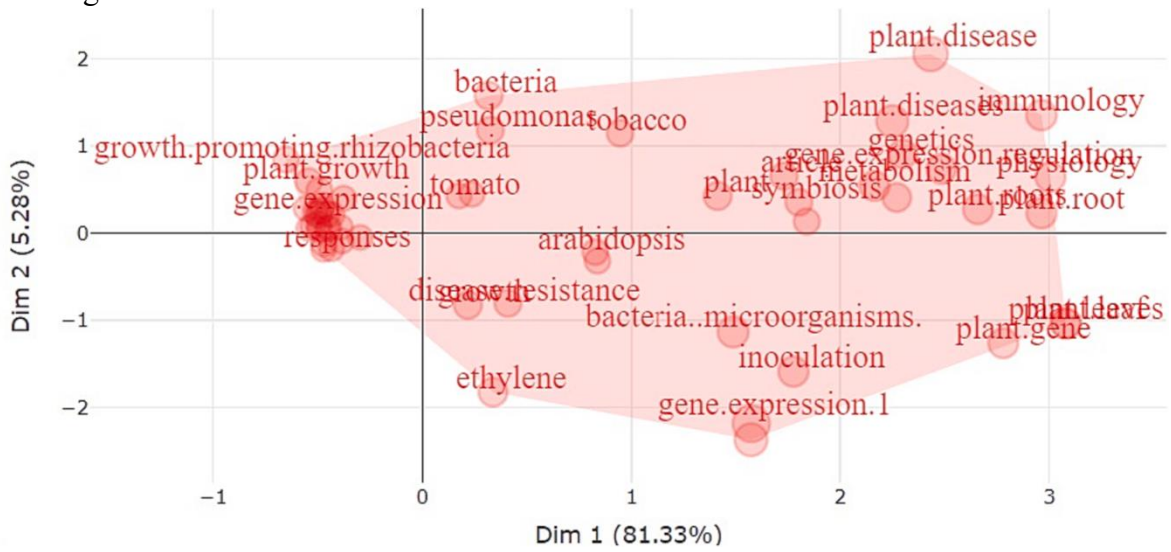


Tabela 1 - Correlação entre os termos e as dimensões da análise de correspondência múltipla nos estudos sobre resistência sistêmica induzida.

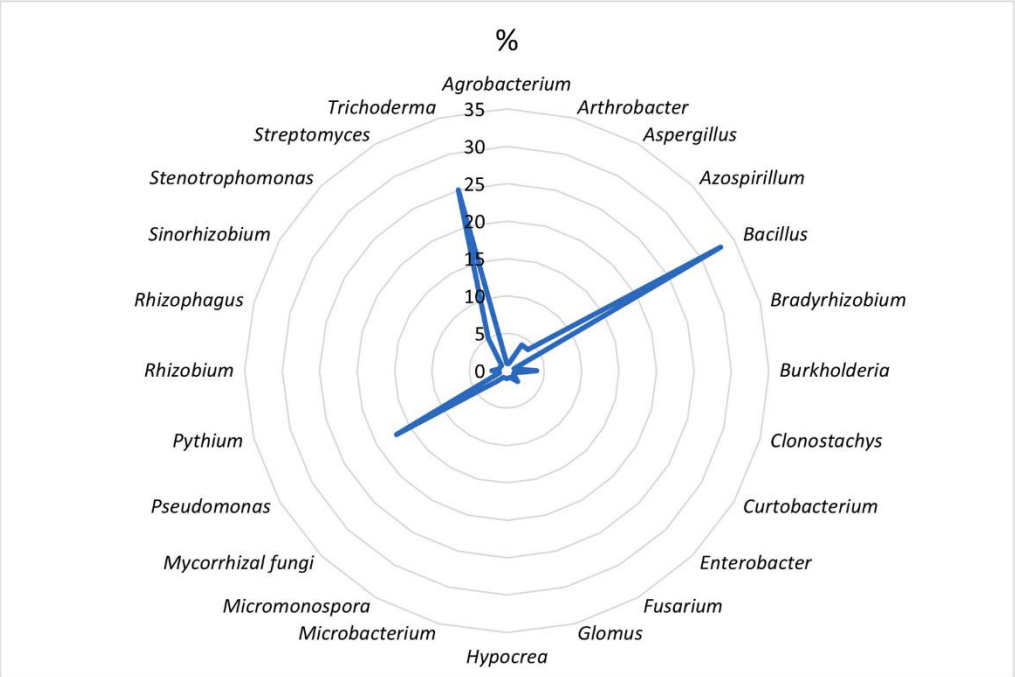
Termo	Dim.1	Dim.2	Grupo	Termo	Dim.1	Dim.2	Grupo
Rizobactérias promotoras de crescimento	-0,65	0,84	1	Pseudomonas	0,32	1,18	1
Doença	-0,55	0,28	1	Bactérias	0,32	1,58	1
Crescimento vegetal	-0,54	0,59	1	Etileno	0,34	-1,82	1
Rhizoctonia solani	-0,54	0,05	1	Resistência a doenças	0,41	-0,80	1
Resistência	-0,52	0,08	1	Arabidopsis	0,83	-0,22	1
Defesa	-0,51	0,24	1	Genes	0,84	-0,32	1
Resistência sistêmica induzida	-0,50	0,21	1	Tabaco	0,94	1,15	1
Botrytis cinerea	-0,50	0,10	1	Planta	1,42	0,43	1
Biocontrole	-0,49	0,25	1	Bactérias/microrganismos	1,49	-1,13	1
Arabidopsis thaliana	-0,49	0,49	1	Expressão gênica 1	1,58	-2,18	1
Controle biológico	-0,49	0,04	1	Fungo	1,58	-2,37	1
Ácido salicílico	-0,48	0,32	1	Artigo	1,73	0,65	1
Expressão gênica	-0,48	0,27	1	Inoculação	1,78	-1,59	1
Biossíntese	-0,47	-0,13	1	Simbiose	1,80	0,36	1
Rizobactérias	-0,47	-0,18	1	Não humano	1,84	0,13	1
Indução	-0,45	0,22	1	Metabolismo	2,17	0,54	1
Trichoderma harzianum	-0,45	0,05	1	Doenças de plantas	2,25	1,28	1
Resistência adquirida	-0,45	0,06	1	Microbiologia	2,27	0,41	1
Respostas	-0,43	-0,18	1	Genética	2,30	0,91	1

Termo	Dim.1	Dim.2	Grupo	Termo	Dim.1	Dim.2	Grupo
Pepino	-0,43	0,21	1	Doença de plantas	2,43	2,06	1
Expressão	-0,39	0,07	1	Regulação da expressão gênica	2,48	0,74	1
Respostas de defesa	-0,38	0,40	1	Raízes de plantas	2,66	0,27	1
Mecanismos	-0,38	-0,09	1	Gene vegetal	2,78	-1,26	1
Resistência sistêmica	-0,30	-0,05	1	Raiz vegetal	2,96	0,23	1
Tomate	0,17	0,43	1	Imunologia	2,96	1,35	1
Crescimento	0,22	-0,82	1	Fisiologia	3,01	0,64	1
Plantas	0,24	0,45	1	Folha vegetal	3,08	-1,04	1

7.3.2. Características dos estudos sobre resistência sistêmica induzida

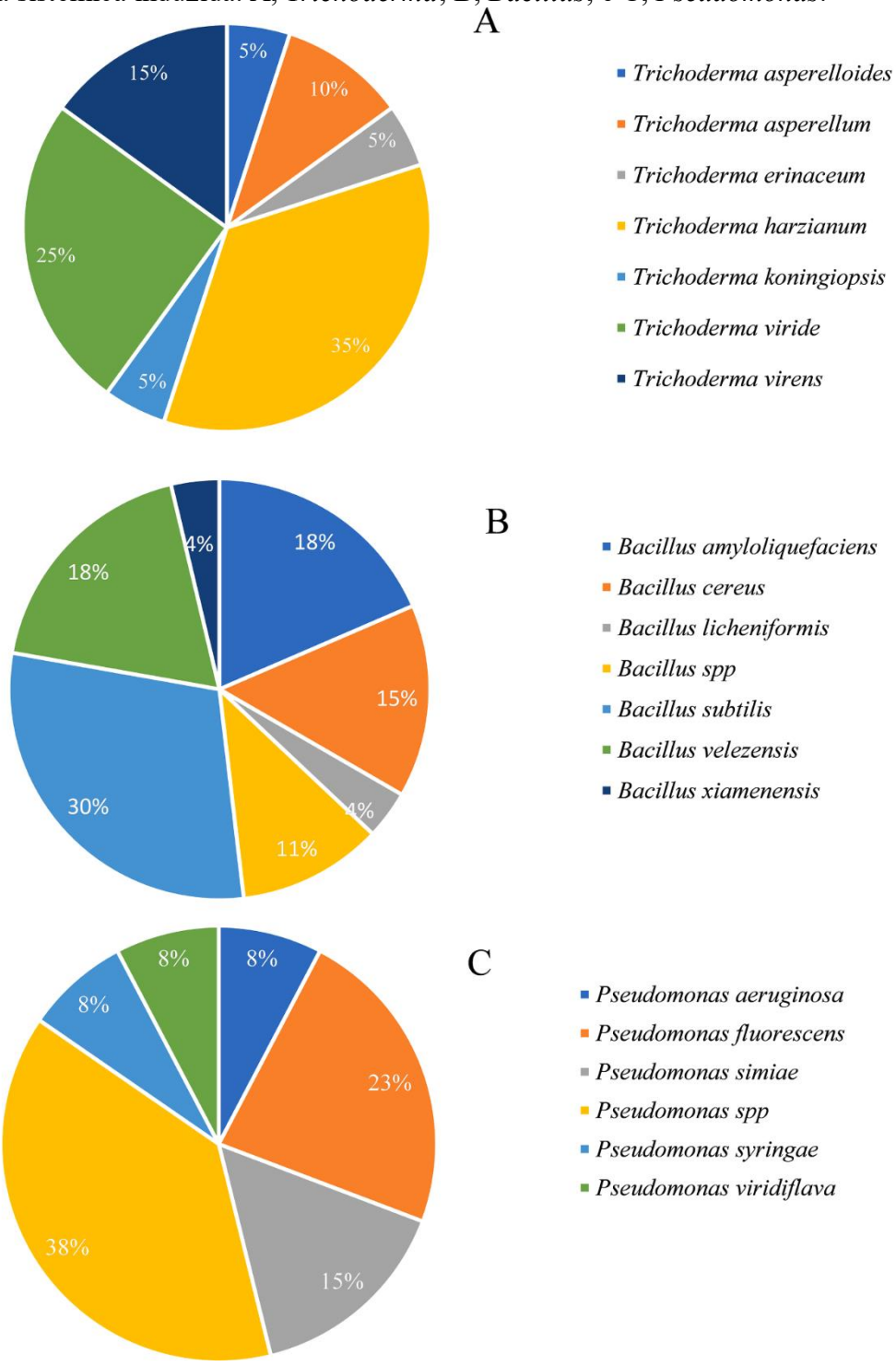
Vinte e quatro gêneros de microrganismos benéficos foram empregados nos estudos de RSI. *Bacillus*, *Trichoderma* e *Pseudomonas* foram os mais investigados, correspondendo a 33%, 25% e 17% das publicações, respectivamente. Os demais gêneros apareceram em menos de 5% dos trabalhos (Figura 7).

Figura 7 - Gêneros de microrganismos benéficos empregados nos estudos sobre resistência sistêmica induzida, expressos em porcentagem.



Sete espécies de *Trichoderma* foram utilizadas. *Trichoderma harzianum* ocorreu em 35% dos estudos com o gênero, enquanto *T. asperelloides* e *T. koningiopsis* apareceram em 5%. Entre as espécies de *Bacillus*, *B. subtilis* foi a mais investigada, com 30%, seguida por *B. amyloliquefaciens* e *B. velezensis*, ambas com 19%. Em 38% dos estudos com *Pseudomonas*, a espécie não foi informada; entre as identificadas, *P. fluorescens* esteve presente em 23% dos trabalhos (Figura 8).

Figura 8 - Principais espécies de microrganismos benéficos empregadas em estudos sobre resistência sistêmica induzida: A, *Trichoderma*; B, *Bacillus*; e C, *Pseudomonas*.



Os gêneros *Trichoderma* e *Bacillus* apresentaram capacidade antagônica contra diferentes patógenos. Ao entrarem em contato com as plantas, esses microrganismos podem alterar a expressão gênica e produzir substâncias capazes de modular genes relacionados ao crescimento e à indução de resistência sistêmica (Cardoza *et al*., 2015; Lin *et al*., 2020; Salas-Marina *et al*., 2015).

Foram identificadas 25 espécies vegetais nos estudos analisados. *Solanum lycopersicum* foi a mais utilizada, com 24%, seguida por *Arabidopsis thaliana*, com 17%, *Cucumis sativus*, com 11%, e *Vitis vinifera*, com 7%. As demais espécies ocorreram em menos de 5% das publicações (Figura 9).

Figura 9 - Espécies vegetais mais utilizadas em estudos sobre resistência sistêmica induzida.

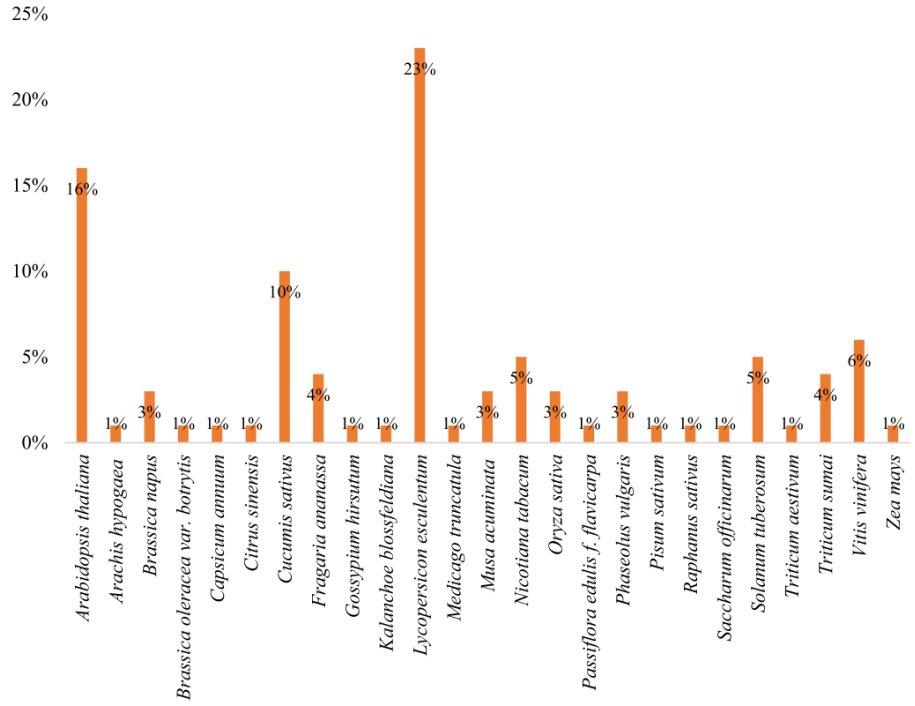


Fig. 9. Most used plant species in studies of induced systemic resistance.

Quatro patógenos concentraram mais da metade dos estudos avaliados: *Botrytis cinerea*, com 19%, *Pseudomonas syringae*, com 14%, *Rhizoctonia solani*, com 12%, e *Fusarium oxysporum*, com 7%. Os demais patógenos corresponderam a 48% das publicações.

Ao longo do período analisado, 143 genes vegetais foram relacionados à RSI. Esses genes participam da síntese e da sinalização de hormônios, como etileno, ácido jasmônico e ácido salicílico, e codificam enzimas antioxidantes, proteínas relacionadas à patogênese e proteínas de resposta ao estresse biótico (Tabela 2). Em contraste, poucos trabalhos avaliaram genes microbianos regulados durante a RSI. Apenas sete genes de microrganismos benéficos foram associados ao processo: três de *Bacillus cereus*, três de espécies de *Trichoderma* e dois de *Enterobacter intermedium* (Tabela 3).

Tabela 2 - Genes e produtos de expressão gênica relacionados à resistência sistêmica induzida, microrganismos benéficos associados e patógenos avaliados.

Gene/expressão	Microrganismo benéfico	Patógeno
LOX-lipoxigenase vegetal	*Trichoderma asperellum*; *Bacillus licheniformis*; *B. cereus*; *B. subtilis*; *T. asperelloides*; *T. harzianum*; *T. atroviride*; *Pseudomonas viridiflava*; *Burkholderia phytofirmans*; *Aspergillus ustus*; *Fusarium equiseti*	*P. syringae* pv. *tomato*; *Hyaloperonospora parasitica*; *Plectosphaerella cucumerina; Botrytis cinerea*; *P. syringae*; *Fusarium oxysporum*; *Cucumovirus; Xanthomonas campestris*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Leptosphaeria maculans*; *Podosphaera xanthii*; *Rhizoctonia solani*
CHI-quitinase vegetal	*T. virens*; *T. atroviride*; *T. harzianum*; *B. amyloliquefaciens*; *P. syringae*; *Pseudomonas* sp.; *B. phytofirmans*	*B. cinerea*; *Alternaria solani*; *P. syringae*; *Plasmopara viticola*; *Penicillium digitatum*; *F. oxysporum*; *Erysiphe cichoracearum*; *P. xanthii*
AOS-hidroperóxido sintase	*P. syringae*; *P. simiae*	*P. digitatum*
GPX1-glutationa peroxidase	*P. syringae*; *T. erinaceum*	*P. digitatum*; *F. oxysporum*
CHi9-quitinase básica intracelular de 30 kDa	*T. harzianum*; *T. atroviride*; *T. virens*	*B. cinerea*; *A. solani*; *P. xanthii*
PR-5x-proteínas PR-5 homólogas à taumatina	*T. virens*; *T. atroviride*; *B. cereus*; *B. subtilis*; *Glomus* sp.; *Streptomyces* sp.	*B. cinerea*; *A. solani*
alfa-DOX1-alfa-dioxigenase	*T. virens*; *T. atroviride*	*B. cinerea*; *A. solani*; *Pythium* sp.; *Meloidogyne incognita*
cevi16; TLRP; LOC101262163; emb1187; AT4G14370; WRKY54; MYB114; AtWRKY - peroxidase, proteínas de parede, actina, biossíntese de fosfolipídios e fatores de transcrição	*T. atroviride*	-
SOD-superóxido dismutase	*B. amyloliquefaciens*; *T. asperellum*; *T. erinaceum*; *T. harzianum*	*X. oryzae* pv. *oryzae*; *Cucumovirus*; *F. oxysporum*; vírus do mosaico do pepino
Erf1-fator de resposta ao etileno 1	*T. harzianum*	*P. xanthii*; *B. cinerea*
ERF-fator da via de sinalização do etileno	*T. harzianum*; *Pseudomonas* spp.	*Phytophthora capsici*; *P. viticola*; *R. solani*
LOC10258890-fator de transcrição FAMA	*T. harzianum*	*P. viticola*
ACS9- aminociclopropano-1-carboxilato sintase	*T. asperelloides*	*P. syringae*
PR-proteínas relacionadas à patogênese	*T. harzianum*; *A. asperelloides*; *B. velezensis*; *B. amyloliquefaciens*; *P. simiae*; *A. terreus*; *B. phytofirmans*; *Pythium oligandrum*; *A. ustus*; *Azospirillum lipoferum*; *A. spinulosporus*; *Pseudomonas* sp.; *F. equiseti*; *P. viridiflava*; *Streptomyces* sp.; *Rhizobium*	*P. syringae; P. capsici; P. xanthii*; *E. cichoracearum*; *Neofusicoccum parvum*; B. *cinerea*; *H. parasitica*; *P. cucumerina*; *Pythium* spp.; *F. oxysporum*; *Ralstonia solanacearum*; *A. solani*; *P. viticola*; *X. oryzae* pv. *oryzae*; *Cucumovirus*; *X. campestris*; *S. sclerotiorum*; *L. maculans*

Gene/expressão	Microrganismo benéfico	Patógeno
	radiobacter; *T. atroviride*; *Micromonospora* sp.	
PIN-ácido jasmônico	*T. harzianum*; *B. phytofirmans*	*B. cinerea*; *P. syringae*
etr1, ers1 e ein4 - receptores de etileno	*A. brasilense*	-
aco1; CAT; APXc; FLS2; AFR1 - metabolismo oxidativo, catalase, ascorbato peroxidase, receptor de flagelina e proteína quinase reguladora de defesa	Harpina de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*	*X. oryzae* pv. *oryzicola*
COL-proteína do tipo CONSTANS	*T. harzianum*; *P. simiae*	*P. viticola*
NPR-proteína reguladora mediada por ácido salicílico	*T. asperellum*; B. *amyloliquefaciens*; R. *radiobacter*; *P. simiae*	*X. oryzae* pv. *oryzicola*; *P. syringae*; *P. cucumerina*; *E. cichoracearum*
PDF1.2-defensina vegetal responsiva a etileno e ácido jasmônico	*A. ustus*; *B. velezensis*; *B. subtilis*; *B. amyloliquefaciens*	*R. radiobacter*; *T. atroviride*; *B. phytofirmans*
JAR1-1; JIN1; VSP2; EDS16; ASPR1-genes relacionados a ácido jasmônico, proteína de reserva, ácido salicílico e protease aspártica	*A. terreus*; *R. radiobacter*	*P. syringae*
ATPCA e PAD3-peroxidase e via de fitoalexinas	*A. ustus*; *T. atroviride*	*B. cinerea*; *P. syringae*
ET-fator de resposta ao etileno	*B. subtilis*	*R. solani*
XTH; HSR203J; GST2; CHORS2; CAGT-hidrolase, sinalização, estado redox e reforço da parede celular	*P. oligandrum*	*N. parvum*
HQT-hidroxicinamoil-CoA quinato transferase	*B. velezensis*	*F. oxysporum*
IRT1 e MYB72- transporte de ferro e fator de transcrição envolvido na RSI	*P. simiae*	*P. aeruginosa*
NAC e MADS-RIN - fatores de transcrição ligados ao estresse	*B. amyloliquefaciens*	*R. solani*
ASA1 e ICS1- defesa mediada por jasmonato/etileno e isocorismato sintase	*P. simiae*	-
PPO-polifenol oxidase	*T. harzianum*; *B. amyloliquefaciens*; *P. simiae*	*P. viticola*; *E. cichoracearum*
APX-L-ascorbato peroxidase	*T. harzianum*; *P. simiae*	vírus do mosaico do pepino
EDS1-proteína da superfamília alfa/beta-hidrolase	*P. simiae*	-
JMT e JAZ1- metilação e sinalização do ácido jasmônico	*B. phytofirmans*	*B. cinerea*

Gene/expressão	Microrganismo benéfico	Patógeno
Solyc01g091170.3 e Solyc08g076970.3 - arginase 2 e acetilcarnitina desacetilase	*B. velezensis*	-
pi2; CYP95; pi3; Pti4; pti5; TOM51; TOM52 - proteínas de sinalização e fatores de transcrição	*T. harzianum*	-
STKR - receptor serina/treonina quinase	-	*P. viticola*
SAMT- metiltransferase de ácido benzoico/ácido salicílico	-	*B. cinerea*

Tabela 3 - Genes expressos por microrganismos benéficos durante a resistência sistêmica induzida.

Genes	Função	Microrganismo
ptsG	Transporte e metabolismo de açúcares, especialmente glicose, por meio da proteína IIAGlc do sistema fosfotransferase.	*Bacillus cereus*
ptsHI	Os genes ptsH e ptsI codificam as proteínas HPr e EI, envolvidas no transporte, fosforilação e regulação metabólica de açúcares.	*B. cereus*
Promotor de *ptsG*	Região envolvida na expressão de ptsG e, consequentemente, no transporte e metabolismo de açúcares.	*B. cereus*
TRI4	Codifica a enzima tricodieno oxigenase.	*Trichoderma harzianum*
epl1 e *sml1*	Codificam proteínas eliciadoras de respostas semelhantes às observadas em plantas.	*T. virens*; *T. atroviride*
pqqA e *pqqB*	Genes relacionados à biossíntese de pirroloquinolina quinona.	*Enterobacter intermedium*

Hormônios, enzimas, proteínas e espécies reativas de oxigênio foram os principais grupos de metabólitos associados à RSI. O ácido salicílico apareceu em 27% dos estudos, o etileno em 25%, a peroxidase e o ácido jasmônico em 24% cada, e a quitinase em 19%. Os demais metabólitos ocorreram em menos de 10% das publicações (Figura 10).

Figura 10 - Metabólitos associados ao sistema de defesa vegetal em estudos sobre resistência sistêmica induzida.

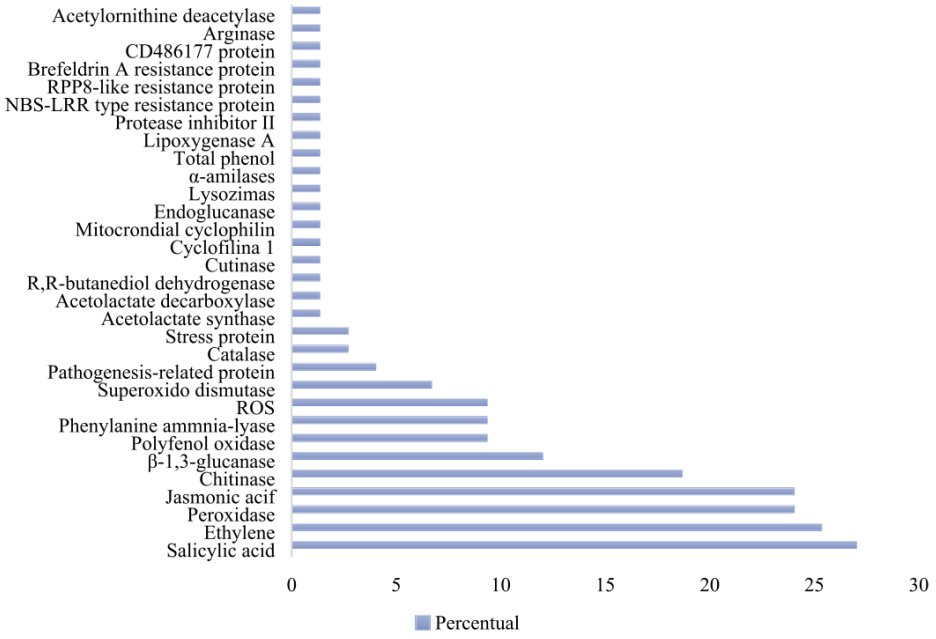


Fig. 10. Assessment of Plant Defense Metabolites in Induced Systemic Resistance Studies.

7.4. Discussão

Microrganismos como vírus, bactérias e fungos podem ser empregados no manejo de fitopatógenos e contribuir para a redução do uso de agentes químicos. Eles atuam tanto diretamente quanto pela ativação de mecanismos de defesa vegetal, frequentemente mediados por elicitores (Zehra *et al*., 2021). Os elicitores são substâncias endógenas ou exógenas produzidas pelas próprias plantas, por microrganismos benéficos ou por patógenos e desencadeiam respostas fisiológicas a estresses bióticos, entre elas a resistência sistêmica induzida (Barka *et al*., 2022; del Carmen Orozco-Mosqueda *et al*., 2023).

A RSI envolve proteínas de defesa, ácido salicílico e diferentes vias de sinalização hormonal. Embora seu mecanismo não esteja totalmente esclarecido, sabe-se que pode ser iniciada por padrões moleculares associados a microrganismos, reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões presentes nas plantas. Esse reconhecimento ativa respostas de defesa em poucos minutos (Pršić e Ongena, 2020; Rahman *et al*., 2015). Nesta revisão, observou-se que, mesmo na ausência de um patógeno, microrganismos benéficos ativaram genes relacionados ao ácido jasmônico, ao etileno e a enzimas de remoção de espécies reativas de oxigênio (Elías *et al*., 2018; Gómez-Lama Cabanás *et al*., 2022; Sáenz-Mata *et al*., 2014). Isso indica que a planta reconhece o microrganismo benéfico e inicia uma resposta, embora essa interação pareça não avançar para uma fase de intensa ação de moléculas efetoras (Malik *et al*., 2020).

O reconhecimento inicial dos microrganismos e a transdução de sinais são etapas centrais para a indução de resistência. RNAs não codificadores também podem participar da percepção de organismos benéficos e prejudiciais e contribuir para a imunidade vegetal. Por isso, esses RNAs representam uma linha promissora para esclarecer mecanismos da RSI, ainda pouco estudados (Huang *et al*., 2023; Zhou *et al*., 2021; Sharma *et al*., 2022).

Microrganismos benéficos parecem ter evoluído para limitar a ativação excessiva do sistema imune do hospedeiro. Ainda assim, é necessário compreender melhor o equilíbrio entre reconhecimento eficiente e intensidade da resposta. Genes e fatores de transcrição atuam de maneira integrada em vias que envolvem ácido salicílico, ácido jasmônico, etileno e proteínas

quinases ativadas por mitógenos. O perfilamento de miRNAs em escala genômica, seguido de validação funcional, pode ampliar o conhecimento sobre esses mecanismos e apoiar novas estratégias de controle de pragas e doenças. Tecnologias de interferência por RNA também apresentam potencial nesse contexto (Yu *et al*., 2022).

Diversos microrganismos naturais ou recombinantes, como *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Trichoderma*, já são utilizados comercialmente como agentes de controle biológico. O aproveitamento seguro e eficiente desses organismos depende de uma compreensão mais detalhada de suas interações em níveis celular e molecular (Zehra *et al*., 2021).

Trichoderma é um gênero fúngico versátil e oportunista, com diferentes aplicações na agricultura. Pode atuar diretamente contra fitopatógenos por competição e antagonismo na rizosfera (Ferreira e Musumeci, 2021; Sumida *et al*., 2018) e também estabelecer associações benéficas com as plantas, favorecendo crescimento e proteção. Sua capacidade de induzir respostas contra estresses bióticos e abióticos e de estimular memória transcricional tem despertado interesse científico (Molinari e Leonetti, 2019; Segarra *et al*., 2009). A diversidade de espécies e as possibilidades de uso como agentes de controle biológico, bioestimulantes e biofertilizantes têm impulsionado pesquisas com esse gênero (Greco *et al*., 2012; Kashyap *et al*., 2020).

O desenvolvimento de produtos inovadores à base de *Trichoderma*, contudo, ainda enfrenta limitações regulatórias e dificuldades de comunicação entre pesquisadores e formuladores de políticas públicas. Mesmo assim, é importante continuar explorando seu potencial em sistemas sustentáveis e em estratégias que reduzam a dependência de compostos sintéticos (Lahlali *et al*., 2022; Mawar *et al*., 2021). Abordagens multidisciplinares são necessárias para compreender suas propriedades e ampliar os benefícios desse grupo para uma agricultura mais segura e ecoeficiente, em consonância com os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (Woo *et al*., 2023).

Assim como *Trichoderma*, as rizobactérias promotoras do crescimento vegetal ocupam a rizosfera e podem favorecer o desenvolvimento e a resistência das plantas a estresses bióticos e abióticos. Ainda existem, entretanto, lacunas sobre a comunicação química entre plantas e microrganismos da rizosfera e sobre os efeitos dessas interações no metaboloma vegetal (Shelef *et al*., 2019).

O microbioma da rizosfera e seus metabólitos contribuem para a saúde das plantas por modulação hormonal, fornecimento de nutrientes e supressão de patógenos. A comunicação química pode envolver compostos orgânicos voláteis produzidos pelas plantas e pelos microrganismos (Howard *et al*., 2022; Kai *et al*., 2016). Compostos voláteis microbianos podem ativar vias específicas de sinalização, induzir genes de defesa e ampliar a capacidade da planta de responder a patógenos e outros estresses bióticos (Kong *et al*., 2018). Compreender esses compostos e seu potencial contra fitopatógenos é importante para o desenvolvimento de formulações biológicas mais inteligentes e ambientalmente seguras (Thankappan *et al*., 2022).

As rizobactérias promotoras do crescimento podem reduzir infestações e aumentar o desempenho das culturas por mecanismos diretos, como a produção de metabólitos antimicrobianos, e indiretos, pela estimulação da resposta imune vegetal. Apesar dos desafios para sua aplicação em larga escala, o desenvolvimento de inoculantes adequadamente formulados pode oferecer uma abordagem integrada para melhorar a saúde das plantas e a produtividade (Khoshru *et al*., 2023). Entre esses microrganismos, *Bacillus* se destaca pela diversidade funcional em suas interações com as plantas (Blake *et al*., 2021; Dame *et al*., 2021; Miljaković *et al*., 2020). Espécies do gênero ocorrem no solo e na rizosfera e podem proteger as plantas pela indução de resistência sistêmica (Abdelkhalek *et al*., 2020; Kang *et al*., 2019; Rahman *et al*., 2015). Contudo, seu potencial ainda precisa ser mais explorado e transferido de forma consistente para aplicações práticas.

A engenharia do microbioma tem sido estudada como estratégia para promover sustentabilidade na agricultura e contribuir para os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável.

Os resultados desta revisão reforçam o potencial do microbioma vegetal e sua importância para a agricultura e o desenvolvimento sustentável (Sonowal *et al*., 2023).

7.5. Conclusões

Microrganismos benéficos são capazes de induzir resistência sistêmica nas plantas. Entre os grupos mais estudados destacam-se *Trichoderma*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. Ao interagirem com os tecidos vegetais, esses microrganismos alteram a expressão gênica e estimulam a produção de proteínas, enzimas e metabólitos envolvidos nas vias de ácido jasmônico, ácido salicílico e etileno. Essas respostas fortalecem o sistema de defesa e podem reduzir a incidência de doenças. O aprofundamento dos mecanismos moleculares envolvidos e a validação em diferentes patossistemas são fundamentais para transformar esse conhecimento em produtos biotecnológicos eficientes e sustentáveis.

Contribuição dos autores - CRediT
Matheus Emannuel Oliveira Vieira: concepção, curadoria dos dados, análise formal e redação da versão inicial. Valdinete Vieira Nunes: metodologia e validação. Crislaine Costa Calazans: metodologia e validação. Renata Silva-Mann: administração do projeto, supervisão, validação, revisão e edição do texto.

Declaração de conflito de interesses
Os autores declararam não haver conflitos de interesse associados ao artigo.

Agradecimentos
Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Código de Financiamento 001) e ao Grupo de Pesquisa em Conservação, Melhoramento e Gestão de Recursos Genéticos (GENAPLANT).

Aprovação ética
O artigo não envolveu estudos com participantes humanos ou animais.

7.6. Referências Bibliográficas

Abdelkhalek, A., Behiry, S.I., Al-Askar, A.A., 2020. *Bacillus velezensis* pea1 inhibits *Fusarium oxysporum* growth and induces systemic resistance to cucumber mosaic virus. Agronomy 10 (9), 1312–1330. https://doi.org/10.3390/agronomy10091312.

Abedini, D., Jaupitre, S., Bouwmeester, H., Dong, L., 2021. Metabolic interactions in beneficial microbe recruitment by plants. Curr. Opin. Biotechnol. 70, 241–247. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.06.015.

Akram, S., Ahmed, A., He, P., He, P., Liu, Y., Wu, Y., Munir, S., He, Y., 2023. Uniting the role of endophytic fungi against plant pathogens and their interaction. J. Fungi. 9 (72-95) https://doi.org/10.3390/jof9010072.

Anjali, Kumar, S., Korra, T., Thakur, R., Arutselvan, R., Kashyap, A.S., Nehela, Y., Chaplygin, V., Minkina, T., Keswani, C., 2023. Role of plant secondary metabolites in defence and transcriptional regulation in response to biotic stress. Plant Stress. 8. 100-154. https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100154.

Aria, M., Cuccurullo, C., 2017. bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. J. Informet. 11 (4), 959–975. https://doi.org/10.1016/j. joi.2017.08.007975.

Aria, M., Misuraca, M., Spano, M., 2020. Mapping the evolution of social research and data science on 30 years of social indicators research. *Soc. Indic. Res*. 149, 803–831. https://doi.org/10.1007/s11205-020-02281-3.

Barka, E.A., Lahlali, R., Mauch-Mani, B., 2022. Editorial: Elicitors, secret agents at the service of the plant kingdom. *Front. Plant Sci.* 13, 8–10.https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1060483.

Blake, C., Christensen, M.N., Kovacs, A.T., 2021. Molecular aspects of plant growth promotion and protection by *Bacillus subtilis*. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 34, 15–25. https://doi.org/10.1094/MPMI-08-20-0225-CR.

Cardoza, R.E., McCormick, S.P., Malmierca, M.G., Olivera, E.R., Alexander, N.J., Monte, E., Gutiérrez, S., 2015. Effects of trichothecene production on the plant defense response and fungal physiology: Overexpression of the *Trichoderma arundinaceum* tri4 gene in *T. harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6355–6366. https://doi.org/10.1128/AEM.01626-15.

Dame, Z.T., Rahman, M., Islam, T., 2021. Bacilli as sources of agrobiotechnology: recent advances and future directions. *Green Chem. Lett. Rev.* 14, 245–270. https://doi.org/10.1080/17518253.2021.1905080.

del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Fadiji, A.E., Babalola, O.O., Santoyo, G., 2023. Bacterial elicitors of the plant immune system: An overview and the way forward. *Plant Stress*, 100138. https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100138.

Elhamouly, N.A., Hewedy, O.A., Zaitoon, A., Miraples, A., Elshorbagy, O.T., Hussien, S., El-Tahan, A., Peng, D., 2022. The hidden power of secondary metabolites in plant- fungi interactions and sustainable phytoremediation. Front. Plant Sci. 13, 1–21. https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1044896.

Elías, J.M., Guerrero-Molina, M.F., Martínez-Zamora, M.G., Díaz-Ricci, J.C., Pedraza, R. O., 2018. Role of ethylene and related gene expression in the interaction between strawberry plants and the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Plant Biol. 20, 490–496. https://doi.org/10.1111/plb.12697.

Ferreira, F.V., Musumeci, M.A., 2021. Trichoderma as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy. World J. Microbiol. Biotechnol. 37, 1–17. https://doi.org/10.1007/s11274-021-03058-7.

Gómez-Lama Cabanás, C., Wentzien, N.M., Zorrilla-Fontanesi, Y., Valverde-Corredor, A., Fernández-González, A.J., Fernández-López, M., Mercado-Blanco, J., 2022. Impacts of the Biocontrol Strain *Pseudomonas simiae* PICF7 on the Banana Holobiont: Alteration of Root Microbial Co-occurrence Networks and Effect on Host Defense Responses. *Front. Microbiol.* 13, 1–16. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.809126.

Greco, M., Chiappetta, A., Bruno, L., Bitonti, M.B., 2012. In *Posidonia oceanica* cadmium induces changes in DNA methylation and chromatin patterning. *J. Exp. Bot.* 63, 695–709. https://doi.org/10.1093/jxb/err313.

Hale, B., Brown, E., Wijeratne, A., 2023. An updated assessment of the soybean–*Phytophthora sojae* pathosystem. *Plant Pathol*. 843–860 https://doi.org/10.1111/ppa.13713.

Hemmati, F., Behjatnia, S.A.A., Moghadam, A., Afsharifar, A., 2023. Induction of systemic resistance against cucumber mosaic virus (CMV) and tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato. *Int. J. Pest Manag.* 1–14. https://doi.org/10.1080/09670874.2023.2202150.

Howard, M.M., Bass, E., Chautá, A., Mutyambai, D., Kessler, A., 2022. Integrating plant- to-plant communication and rhizosphere microbial dynamics: ecological and evolutionary implications and a call for experimental rigor. *ISME* J. 16, 5–9. https://doi.org/10.1038/s41396-021-01063-0.

Huang, J., Zhou, W., Zhang, X., Li, Y., 2023. Roles of long non-coding RNAs in plant immunity. *PLoS Pathog*. 19 (5), e1011340.

Jack, A.L.H., Nelson, E.B., 2018. A seed-recruited microbiome protects developing seedlings from disease by altering homing responses of *Pythium aphanidermatum* zoospores. *Plant Soil* 422, 209–222. https://doi.org/10.1007/s11104-017-3257-2.

Kai, M., Effmert, U., Piechulla, B., 2016. Bacterial-plant-interactions: Approaches to unravel the biological function of bacterial volatiles in the rhizosphere. *Front. Microbiol.* 7 https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00108.

Kang, X., Wang, L., Guo, Y., ul Arifeen, M.Z., Cai, X., Xue, Y., Bu, Y., Wang, G., Liu, C., 2019. A comparative transcriptomic and proteomic analysis of hexaploid wheat's responses to colonization by *Bacillus velezensis* and *Gaeumannomyces graminis*, both separately and combined. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 32, 1336–1347. https://doi.org/10.1094/MPMI-03-19-0066-R.

Kashyap, P.L., Solanki, M.K., Kushwaha, P., Kumar, S., Srivastava, A.K., 2020. Biocontrol Potential of salt-tolerant trichoderma and hypocrea isolates for the management of tomato root rot under saline environment. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 20, 160–176. https://doi.org/10.1007/s42729-019-00114-y.

Khoshru, B., Mitra, D., Nosratabad, A.F., Reyhanitabar, A., Mandal, L., Farda, B., Djebaili, R., Pellegrini, M., Guerra-Sierra, B.E., Senapati, A., Panneerselvam, P., Mohapatra, P.K.D., 2023. Enhancing manganese availability for plants through microbial potential: a sustainable approach for improving soil health and food security. *Bactéria* 2, 129–141. https://doi.org/10.3390/bactéria2030010.

Knoester, M., Pieterse, C.M.J., Bol, J.F., Van Loon, L.C., 1999. Systemic resistance in arabidopsis induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 720–727. https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.8.720.

Kong, H.G., Shin, T.S., Kim, T.H., Ryu, C.M., 2018. Stereoisomers of the bacterial volatile compound 2,3-butanediol differently elicit systemic defense responses of pepper against multiple viruses in the field. *Front. Plant Sci.* 9, 1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00090.

Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., Barka, E.A., 2022. Biological control of plant pathogens: a global perspective. *Microorganisms*. 10, 596–629. https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596.

Li, P., Xia, E., Fu, J., Xu, Y., Zhao, X., Tong, W., Tang, Q., Tadege, M., Fernie, A.R., Zhao, J., 2022. Diverse roles of MYB transcription factors in regulating secondary metabolite biosynthesis, shoot development, and stress responses in tea plants (*Camellia sinensis*). *Plant J.* 110, 1144–1165. https://doi.org/10.1111/tpj.15729.

Lin, C.H., Lu, C.Y., Tseng, A.T., Huang, C.J., Lin, Y.J., Chen, C.Y., 2020. The ptsG gene encoding the major glucose transporter of *Bacillus cereus* C1L participates in root colonization and beneficial metabolite production to induce plant systemic disease resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 33, 256–271. https://doi.org/10.1094/MPMI-06-19-0165-R.

Malik, N.A.A., Kumar, I.S., Nadarajah, K., 2020. Elicitor and receptor molecules: Orchestrators of plant defense and immunity. *Int. J. Mol. Sci*. 21 https://doi.org/10.3390/ijms21030963.

Mawar, R., Manjunatha, B.L., Kumar, S., 2021. Commercialization, diffusion and adoption of bioformulations for sustainable disease management in Indian arid agriculture: Prospects and challenges. *Circ. Econ. Sustain*. 1, 1367–1385. https://doi.org/10.1007/s43615-021-00089-y.

McCain, K.W., 1991. Mapping economics through the journal literature: An experiment in journal cocitation analysis. *J. Am. Soc. Inf. Sci.* 42, 290–296. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4571(199105)42:4<290::AID-ASI5>3.0.CO;2-9.

Miljaković, D., Marinković, J., Balešević-Tubić, S., 2020. The significance of *Bacillus* spp. In disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms* 8, 1–19. https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037.

Molinari, S., Leonetti, P., 2019. Bio-control agents activate plant immune response and prime susceptible tomato against root-knot nematodes. *PLoS One* 14, 1–17. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213230.

Morales-Cedeño, L.R., Orozco-Mosqueda, M.del C., Loeza-Lara, P.D., Parra-Cota, F.I., de los Santos-Villalobos, S., Santoyo, G., 2021. Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiol. Res.* 242 https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612.

Mourouzidou, S., Ntinas, G.K., Tsaballa, A., Monokrousos, N., 2023. Introducing the power of plant growth promoting microorganisms in soilless systems: A promising alternative for sustainable agriculture. *Sustain*. 15 (7), 5959. https://doi.org/10.3390/su15075959.

Nirwan, S., Sharma, A.K., Tripathi, R.M., Pati, A.M., Shrivastava, N., 2023. Resistance strategies for defense against Albugo candida causing white rust disease. *Microbiol.Res*. 270, 127317 https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127317.

Nunes, V.V., Silva-Mann, R., Souza, J.L., Calazans, C.C., 2022. Pharmaceutical, food potential, and molecular data of *Hancornia speciosa* Gomes: a systematic review. *Genet. Resour. Crop Evol.* 69, 525–543. https://doi.org/10.1007/s10722-021-01319-w.

Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M.V., Senthil-Kumar, M., 2017. Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Front. Plant Sci.* 8, 1–15. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00537.

Person, C., Samborski, D.J., Rohringer, R., 1962. The gene-for-gene concept. *Nature* 194 (4828), 561–562.

Poulaki, E.G., Tjamos, S.E., 2023. Bacillus species: a factory of plant protective volatile organic compounds.134(3), lxad037 *J. Appl. Microbiol*. 1–10. https://doi.org/10.1093/jambio/lxad037.

Pršić, J., Ongena, M., 2020. Elicitors of plant immunity triggered by beneficial bacteria. *Front. Plant Sci*. 11, 1–12. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.594530.

Rahman, A., Uddin, W., Wenner, N.G., 2015. Induced systemic resistance responses in perennial ryegrass against *Magnaporthe oryzae* elicited by semi-purified surfactin lipopeptides and live cells of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Mol. Plant Pathol.* 16, 546–558. https://doi.org/10.1111/mpp.12209.

Sáenz-Mata, J., Salazar-Badillo, F.B., Jiménez-Bremont, J.F., 2014. Transcriptional regulation of *Arabidopsis thaliana WRKY* genes under interaction with beneficial fungus *Trichoderma atroviride*. *Acta Physiol. Plant.* 36, 1085–1093. https://doi.org/10.1007/s11738-013-1483-7.

Salas-Marina, M.A., Isordia-Jasso, M.I., Islas-Osuna, M.A., Delgado-Sánchez, P., Jiménez-Bremont, J.F., Rodríguez-Kessler, M., Rosales-Saavedra, M.T., Herrera-Estrella, A., Casas-Flores, S., 2015. The Epl1 and Sm1 proteins from *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma virens* differentially modulate systemic disease resistance against different life style pathogens in *Solanum lycopersicum*. *Front. Plant Sci.* 6, 1–13. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00077.

Salwan, R., Sharma, A., Kaur, R., Sharma, R., Sharma, V., 2022. The riddles of *Trichoderma* induced plant immunity. *Biol. Control* 174, 105037. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105037.

Salwan, R., Sharma, M., Sharma, A., Sharma, V., 2023. Insights into plant beneficial microorganism-triggered induced systemic resistance. *Plant Stress* 7, 100140. https://doi.org/10.1016/j.stress.2023.100140.

Schulze-Lefert, P., Panstruga, R., 2011. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends Plant Sci.* 16, 117–125. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.01.001.

Segarra, G., Van Der Ent, S., Trillas, I., Pieterse, C.M.J., 2009. MYB72, a node of convergence in induced systemic resistance triggered by a fungal and a bacterial beneficial microbe. *Plant Biol.* 11, 90–96. https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00162.x.

Sharma, R., Sindhu, S., Sindhu, S.S., 2018. Suppression of Alternaria blight disease and plant growth promotion of mustard (*Brassica juncea* L.) by antagonistic rhizosphere bacteria. *Appl. Soil Ecol.* 129, 145–150. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.05.013.

Sharma, Y., Sharma, A., Madhu, S., Singh, K., Upadhyay, S.K., 2022. Long Non-Coding RNAs as emerging regulators of pathogen response in plants. *Non-coding RNA* 8. https://doi.org/10.3390/ncrna8010004.

Shelef, O., Hahn, P.G., Getman-Pickering, Z., Medina, A.M., 2019. Coming to common ground: The challenges of applying ecological theory developed aboveground to rhizosphere interactions. *Front. Ecol. Evol.* 7, 58–66. https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00058.

Sonowal, S., Chhabra, S., Maddela, N.R., Tuteja, N., Prasad, R., 2023. Plant Microbiome in Agroecosystems for Sustainable Agriculture and Environments. In: Chhabra, S., Prasad, R., Maddela, N.R., Tuteja, N. (eds) Plant Microbiome for Plant Productivity and Sustainable Agriculture. Microorganisms for Sustainability. 37. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-5029-2_18.

Sumida, C.H., Daniel, J.F.S., Araujod, A.P.C.S., Peitl, D.C., Abreu, L.M., Dekker, R.F.H. Canteri, M.G., 2018. Trichoderma asperelloides antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. *Biocontrol Sci. Technol.* 28, 142–156. https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1430743.

Thankappan, S., Narayanasamy, S., Sridharan, A.P., Binodh, A.K., Nirmala Kumari, A., Parasuraman, P., Uthandi, S., 2022. Rhizospheric volatilome in modulating induced systemic resistance against biotic stress: A new paradigm for future food security. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 120, 101852 https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2022.101852.

Tiwari, M., Pati, D., Mohapatra, R., Sahu, B.B., Singh, P., 2022. The impact of microbes in plant immunity and priming induced inheritance: A sustainable approach for crop protection. *Plant Stress 4*, 100072. https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100072.

United Nations. "Transforming Our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development." 2015. https://sustainabledevelopment.un.org/post2015/transformingourworld.

Van Eck, N.J., Waltman, L., 2010. Pesquisa de software: VOSviewer, um programa de computador para mapeamento bibliométrico. *Scientometrics* 84 (2), 523–538. https://doi.org/10.1007/s11192-009-0146-3.

Wang, W., Liu, D., Zhang, X., Chen, D., Cheng, Y., Shen, F., 2018. Plant microRNAs in cross-kingdom regulation of gene expression. *Int. J. Mol. Sci.* 19 (7), 2007–2019. https://doi.org/10.3390/ijms19072007.

Wei, J., Zhao, J., Suo, M., Wu, H., Zhao, M., Yang, H., 2023. Biocontrol mechanisms of *Bacillus velezensis* against *Fusarium oxysporum* from *Panax ginseng*. *Biol. Control* 182, 105222. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105222.

Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.D., Jin, H., 2013. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* (80-.) 342, 118–123. https://doi.org/10.1126/science.1239705.

Woo, S.L., Hermosa, R., Lorito, M., Monte, E., 2023. *Trichoderma*: a multipurpose, plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture 21. https://doi.org/10.1038/s41579022-00819-5.

Wu, D., Wang, L., Zhang, Y., Bai, L., Yu, F., 2021. Emerging roles of pathogen-secreted host mimics in plant disease development. *Trends Parasitol.* 37, 1082–1095. https://doi.org/10.1016/j.pt.2021.09.007.

Yu, Y., Gui, Y., Li, Z., Jiang, C., Guo, J., Niu, D., 2022. Induced systemic resistance for improving plant immunity by beneficial microbes. *Plants* 11, 1–19. https://doi.org/10.3390/plants11030386.

Zehra, A., Raytekar, N.A., Meena, M., Swapnil, P., 2021. Efficiency of microbial bio- agents as elicitors in plant defense mechanism under biotic stress: A review. *Curr.Res. Microb. Sci.* 2, 100054 https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100054.

Zhang, H., Wang, F., Song, W., Yang, Z., Li, L., Ma, Q., Tan, X., Wei, Z., Li, Y., Li, J.,Yan, F., Chen, J., Sun, Z., 2023. Different viral effectors suppress hormone-mediated antiviral immunity of rice coordinated by OsNPR1. *Nat. Commun*. 14, 1–17. https://doi.org/10.1038/s41467-023-38805-x.

Zhou, C., Zhu, J., Qian, N., Guo, J., Yan, C., 2021. *Bacillus subtilis* SL18r induces tomato resistance against *Botrytis cinerea*, involving activation of long non-coding RNA, MSTRG18363, to decoy miR1918. *Front. Plant Sci.* 11, 1–14. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.634819.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Nordeste brasileiro, especialmente a região do SEALBA, formada por Sergipe, Alagoas e Bahia, vem ampliando sua participação no cenário agrícola nacional. Esse processo é acompanhado pela intensificação tecnológica dos sistemas produtivos e pela necessidade de soluções que conciliem produtividade, sustentabilidade e adequação às condições regionais.

Esta tese foi desenvolvida a partir de demandas da agricultura do SEALBA e integrou diferentes frentes de pesquisa: o desenvolvimento de uma matriz protetora com potencial para compor uma formulação biológica; a prospecção e a caracterização de culturas microbianas; a avaliação dos efeitos da embebição de sementes em soluções contendo microrganismos; e a análise dos mecanismos relacionados à resistência sistêmica induzida por microrganismos benéficos. Essas abordagens estão alinhadas aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável, especialmente ao ODS 2, relacionado à agricultura sustentável; ao ODS 12, referente à produção responsável; e ao ODS 15, direcionado à conservação da vida terrestre.

Os resultados demonstraram que o tempo de contato das sementes com as soluções microbianas influenciou o crescimento inicial e as respostas metabólicas das plântulas. Entre os períodos avaliados, o tratamento por 4 h apresentou o padrão mais favorável para sementes de milho e soja, com manutenção da germinação e benefícios sobre características associadas ao vigor e ao crescimento inicial. Contudo, essa resposta deve ser validada em outros lotes, genótipos e condições ambientais. Estudos posteriores também deverão avaliar a dinâmica de hidratação das sementes, a estabilidade das soluções e a contribuição individual dos componentes das formulações.

A formulação experimental aplicada a sementes de soja armazenadas favoreceu a germinação e o vigor das plântulas. Seus efeitos também foram observados em características fisiológicas e em componentes de produção de plantas cultivadas em vasos sob limitação nutricional. Em milho, o contato das sementes do híbrido AS 1850 PRO4 por até 4 h com a solução contendo *Bacillus amyloliquefaciens* promoveu respostas favoráveis em características morfológicas das plântulas e esteve associado à modulação do sistema antioxidante. Esses resultados indicam potencial de aplicação, mas ainda requerem validação em condições de casa de vegetação e campo.

Na etapa de prospecção, as culturas B6 e EJ115 apresentaram atividades funcionais de interesse *in vitro*, incluindo a solubilização de fosfato inorgânico e o antagonismo contra *Macrophomina phaseolina*, com maior efeito antagônico promovido por EJ115. A caracterização molecular, entretanto, demonstrou que ambas eram culturas bacterianas mistas. B6 apresentou predomínio de *Azospirillum* e *Serratia*, enquanto EJ115 foi composta principalmente por *Bacillus* e *Staphylococcus*. Portanto, esses materiais não devem ser tratados como isolados puros, estirpes autóctones ou candidatos diretamente aplicáveis ao desenvolvimento de bioinsumos. A continuidade de sua prospecção depende do isolamento dos componentes, da identificação taxonômica em maior resolução e de avaliações específicas de biossegurança. Somente após essas etapas será possível determinar quais microrganismos são responsáveis pelas atividades observadas e se apresentam segurança e potencial para uso agrícola.

A revisão sistemática ampliou a compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência sistêmica induzida por microrganismos benéficos. Foram reunidas informações sobre os principais grupos microbianos associados ao processo e sobre genes, proteínas, vias hormonais e metabólitos envolvidos nas respostas das plantas e dos próprios microrganismos. Essa síntese fornece uma base conceitual para estudos posteriores sobre sinalização molecular, imunidade vegetal e seleção de microrganismos com potencial para induzir resistência.

Em conjunto, os estudos ampliam o conhecimento sobre as interações entre sementes, plantas e microrganismos e oferecem subsídios para o desenvolvimento de tecnologias biológicas adaptadas às condições do SEALBA. Os resultados obtidos constituem uma base experimental promissora, mas não permitem afirmar, nesta etapa, a viabilidade comercial das

formulações ou culturas avaliadas. Para avançar em direção a um bioproduto, serão necessários estudos de estabilidade e formulação, identificação e avaliação de segurança dos componentes microbianos, experimentos com diferentes genótipos e ambientes, ensaios de campo e análises de viabilidade técnica, regulatória e econômica.